

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LA RIGIDEZ DEL SUSTRATO EN
LA RESPUESTA DE COLAPSO DE CONOS DE CRECIMIENTO
DE NEURONAS DE GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL
INDUCIDOS POR LA SEMAFORINA 3A RECOMBINANTE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANDREA ARIADNA RIOS RAMIREZ

DIRIGIDA POR

Dra. ELISA TAMARIZ DOMÍNGUEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO 2010.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUÉRÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LA RIGIDEZ DEL SUSTRATO EN
LA RESPUESTA DE COLAPSO DE CONOS DE CRECIMIENTO
DE NEURONAS DE GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL
INDUCIDOS POR LA SEMAFORINA 3A RECOMBINANTE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANDREA ARIADNA RIOS RAMIREZ

DIRIGIDA POR

Dra. ELISA TAMARIZ DOMÍNGUEZ

SINODALES

Dra. ELISA TAMARIZ DOMÍNGUEZ

DIRECTOR

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODAL

Dr. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA

SINODAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODAL

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis del Instituto de Neurobiología UNAM campus Juriquilla, Qro. con fondos CONACYT (82482) y del proyecto IMPULSA-UNAM02 “Células troncales”.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme subir un escalón más en mi vida.

A mis padres, por su apoyo incondicional en todo momento, por respetar mis decisiones, por enseñarme a no desistir y seguir luchando, por el sacrificio y esfuerzo realizado durante estos años, que a pesar de la distancia siempre están en mi mente y corazón. Por enseñarme a saber que si las cosas que valen la pena se hicieran fácilmente, cualquiera las haría,

A mis hermanos Eduardo y Antonio, por quererme tanto y sobre todo por apoyarme en los momentos que los necesitaba.

A mis tíos, Ricardo y Frida por apoyarme en todo cuando decidí venir a Querétaro; **A Macos** quien me brindo un apoyo incondicional, que estuvo y esta cuando lo necesito.

A Ariel, por creer en mí y estar siempre conmigo.

A la Doctora Elisa Tamariz, a quien no tengo palabras para decirle cuanto le agradezco su apoyo, confianza, disponibilidad, sus palabras de aliento y optimismo en los momentos más difíciles de esta tesis. Gracias por ser mi Directora de tesis.

A la Doctora Guadalupe Alcocer, por apoyarme incondicionalmente y cuando más lo necesite, dándome sabios consejos que me han llevado hasta donde estoy, los cuales agradezco infinitamente, y por dedicarle el tiempo a la tesis.

Al Doctor Alfredo Varela, por dedicar tiempo a mi tesis y permitirme llevarla acabo en su laboratorio.

A la Doctora Angelina Rodríguez, por dedicar tiempo a mi tesis y apoyarme.

A la maestra Ángeles Escamilla, por su apoyo y consejos.

Al maestro Sergio Pacheco y la maestra Ma. Eugenia Ortega, por todo su apoyo.

A todos mis amigos, por ser una parte de mi vida muy importante y por hacer de todo momento algo inolvidable.

V.I Materiales	28
V.II Métodos	30
V.II.1 Preparación de cubreobjetos con sustratos de diferente rigidez	30
V.II.1.1 Pre-Tratamiento de cubreobjetos	30
V.II.1.2 Adición del gel de poliacrilamida al cubreobjetos	31
V.II.1.3 Activación de la superficie de poliacrilamida y conjugación con colágena	32
V.II.2 Obtención de ganglios de la raíz dorsal	32
V.II.3 Disgregación de ganglios de la raíz dorsal	32
V.II.4 Ensayo de colapso	33
V.II.5 Cultivo de la línea celular 3T3	33
V.II.6 Inmunotinción	34
V.II.7 Tinción de citoesqueleto	35
V.II.8 Mediciones y tratamiento estadístico de los datos	35
VI. RESULTADOS	36
VI.1 Estandarización del cultivo de células en geles de poliacrilamida recubiertos con colágena.	36
VI.2 Ensayo de colapso en conos de crecimiento de neuronas disgregadas de los ganglios de la raíz dorsal.	39
VII. DISCUSIÓN	44
VIII CONCLUSIONES	49
IX. BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	57

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadros		Página
1.	Cantidad necesaria de los reactivos para la elaboración de geles de acrilamida/bis-acrilamida con diferente rigidez	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Organización de la médula espinal	6
2.	Esquema de cono de crecimiento	10
3.	Mecanismos de acción de moléculas quimiotrópicas	12
4.	Comportamiento del cono de crecimiento ante la presencia de moléculas quimiotrópicas	14
5.	Estructura de las ocho clases de semaforinas	15
6.	Complejos receptores para la familia de las Semaforinas	18
7.	Señalización mediada por PlexA1	20
8.	Los fibroblastos NIH-3T3 presentan diferentes grados de extensión sobre geles de poliacrilamida con diferentes grados de rigidez	37
9.	La rigidez del sustrato determina el crecimiento axonal y el área de los conos de crecimiento	38
10.	Efecto de la Semaforina 3A-Fc en neuronas GRD cultivadas sobre geles de poliacrilamida con diferente rigidez	42
11.	Cuantificación del efecto de colapso mediante la disminución en el número de filopodios por cono de crecimiento	43
12.	Cuantificación del efecto de colapso mediante la disminución en el área del cono de crecimiento	43

RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario la guía de neuronas y axones resulta esencial para la formación del sistema nervioso, y en el organismo adulto para el restablecimiento de su funcionalidad tras una lesión. La proyección axonal es dirigida por un grupo de proteínas quimiotrópicas, entre ellas la Semaforina 3A (Sema 3A) que tiene la capacidad de colapsar los conos de crecimiento e inhibir el crecimiento de las neuronas de ganglios de la raíz dorsal (GRD). En este trabajo se determinó el papel que tiene la rigidez del sustrato en la respuesta de crecimiento axonal y en el colapso de los conos de crecimiento de neuronas GRD inducidos por Sema 3A recombinante. Se utilizó como sustrato geles de poliacrilamida con diferente grado de rigidez, recubierto con poli-L-ornitina y colágena. Por otra parte se evaluó el efecto de Sema 3A en el colapso de los conos de crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que al incrementar la rigidez del sustrato aumenta la longitud axonal, el área de los conos de crecimiento y la respuesta a Sema 3A. Estos resultados sugieren que será útil tomar en cuenta las propiedades físicas del sustrato para analizar el efecto ejercido por Sema 3A sobre neuronas GRD, por ejemplo en el tejido en desarrollo o en el tejido de cicatrización; y para el diseño de biomateriales con propiedades físicas específicas que favorezcan o inhiban el crecimiento axonal y la respuesta a sema 3A.

I. INTRODUCCIÓN

En México las lesiones a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC) se presentan en 200 de cada 100 mil personas. Tanto las lesiones como las enfermedades del cerebro y médula espinal han adquirido una enorme importancia a nivel social y económico. Las lesiones de médula espinal son el principal ejemplo de lesión del SNC ya que los axones del SNC maduro son incapaces de regenerarse espontáneamente tras una lesión.

Actualmente se piensa que la falta de regeneración axonal del SNC maduro es resultado del efecto combinado de diferentes factores, incluyendo la activación incompleta de los programas de crecimiento axonal tras la lesión y la generación de un ambiente inhibitorio para el crecimiento axonal en el SNC maduro.

Después de una lesión se forma tejido cicatrizal que tiene una composición particular tanto de células como de componentes de matriz extracelular, lo cual proporciona un sustrato diferente al que originalmente conformaba el tejido antes de la lesión. Así se generan cambios en la composición de proteínas y matriz extracelular y en las propiedades mecánicas del sustrato tales como su flexibilidad o rigidez.

Algunas de las proteínas inhibitorias presentes en el sitio de lesión son las llamadas Semaforinas (Sema); en específico Sema 3A restringe la regeneración axonal ya que produce inhibición de la proyección axonal o colapso en los conos de crecimiento y como consecuencia provoca la retracción del axón.

Sema 3A es expresada en el SNC adulto tras una lesión por fibroblastos que se infiltran al SNC procedentes de las meninges, contribuyendo a crear una barrera química en la cicatriz glial la cual tarda entre 7 y 10 días en formarse.

El efecto de Sema 3A se da a través de la regulación del citoesqueleto y de

la adhesión al sustrato, dos factores que también son modulados por las propiedades mecánicas del sustrato. Diversas evidencias han mostrado la importancia de las propiedades mecánicas del sustrato en la migración, formación de adhesiones celulares e incluso en el crecimiento de neuritas; sin embargo hasta el momento no se ha estudiado de que manera la rigidez del sustrato influye en la respuesta a factores que inhiben o promueven el crecimiento axonal, El presente trabajo tiene por objetivo estudiar el efecto inhibitorio de la proteína quimiotrópica Sema 3A sobre el crecimiento axonal de neuronas de ganglios de la raíz dorsal cultivadas en sustratos con diferentes grados de rigidez .

II. ANTECEDENTES

II.1 Sistema Nervioso.

El sistema nervioso es excepcional por la gran complejidad de los procesos mentales y las acciones de control que puede realizar (Guyton y Hall, 2001). Por ejemplo nuestros movimientos, las percepciones sensoriales de lo que ocurre a nuestro alrededor y la generación de una respuesta a ellas dependen de una compleja red de neuronas en nuestro sistema nervioso central y periférico (Ramón y Cajal, 1891) el cual recibe literalmente millones de datos de los distintos órganos de los sentidos.

El sistema nervioso está formado por más de cien mil millones de neuronas. Las señales de entrada (aférentes) llegan a la neurona a través de las sinapsis que establecen, sobre todo, las dendritas, aunque también el cuerpo celular. Según los distintos tipos de neuronas, el número de conexiones sinápticas que mantienen esas fibras de entrada oscila entre unos cientos y doscientas mil. Por el contrario, la señal de salida (eferente) se transmite generalmente por un único axón de la neurona, pero dicho axón puede tener muchas ramas separadas destinadas a distintas partes del sistema nervioso o a la periferia del cuerpo. Un rasgo especial de la mayoría de las sinapsis es que la señal se transmite solamente del axón a las dendritas. Así se consigue que las señales se dirijan en la dirección requerida y cumplan las funciones nerviosas necesarias.

La mayoría de las funciones del sistema nervioso parten de una experiencia sensitiva que proviene de los receptores sensitivos, ya sean receptores visuales, receptores auditivos, receptores táctiles o receptores de otras clases. Esta experiencia sensitiva produce, a veces, una reacción inmediata desde el cerebro; el recuerdo de la experiencia se conserva en el cerebro durante minutos, semanas o años y determina las reacciones del cuerpo en algún momento posterior.

II.1.1 Sistema nervioso central (SNC)

Existen tres niveles principales del sistema nervioso con atributos funcionales concretos:

a) El nivel encefálico inferior o subcortical

Muchas, si no la mayoría de las actividades del organismo que llamamos subconscientes están controladas por las áreas inferiores del encéfalo situadas en el bulbo raquídeo, la protuberancia, el mesencéfalo, el hipotálamo, el tálamo, el cerebelo y los ganglios basales. Por ejemplo; los reflejos de la alimentación, como la secreción salival en respuesta al sabor de los alimentos y la acción de lamerse los labios están gobernados por áreas del bulbo, la protuberancia, el mesencéfalo, la amígdala y el hipotálamo.

b) El nivel encefálico superior o cortical

La corteza cerebral es un almacén de la memoria de enormes dimensiones. La corteza nunca funciona sola, sino siempre en asociación con los centros encefálicos inferiores, ya que estos inician el despertar de la corteza cerebral, abriendo así su banco de recuerdos a la maquinaria pensante del cerebro. El enorme depósito de datos que se conserva en la corteza suele convertir esas funciones en operaciones determinantes y precisas.

c) El nivel espinal o medular

Es una vía que conduce las señales desde la periferia del cuerpo hacia el encéfalo o, en dirección opuesta, desde el encéfalo hacia el cuerpo. Los circuitos neuronales de la médula pueden originar: a) los movimientos de la marcha, b) los reflejos de retirada cuando una parte del cuerpo recibe estímulos dolorosos, c) los reflejos de contracción forzada de las piernas para sostener el cuerpo contra la acción de la gravedad, y d) los reflejos que regulan los vasos sanguíneos locales, los movimientos gastrointestinales y los reflejos que controlan la excreción urinaria. Con frecuencia los niveles superiores del sistema nervioso no actúan enviando

directamente señales a la periferia del cuerpo, sino enviando señales a los centros medulares de control.

II.1.1.1 Organización de la médula espinal

La sustancia gris medular es una zona integradora de los reflejos medulares. Casi todas las señales sensitivas penetran en la médula a través de las raíces sensitivas. Después de ingresar en la médula, cada señal sensitiva sigue dos destinos separados. En primer lugar, una rama del nervio sensitivo termina de inmediato en la sustancia gris de la médula y desencadena reflejos segmentarios locales y otros efectos de carácter local. En segundo lugar, otra rama transmite las señales a niveles más altos del sistema nervioso a zonas más altas de la misma médula, el tronco encefálico, o incluso la corteza cerebral.

La sustancia gris de cada segmento de la médula espinal tiene varios millones de neuronas. Aparte de las neuronas sensitivas de relevo, estas neuronas son de dos tipos:

a) Motoneuronas

En cada segmento de las astas anteriores de la sustancia gris medular existen varios miles de neuronas denominadas motoneuronas. Dan lugar a las fibras nerviosas que salen de la médula por las raíces anteriores e inervan las fibras musculares esqueléticas (Figura 1).

b) Interneuronas:

Las interneuronas están presentes en todas las zonas también de la sustancia gris medular (en las astas posteriores, las astas anteriores y las áreas intermedias entre ambas). Estas células son pequeñas, muy excitables y llegan a conducir hasta 1500 impulsos por segundo. Tienen muchas interconexiones entre sí, y muchas de ellas inervan directamente las motoneuronas. Las interconexiones

entre las interneuronas y las motoneuronas justifican la mayor parte de las funciones integradoras de la médula espinal (Figura 1).

Más de la mitad de las fibras nerviosas que ascienden y descienden por la médula espinal son fibras propioespinales que discurren de un segmento de la médula a otro. Además, cuando las fibras sensitivas entran en la médula desde las raíces medulares posteriores, se bifurcan y ramifican tanto hacia arriba como hacia abajo por la médula espinal; algunas de las ramas transmiten señales sólo a uno o dos segmentos, mientras que otras transmiten señales a muchos segmentos (Guyton y Hall, 2001).

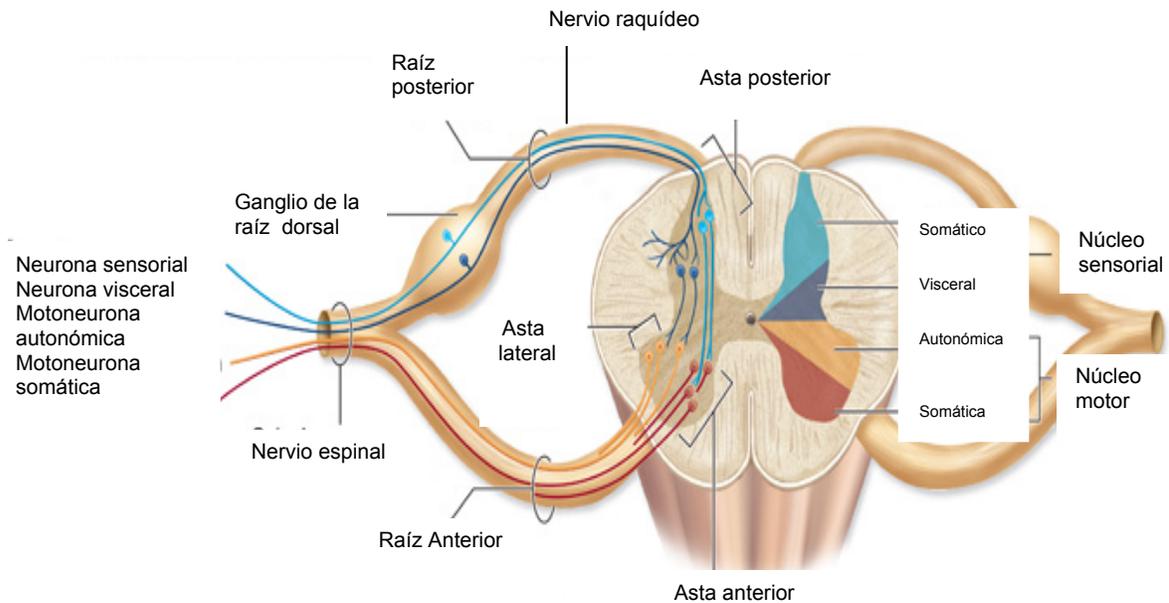


Figura 1. Organización de la medula espinal (Adaptado de McKinley y O'Loughlin, 2006).

II.1.1.2 Ganglios de la raíz dorsal (GRD)

Los ganglios de la raíz dorsal (GRD) también llamados ganglios espinales o sensitivos, son protuberancias ubicadas en la raíz dorsal de la médula espinal, en específico en los agujeros intervertebrales de la columna (Figura 1). Se distribuyen en cervicales, torácicos, lumbares, sacros y coccígeos.

Histológicamente las poblaciones celulares más comunes en el ganglio son las neuronas, los fibroblastos, las células satélites y las células de Schwann. Estas dos últimas están muy relacionadas ya que las células satélite bajo ciertas condiciones pueden adquirir la morfología y desempeñar las funciones de las células de Schwann. Las células satélite envuelven cada neurona sensitiva del ganglio. Por otro lado, las células de Schwann que son la glia del sistema nervioso periférico (SNP), se encuentran asociadas a los axones, envolviendo a varios con su citoplasma o rodeando un solo axón, formando una vaina de mielina característica. La función de las células gliales es principalmente de protección y soporte metabólico neural y axonal. Los fibroblastos, por otro lado, son los productores de la matriz extracelular presente en el tejido conjuntivo del ganglio. Por su parte, las neuronas presentes en los ganglios son exclusivamente de tipo aferente sensitivo que evolucionan a partir de neuroblastos bipolares provenientes de la cresta neural. Las fibras de las neuronas, luego de su nacimiento se dividen en dos ramas divergentes, una medial o central y otra lateral o periférica. Las ramas mediales forman la raíz dorsal, la cual penetra en la médula a través del surco lateral dorsal y se establecen conexión con neuronas presentes en el asta dorsal o posterior. Por su parte las ramificaciones de cada ganglio se unen a la raíz ventral medular formando el nervio raquídeo o mixto (Figura 1), y luego se dirigen a la periferia para terminar en los distintos receptores sensitivos ya sean cutáneos musculares, articulares o viscerales. Estos receptores pueden ser terminaciones libres o estar encapsulados por células especializadas, cuya función es captar y convertir los estímulos del medio en impulsos nerviosos aferentes (Martinez y col., 2000).

II.1.1.2.1 Formación y elongación axonal.

El inicio de la funcionalidad neuronal comienza por la formación de un axón y la generación de dos dominios funcionales, axonal y somatodendrítico. En estos dominios se forman subdominios especializados en la recepción de señales y la propagación de los impulsos nerviosos (Ramón y Cajal, 1897).

Tras la última división, la neurona postmitótica presenta una forma redondeada. En las fases más tempranas, en cultivo, genera un lamelipodio de actina polimerizada a su alrededor (estadio 1). El primer paso en la ruptura de esta simetría es la concentración, en uno o varios puntos, de receptores de factores y proteínas que regulan la polimerización de actina. Se ha descrito que la detección de una señal positiva de crecimiento, a través de receptores de membrana, transforma RhoA-GTP a su forma inactiva, RhoA-GDP. Esta inactivación rompe el complejo de RhoA-ROCK-Profilina e induce la despolimerización de actina en este punto concreto. Otra proteína asociada a actina que participa en la despolimerización de la actina es la cofilina (Silva y col., 2003). Esta ruptura de la barrera de actina es utilizada entonces por los microtúbulos para crecer y generar las neuritas (estadio 2). La regulación del citoesqueleto de actina durante el crecimiento neurítico y axonal es aún poco conocida. Además de la regulación de la dinámica de ensamblaje de los filamentos de actina, su nucleación también juega un papel importante en los mecanismos de crecimiento y motilidad neuronal (Silva y Dotti, 2002). La adquisición de la polaridad neuronal comienza con la formación de un axón a partir de una de las neuritas generadas (estadio 3). El crecimiento del axón a un mayor ritmo que el resto de neuritas requiere la concentración de mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, así como de mecanismos de transporte específicos del axón. Se ha descrito que el punto de crecimiento del axón depende de la posición del centrosoma tras la última división (Anda y col., 2005), lo que supondría un apoyo a la organización de los microtúbulos, su crecimiento y el transporte de proteínas axonales. Sin embargo, el estudio del crecimiento del axón en el modelo de cultivo de neuronas de hipocampo no muestra una relación entre la posición del centrosoma y el punto de crecimiento del axón. Recientemente, un trabajo sugiere que el axón se forma a partir de una de las dos primeras neuritas generadas (Anda y Dotti, 2008).

El segmento inicial del axón (AIS) fue identificado en los años 60 como una estructura que se diferenciaba estructuralmente del resto del axón y del dominio somatodendrítico. Sus principales características son: a) una capa densa granular e

intracelular, b) la presencia de algunos grupos de ribosomas, y c) la presencia de fascículos de microtúbulos (Palay y col., 1968). Esta estructura es la responsable de la generación del potencial de acción y actúa también como una barrera de difusión que controla el tráfico de proteínas hacia el axón.

El axón, una vez formado, debe elongarse y alcanzar dianas específicas para generar contactos sinápticos con otras neuronas o células especializadas en diferentes tejidos. Esta elongación está regulada por señales externas positivas y negativas que regulan el crecimiento y guían al axón hacia su diana. Diversos estudios han mostrado que la ramificación axonal está ligada al comportamiento del cono de crecimiento. Éste cuenta con receptores de señales que están acoplados a mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, tales como receptores a moléculas guía (p.e DDC, receptor de netrina, neuropilina, receptor de Sema 3A) o receptores a componentes de matriz extracelular (p.e.integrinas) (Kalil y col., 2000; Dent y col., 2003). Estos factores pueden regular de manera indirecta la dinámica de los filamentos de actina o microtúbulos en zonas específicas del cono de crecimiento, permitiendo su giro hacia una u otra dirección o incluso el colapso del cono de crecimiento. La neurona, a través del conjunto de receptores y sensores en su cono de crecimiento, realiza exploraciones y crece en la dirección permitida o colapsa ese cono de crecimiento si el ambiente no permite el crecimiento, impidiendo de esta forma la generación de ramificaciones axonales (Antonini y Stryker, 1993; Yu y col., 2008).

II.1.1.2.2 Conos de crecimiento

Para que el sistema nervioso sea funcional, las neuronas extienden sus axones, a menudo, a largas distancias, hasta alcanzar sus dianas. En este proceso se ven implicadas señales moleculares específicas que guían los axones hacia sus objetivos y estas señales, son reconocidas por el cono de crecimiento.

En función de las señales, el cono de crecimiento elabora una respuesta

dentro de un determinado contexto celular, es decir, el ambiente que rodea las células proporciona un juego complejo de órdenes para el axón en vías de crecimiento.

Los conos de crecimiento tienen tres regiones principales. El núcleo central que es rico en microtúbulos, mitocondrias y otros organelos. Del cuerpo proliferan largas y delgadas extensiones conocidas como filopodios. Entre los filopodios están los lamelipodios, que son también móviles y dan al cono de crecimiento su característico aspecto erizado (Figura 2) (Dickson, 2002).

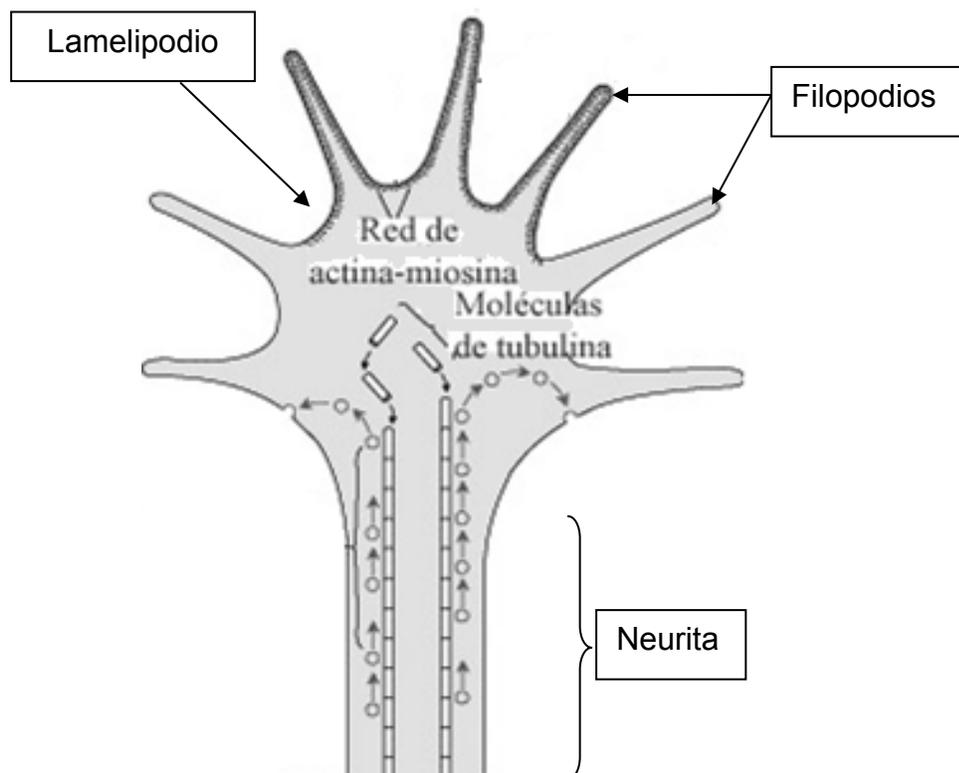


Figura 2. Esquema de cono de crecimiento (Adaptado de Ávila y col., 2007).

La capacidad sensitiva del cono de crecimiento depende en gran parte de sus filopodios. Estas estructuras en forma de cilindro, ricas en actina son muy móviles. Sus membranas poseen receptores para las moléculas que sirven como

señales de dirección para el axón. La longitud de los filopodios les permite tantear el terreno mucho antes que el núcleo central, sus rápidos movimientos les permite hacer un inventario detallado del ambiente y su flexibilidad les permite navegar a través de células y de otros obstáculos. Cuando los receptores de los filopodios encuentran señales en el medio ambiente, el cono es estimulado para avanzar, retraerse o girar. Para la guía de filopodios es particularmente importante el acoplamiento entre las capacidades sensitiva y motora del cono de crecimiento. Es decir, que los receptores en los filopodios no intervengan simplemente en la adherencia sino más bien sean receptores y transmisores de señales acoplados a numerosas vías de segundos mensajeros. Los segundos mensajeros afectan a su vez a la organización del citoesqueleto, y regulan de esa manera la dirección y la velocidad a la que se mueve el cono de crecimiento (Dickson, 2002).

Varios motores moleculares que interactúan con actina, miosina y componentes de la membrana impulsan estas reacciones y la contribución de cada motor molecular al avance del cono de crecimiento probablemente varía de una situación a otra. El paso final implica el flujo de microtúbulos desde el núcleo central a la protusión recientemente creada, de forma que el cono de crecimiento se mueve hacia delante y deja atrás un nuevo fragmento axónico. En el nuevo cono de crecimiento se forman otra vez lamelipodios y filopodios, y el proceso comienza de nuevo (Dent y Gertler, 2003).

Diversas moléculas actúan como señales en la guía del axón. Las integrinas de los conos de crecimiento interactúan en la matriz extracelular. Estas moléculas intervienen en la adherencia y también favorecen el crecimiento del axón. Existen también receptores a moléculas quimiotrópicas que señalizan para permitir el avance o retroceso del cono de crecimiento (Dickson, 2002)

II.1.1.2.3 Efecto de las moléculas quimiotrópicas sobre la proyección axonal.

El efecto de las moléculas quimiotrópicas se da a través de la formación de

gradientes de concentración y de acuerdo a su capacidad de difusión se pueden considerar como de corto o largo alcance. Las proteínas quimiotrópicas de corto alcance pueden estar ancladas a la membrana de otras células o a componentes de la matriz extracelular, las proteínas de largo alcance son secretadas al medio extracelular y pueden difundir grandes distancias (Song y Poo, 2001).

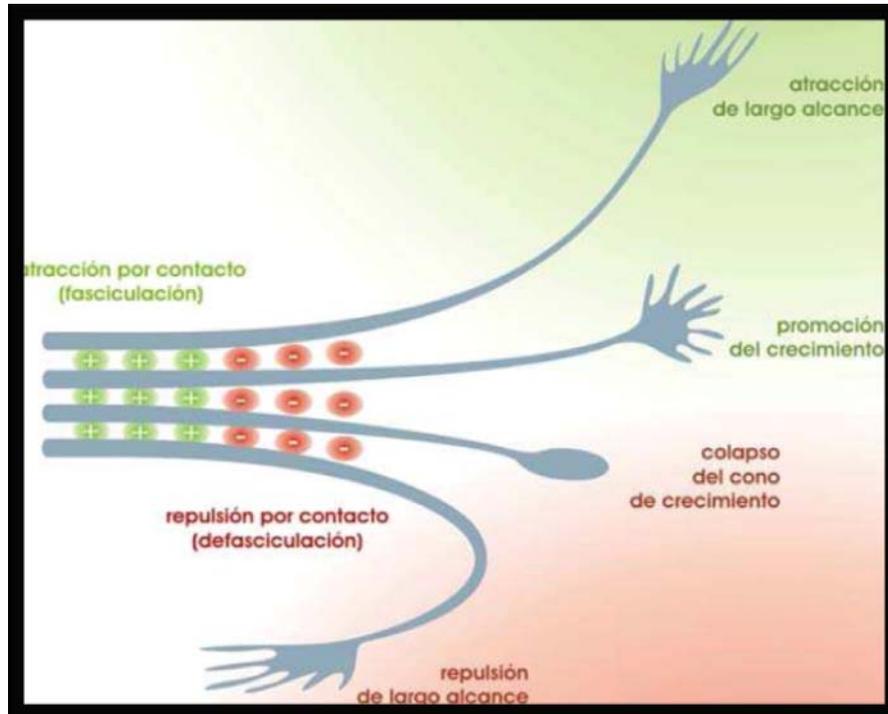


Figura 3. Mecanismos de acción de moléculas quimiotrópicas. Los factores guía influyen en la navegación axonal aportando estímulos de dos naturalezas distintas: positivos o atractivos (representados en verde), y negativos o repelentes (representados en rojo) (Gujarro, 2006).

Se pueden diferenciar tres efectos distintos en la acción de las proteínas quimiotrópicas en axones y neuronas, como se observa en la Figura 3:

a) Atracción o repulsión de corto alcance o de contacto, que permite, por ejemplo, la fasciculación axonal formando haces de fibras nerviosas, y la defasciculación selectiva de dichos haces en puntos concretos.

b) Atracción o repulsión de largo alcance, que permite dirigir al axón o neurona hacia la región diana o evitar la invasión de regiones inapropiadas.

c) Estimulación del crecimiento axonal o colapso del cono de crecimiento, acciones que generan el avance o la detención del cono de crecimiento sin implicar direccionalidad (Song y Poo, 1999; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

II.1.1.2.4 Comportamiento neuronal ante moléculas quimiotrópicas

Se ha descrito una secuencia de eventos que ocurren en el cono de crecimiento axonal tras el encuentro con moléculas quimiotrópicas distribuidas en gradiente de concentración:

a) Detección del gradiente de las moléculas quimiotrópicas, mediante la ocupación desigual de su receptor específico en la superficie del cono de crecimiento, que se traduce primero en un débil gradiente de activación del receptor, y luego en el agrupamiento de varias moléculas de receptor y/o de sus efectores citosólicos, iniciándose así una o varias vías de señalización intracelular.

b) Amplificación de la señal inicial. El agrupamiento inicial de receptores y/o efectores específicamente en una zona del cono de crecimiento desencadena el reclutamiento y concentración en esa misma zona de más intermediarios de la cascada de señalización, y la consiguiente ausencia de dichos intermediarios en el resto del cono; finalmente, la amplificación de la señal intracelular termina en la concentración y ensamblaje de moléculas de actina en un lado del cono de crecimiento según una orientación determinada, por donde se forman nuevas prolongaciones membranosas (filopodios, lamelipodios) que lideran la extensión del axón en la nueva dirección.

c) Adaptación al gradiente de moléculas quimiotrópicas. Una vez detectadas las moléculas quimiotrópicas, y tras la respuesta inicial (atracción/repulsión), el

cono de crecimiento reajusta su sensibilidad hacia las moléculas quimiotrópicas, un mecanismo llamado adaptación, que consiste en un ciclo de desensibilización y posterior resensibilización del cono de crecimiento hacia las distintas concentraciones del gradiente de moléculas quimiotrópicas. Tras cada ciclo de adaptación, el axón avanza ascendiendo (atracción) o descendiendo (repulsión) el gradiente de las moléculas quimiotrópicas (Song y Poo, 2001) (Figura 4).

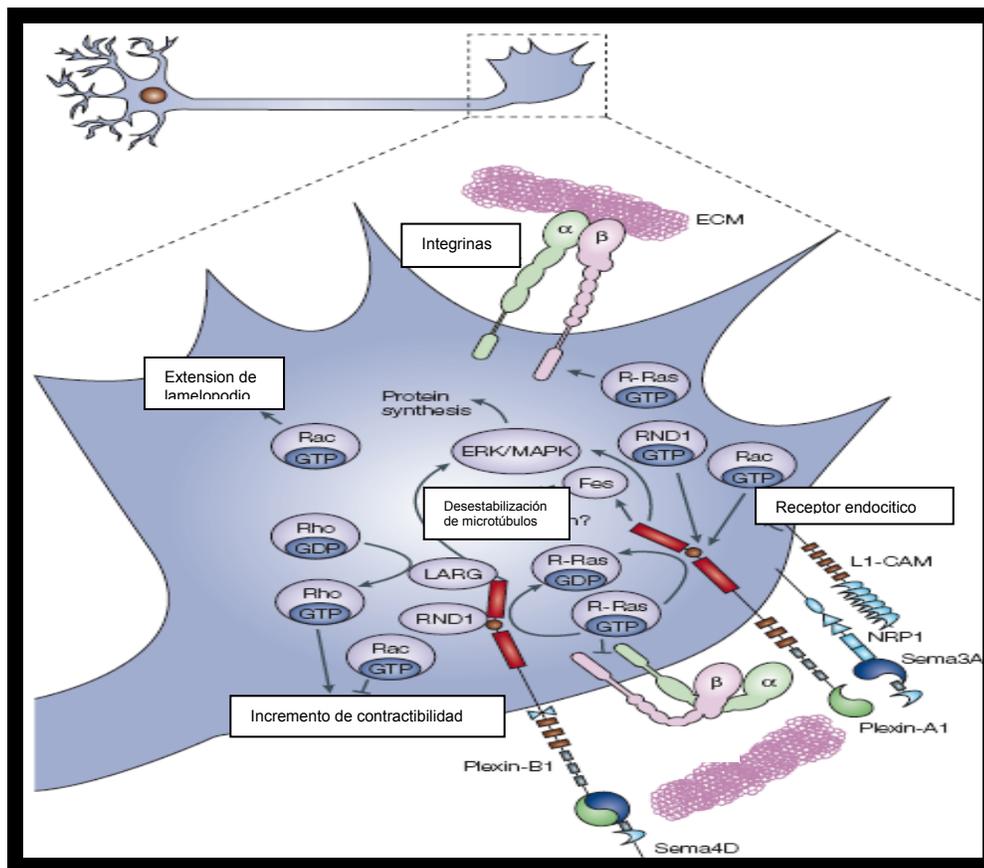


Figura 4. Comportamiento del cono de crecimiento ante la presencia de moléculas quimiotrópicas. En el extremo inferior de la imagen, el cono de crecimiento se encuentra en contacto con semaforinas presentes en células vecinas (como Sema4D en oligodendrocitos) o solubles (como Sema3A), se inician las vías de señalización mediadas por plexinas y/o neuropilinas, que en última instancia producen la inhibición del crecimiento axonal. Al mismo tiempo, en el lado opuesto del cono de crecimiento (donde no hay semaforina), se produce un aumento de la unión a la matriz extracelular mediada por integrinas que facilita el crecimiento. Existe por lo tanto un crecimiento desigual en ambos lados del cono axonal, que causa un cambio de dirección en contra de la fuente de semaforinas (Adaptado de Kruger y col., 2005).

II.2 Semaforinas

Las semaforinas son moléculas quimiotrópicas que se definen por la presencia de un dominio amino-terminal denominado “sema”, altamente conservado y clave para la señalización. El dominio sema equivale estructuralmente a una variante del pliegue tipo hélice- β , un tipo de topología proteica muy común tanto en proteínas extracelulares como citosólicas, y junto con el dominio CDR (Dominio rico en cisteína) constituyen el dominio de aproximadamente 500 aminoácidos que contienen cisteínas conservada y una secuencia rica en cisteínas denominada Met Related (MRS) que es la que confiere la especificidad biológica (Artigiani y col., 1999; Raper, 2000). Además del dominio sema existen otros como el PSI (plexina semaforina e integrina), el dominio carboxi-terminal que contiene aminoácidos básicos con un dominio de inmunoglobulina adyacente que ayuda a reafirmar la unión de la clase III de semaforinas a sus receptores (Kruger y col., 2005; Raper, 2000), (Figura 5).

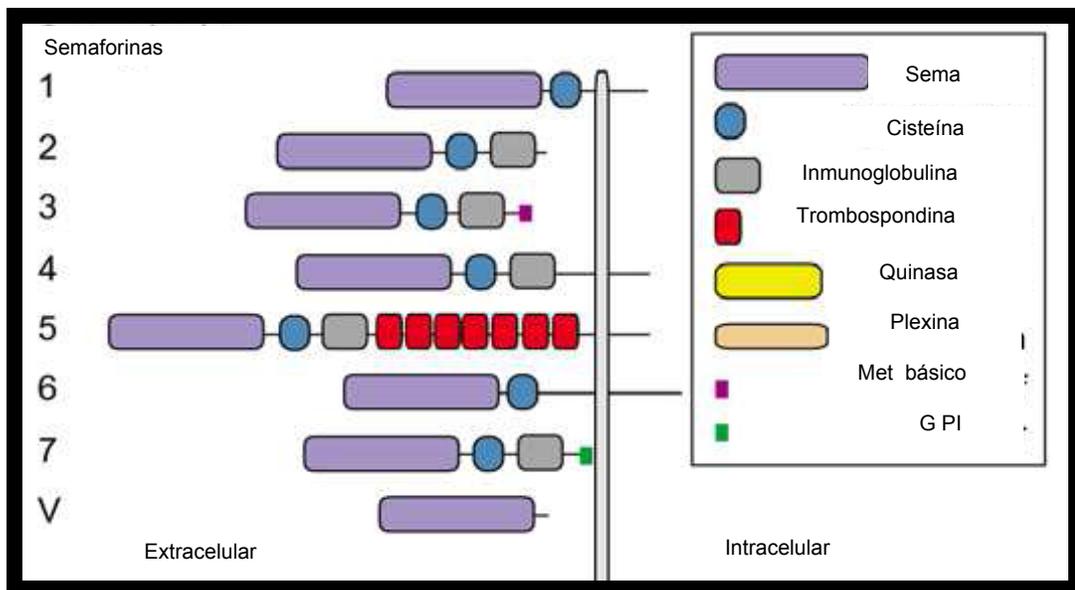


Figura 5. Estructura de las ocho clases de semaforinas (Adaptado de Gheradi y col., 2004).

II.2.1 Clasificación de las semaforinas

Las semaforinas han sido clasificadas según sus dominios adicionales en ocho clases (Raper, 2000), todas ellas de origen animal excepto la clase V, formada por proteínas virales. Las semaforinas de clase II y III son solubles, mientras que el resto contienen semaforinas ancladas a la membrana plasmática; entre ellas, las clases I, IV, V y VI las componen proteínas transmembranales de tipo I (con su extremo N-terminal en el medio extracelular, y su extremo C-terminal en el citosol), y las semaforinas de clase VII presentan un dominio GPI de unión a membrana. Las clases I y II de semaforinas son de origen invertebrado y las clases III, IV, V, VI y VII son de origen vertebrado (Gheradi y col., 2004; Kolodkin y col., 1993), (Figura 5).

II.2.1.1 Semaforina 3A

Fue el miembro de la clase III el que inauguró la familia de las semaforinas, en el año 1993 se purificó y clonó una glucoproteína de 100 kDa con capacidad de colapsar el cono de crecimiento axonal in vitro de los GRD, por lo que fue bautizada como Colapsina y posteriormente renombrada semaforina 3A. La estructura de Sema 3A, común a todos los miembros de la clase III, consiste en el dominio sema más el dominio PSI en su extremo N-terminal, seguidos por un dominio Ig y una región básica en el extremo C-terminal. El dominio sema es necesario y además suficiente para producir colapso axonal, y una secuencia de 70 amino ácidos dentro del dominio específica la actividad propia de cada semaforina.

Sema 3A contiene además tres secuencias consenso para furin-proteasas, cuya acción permite activar la proteína (ya que su versión completa es inactiva) dando lugar a varios péptidos con distinta capacidad de repulsión: la forma de 95 kDa generada por hidrólisis en el punto C-terminal es la más activa, y su posterior digestión en el punto entre los dominios sema y PSI reduce su actividad considerablemente. Tanto Sema 3A como la semaforina transmembranal sema 4B forman homodímeros, y en el caso de Sema 3A la dimerización resulta imprescindible para su función, ya que parece ser necesaria para hidrolizar la

proteína completa y obtener así la forma más activa de 95kDa. Es importante señalar que en embriones de rata, Sema 3A puede actuar como un quimiorepelente para neuronas GRD dependientes de NGF, pero dicho efecto sólo tiene resultado en embriones de estadio 14 (E-14). Esto se debe a que el E-14 la médula espinal ventral segrega una actividad quimiorepelente selectiva para las neuronas responsivas a NGF. Esto se correlaciona bien con el patrón de expresión de Sema 3A en el cordón ventral durante el tiempo de la inervación sensorial aferente, etapa en la que las proyecciones están llegando a su blanco (Kolodkin y col., 1997).

A partir de datos *in vitro* se ha demostrado la acción quimiotrópica de las semaforinas secretables sobre distintas clases de axones, y en particular la función de Sema 3A en colapso o repulsión axonal en los sistemas periférico, sensorial y motor, así como en el sistema nervioso central: Sema 3A repele axones olfativos, corticales e hipocampales. *In vitro*, las semaforinas de clase III también pueden ser factores quimioattractivos: Sema 3C sobre axones corticales, sema 3B sobre axones de bulbo olfativo, y sema 3D sobre axones telencefálicos que forman la comisura anterior (Fiore y Puschel, 2003; Wolman y col., 2004). Sema 3A también puede regular el desarrollo dendrítico; ensayos *in vitro* demuestran que Sema 3A actúa en neuronas corticales atrayendo sus dendritas hacia la superficie pial, y al mismo tiempo repele los axones de esas mismas neuronas, empujándolas hacia la sustancia blanca. La presencia predominantemente dendrítica de la enzima guanililciclase (cuya actividad de producción de cGMP puede cambiar la respuesta axonal ante Sema 3A de repulsión a atracción) podría ser responsable de la dualidad funcional de Sema 3A sobre neuronas corticales (Song y col., 1998; Polleux y col., 2000).

II.2.2 Receptores a semaforina

Se han identificado los receptores de alta afinidad de las semaforinas. Entre ellos están las plexinas, que son una gran familia de moléculas transmembranales que se conservan de invertebrados a humanos, y las neuropilinas (Npn 1 y Npn 2)

que se encuentran solamente en vertebrados. Las semaforinas se unen directamente a las plexinas, mientras que las semaforinas secretadas también requieren neuropilinas como correceptores obligatorios (Figura 6). Varias evidencias indican que el dominio citoplásmico de las plexinas es requerido en la señalización por semaforinas, mientras que el lado citosólico de las neuropilinas es prescindible (Tamagnone y Comoglio, 2004).

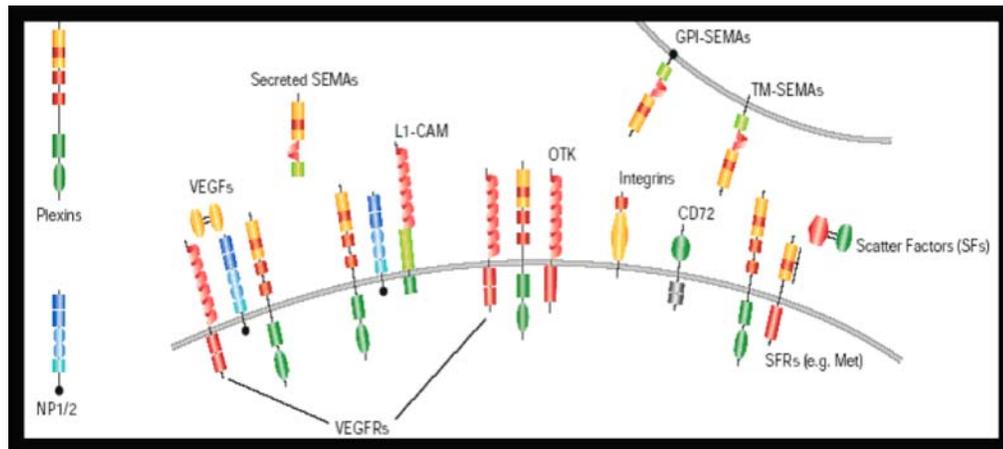


Figura 6. Complejos receptores para la familia de las Semaforinas. Las Plexinas unen a Semaforinas (SEMA5) y pueden formar complejos receptores con Neuropilinas (NP1/2), moléculas de adhesión celular como L1 (L1-CAM), receptores tirosina-quinasa como Otk, receptores Met y Ron (que forman parte de la familia de los receptores para proteínas “Scatter” (SFR)), y receptores de VEGF (VEGFR). Neuropilinas son co-receptores de semaforinas secretables y VEGF. Integrina β 1 participa en la señal de Sema7A. CD72 es un receptor de baja afinidad de Sema4D. GPI: molécula glucosil-fosfatidilinositol. TM: transmembrana (Adaptado de Tamagnone y Comoglio, 2004).

Sin embargo recientemente se ha comenzado a describir la interacción de neuropilina con proteínas de adhesión célula-célula como L1-CAM, o de adhesión al sustrato tales como integrinas, o proteínas de adhesiones focales (Castellani y col., 2002; Valdembrí y col., 2009; Tamagnone y Comoglio, 2004), lo que sugiere que su papel en la regulación de la respuesta a semaforinas podría estar ligada a la regulación de la adhesión al sustrato.

II.2.3 Señalización intracelular inducida por semaforinas

El cono de crecimiento se desensibiliza ante Sema 3A mediante la endocitosis de su receptor neuropilina-1 (Npn1), que recupera su presencia en la membrana plasmática durante la resensibilización mediante tráfico endosomal y síntesis proteica. La respuesta repulsiva del axón inducida por Sema 3A depende de síntesis de proteínas a nivel local (de forma independiente del soma), pero no de su degradación (Campbell y Holt, 2001). Aunque no se conoce del todo la vía de señalización inducida por semaforinas, recientemente se ha comenzado a describir una serie de proteínas involucradas tales como algunas GTPAsas de la familia de las proteínas G pequeñas, algunas cinasas, e incluso reacciones redox a través de la proteína MICAL.

Algunas de las GTPAsas implicadas pertenecen a la familia de las GTPAsas Rho: Rac1, RhoA, y Rnd1. Se ha reportado que Sema 3A activa a Rac1, a través FARP2 un factor intercambiador de guanina (GEF por sus siglas en inglés) que cataliza el cambio de GDP por GTP, y que se encuentra unido a Npn1. La forma activa de Rac1 (ligada a GTP) une la zona intermedia entre los dominios intracelulares C1 y C2 de PlexA1, e induce la unión de Rnd1. Rnd1 induce la actividad de GTPAsas de R-Ras de PlexA1 al estimular la hidrólisis de GTP a GDP, e induciendo a su vez la desactivación de R-Ras (Toyofuku y col., 2005). R-Ras, un miembro de la familia Ras de GTPAsas pequeñas, juega un papel esencial en los procesos de adhesión celular y crecimiento neurítico, y a diferencia de otros miembros de la familia Ras de pequeñas GTPAsas, no señala mediante Erk/MAPK, sino que regula la actividad de integrinas. R-Ras constitutivamente activa aumenta la adhesión celular mediada por integrinas, y este efecto es contrarrestado por una forma mutada de R-Ras que presenta dominancia negativa. Teniendo en cuenta la actividad GAP sobre R-Ras de plexinas, la inhibición de R-Ras resultaría su vez la supresión de la actividad de integrinas, generando colapso axonal y retracción neurítica (Kruger y col., 2005; Negishi y col., 2005).

Por otra parte, la familia de las plexinas contiene en su dominio intracelular residuos tirosina conservados entre sus distintos miembros. Varios estudios

demuestran la participación de las quinasas Fes/Fps, Fyn y Cdk5 en el colapso de axones GRD inducido por Sema 3A (Tamagone y col., 1999).

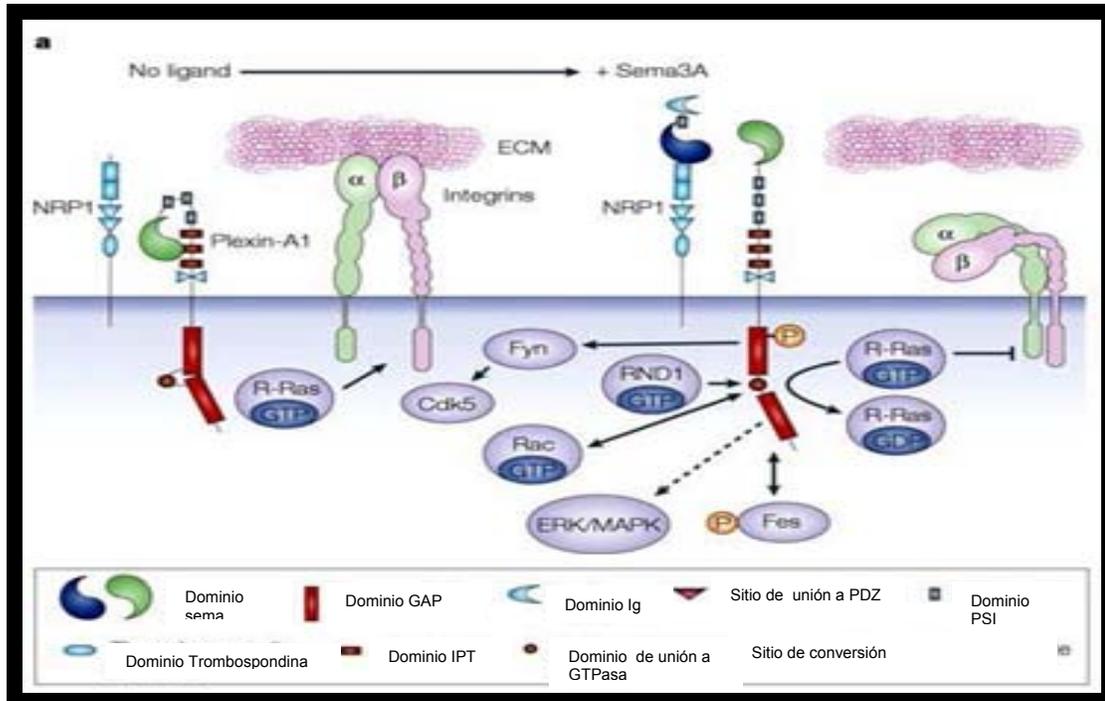


Figura 7. Señalización mediada por PlexA1 (a). Sin ligando, r-Ras activa estimula la adhesión a la matriz extracelular a través de integrinas. La unión de semaforina a Np1 inicia la vía de señalización de PlexA1, cuya actividad GAP (dependiente de Rnd1) estimula la actividad GTPasa intrínseca de r-Ras y, en consecuencia, su inactivación y la posterior disminución de la adhesión a través de integrinas. La cascada de señalización inducida por PlexA1 también produce la activación de Fyn (que a su vez activa Cdk5) y de Erk/MAPK. La señalización entre PlexA1, Fes y Rac podría ser bidireccional (Adaptado de Kruger y col., 2005).

La tirosina-quinasa Fes/Fps une la región intracelular de PlexA1, y en estado basal, Npn1 impide la interacción entre PlexA1 y Fes; la unión de Sema 3A con su receptor Npn1 permite a Fes unirse a PlexA1 y activarse, fosforilando PlexA1 y el complejo Cram/Crmp2 (Mitsui y col., 2002). Se ha demostrado la participación de la tirosina-quinasa Fyn y Sema 3A *in vivo* en el desarrollo dendrítico de neuronas corticales. Fyn une y fosforila la región intracelular de PlexA1 y A2, y la fosforilación aumenta en presencia de Npn1; Cdk5, con actividad serina/treonina quinasa, interacciona con PlexA2 uniéndose a Fyn activo, que a su vez fosforila y activa a

Cdk5. Cdk5 puede fosforilar Crmp2, facilitando posiblemente la posterior fosforilación de Crmp2 por parte de Gsk3 (Eickholt y col., 2002; Brown y col., 2004). Por otra parte, Gsk3, que al igual que Cdk5 tiene actividad serina/treonina quinasa, colocaliza en su forma inactiva con F-actina en la periferia del cono de crecimiento axonal. Sema 3A activa Gsk3, y la actividad de Gsk3 es necesaria para el colapso axonal inducido por Sema 3A. Por lo tanto, Gsk3 puede participar en la señalización de Sema 3A, acoplándola con la reorganización del citoesqueleto de actina y regulando así la motilidad axonal. En la vía de señalización de Sema3A, se identificó Crmp-62, una proteína intracelular homóloga a Unc33 en *C.elegans*, que resultaba esencial en el colapso de axones GRD inducido por Sema 3A. Crmp2 reconstituye la cascada de señalización de Sema 3A dependiente de proteínas G, y es fosforilada por quinasas que forman parte de la señal intracelular iniciada por semaforinas, como Fes/Fps o Cdk5. Crmp2 promueve el ensamblaje de microtúbulos, y estimula el crecimiento y la ramificación del axón, lo que subraya la importancia que la regulación de proteínas Crmp por parte de semaforinas podría tener en repulsión y colapso (Goshima y col., 1995)

Finalmente se ha reportado que MICAL, una proteína citosólica con actividad de flavoproteína-monooxigenasa que cataliza la oxidación de distintos sustratos, interacciona con el extremo C-terminal de la región intracelular de plexinas clase A. MICAL interviene en la señalización de semaforinas clases 1 y 3 y la función oxidativa de MICAL es imprescindible para los efectos repulsivos mediados por dichas semaforinas (Terman y col., 2002). Las flavoproteínas monooxigenasas pueden actuar de forma indirecta, generando un aumento local de oxígeno reactivo en la célula, o bien directamente cambiando el estado redox de varios sustratos, como proteínas del citoesqueleto o miembros de la familia Rho de pequeñas GTPasas (Ventura y col., 2002); de hecho, se ha demostrado que la oxidación de actina provoca su despolimerización (Kolodkin y col., 1997).

II.2.3.1 Sema 3A y el citoesqueleto de actina

Se cree que los factores guía influyen en el movimiento del axón alterando el citoesqueleto neuronal, lo que produce el cambio en la morfología del cono de crecimiento. Así, Sema 3A estimula la despolimerización de actina en la periferia del cono de crecimiento durante su colapso, sin alterar significativamente los microtúbulos (Fan y col., 1993). En el cono de crecimiento colapsado por acción de Sema 3A, la actina se concentra en su centro, alrededor de estructuras endosomales derivadas del aumento de la actividad endocítica (Fournier y col., 2000). Sema 3A altera el estado de polimerización de actina a través de la cinasa LIM, una quinasa serina/treonina que fosforila e inactiva a una proteína despolimerizadora de actina llamada Cofilina. Sema 3A produce la fosforilación y defosforilación de Cofilina en conos de crecimiento de axones GRD, y es necesaria la activación de cinasa LIM (que depende de las quinasas Pak y Rock) para que axones GRD se colapsen ante Sema 3A. En la señal intracelular iniciada por Sema 3A, la cinasa LIM es activada y fosforila a Cofilina, liberándola de la molécula de actina a la que estaba ligada; Cofilina fosforilada es aún inactiva, por lo que es posible que, además de la cinasa LIM, participe también en la señal de Sema 3A un enzima con actividad fosfatasa que defosforila Cofilina y la vuelve a su estado activo (Aizawa y col., 2001).

II.3 Matriz extracelular

La matriz extracelular está formada por un conjunto de macromoléculas que se localizan entre las células de un determinado tejido o en la zona externa de la membrana plasmática de cualquier célula (Silvera y Barrios, 2002). Estos componentes son en general producidos por células locales, especialmente fibroblastos, distribuidos en la matriz (Alzola, 2002), o los aporta la corriente sanguínea. En ambos casos forman el medio donde las células sobreviven, se multiplican y desempeñan sus funciones.

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son de cuatro grandes tipos: a) sistema colágeno b) sistema elástico c) proteoglicanos d)

glicoproteínas multifuncionales (laminina, fibronectina, tenascina, trombospondina y otras). Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás; esto hace que la matriz sea calificada como un verdadero complejo funcional. El sistema de colágeno y el sistema elástico constituyen la arquitectura de la matriz extracelular (Silvera y Barrios, 2002). Las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato y son importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Las cuales están implicadas en el anclaje del citoesqueleto durante la migración y el control de la tensión intracelular o extracelular. Por ejemplo; el citoesqueleto de actina está vinculado a través de varios adaptadores de proteínas como vinculina, paxilina, entre otras a los receptores de la familia de las integrinas. Las integrinas se unen a proteínas de matriz extracelular organizada en cualquiera de las membranas basales o del tejido conectivo. Es importante destacar que si una adhesión focal o sitio de contacto de la células con la matriz extracelular, está formada sobre una superficie plana (cubreobjetos por ejemplo) o dentro de una red de proteínas de la matriz extracelular, los receptores de la integrina se limitan al plano 2D de la membrana plasmática, en el que se pueden difundir lateralmente (Wehrle y Imhif, 2002).

Las magnitudes de la fuerza de tracción local que presentan las células sobre la matriz extracelular son proporcionales al área de adhesión, los sitios de adhesión menores a $1\mu\text{m}^2$ ejercen una fuerza de tracción insignificante, y los sitios mayores a $1\mu\text{m}^2$ ejercen fuerzas que se incrementan linealmente con el área (Lauffenburger y Wells, 2001). Varios estudios han sugerido que la tensión mecánica que se ejerce en la célula-sustrato y célula-célula en los límites de la interfase está implicada en la regulación de una variedad de procesos fisiológicos. Éstos incluyen muchos tipos de movimientos ameboides, la dependencia de anclaje para el control de crecimiento y la remodelación de la matriz extracelular. Debido a que los sitios de contacto permanecen fijos en el sustrato durante la locomoción de la célula, las nuevas adhesiones frontales, así como nuevos cables de conexión deben ser continuamente producidos (Dembo y col., 1999).

Sin embargo no sólo la composición de la matriz extracelular determina su funcionalidad y el tipo de interacciones con las células; las propiedades mecánicas de la matriz tales como la rigidez también son fundamentales para regular funciones celulares como el crecimiento y el movimiento (Sundararaghavan y col., 2008). En investigaciones anteriores se ha observado en cultivos de fibroblastos un comportamiento conocido como durotaxi, en el que las células preferentemente migran hacia las regiones con mayor rigidez del sustrato (Chan y Odde, 2008), y por otro lado las motoneuronas de la médula espinal muestran una preferencia por un sustrato suave que por uno rígido, ya que en el sustrato suave la longitud de las neuritas aumenta al igual que su ramificación (Georges y col., 2006).

Los trabajos pioneros de Pelham y Wang (1997) mostraron que la flexibilidad del sustrato modula la motilidad y la formación de adhesiones al sustrato, de manera que un sustrato con poca rigidez aumenta la motilidad de fibroblastos 3T3, reduce el tamaño de las adhesiones y aumenta su recambio, mientras que en un sustrato rígido las células forman adhesiones estables. Por otra parte se ha descrito que en sustratos blandos los fibroblastos carecen de fibras de estrés (filamentos de actina polimerizada que proporcionan la tensión celular interna), y la expresión de la integrina alfa 5 se ve disminuida (Yeung y col., 2005). Por otra parte, se ha visto que la flexibilidad del sustrato modula la señalización intracelular, de manera que la fosforilación en tirosinas de múltiples proteínas, por ejemplo paxilina una proteína que forma parte del complejo de adhesión celular, es mucho mayor en sustratos rígidos (Discher y col., 2005).

Como se puede apreciar los eventos que llevan a la respuesta de atracción o repulsión ejercido por las semaforinas son sumamente complejos, implican una gran cantidad de proteínas que forman parte de la vía de transducción de señales y finalmente converge en la regulación del citoesqueleto y de la adhesión al sustrato. Por otra parte son numerosas las evidencias que apuntan al papel que tiene las propiedades mecánicas del sustrato en el que se encuentran las células para determinar su adhesión, rearrreglo del citoesqueleto y finalmente su motilidad. Sin

embargo hasta a fecha no se ha reportado de qué manera una de las propiedades del sustrato como la rigidez podría influir en la respuesta a Sema 3A, respuesta en la que también está implicada la regulación del citoesqueleto y de la adhesión al sustrato.

III. HIPÓTESIS

La rigidez del sustrato modula el efecto de colapso por la semaforina 3A recombinante en conos de crecimiento de neuronas obtenidas de ganglios de la raíz dorsal de embriones de ratas Wistar de E-14.5.

IV. OBJETIVOS

IV.I General

Evaluar el efecto de la rigidez del sustrato sobre el colapso de conos de crecimiento de neuronas obtenidas de ganglios de la raíz dorsal de embriones de ratas Wistar de 14 días, expuestas a semaforina 3A recombinante.

IV. II Específicos

- 1) Estandarizar el método de colapso de conos de crecimiento de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (GRD) expuestas a semaforina 3A y cultivadas sobre cubreobjetos recubiertos con matriz extracelular.
- 2) Evaluar el crecimiento axonal de neuronas de GRD sobre sustratos con diferentes grados de rigidez
- 3) Evaluar el efecto de Sema 3A en el colapso de conos de crecimiento de neuronas de GRD sobre sustratos con diferentes grados de rigidez.

V. METODOLOGÍA

V.I Materiales

❖ Químicos

Hidróxido de sodio

3-Aminopropiltriethoxisilano (APTES)

Agua destilada

Agua tridestilada

Glutaraldehído

PBS

HEPES

TEMED

Persulfato de amonio (APS)

Bis-acrilamida

Acilamida

Sulfo-SANPAH

DMEM

10XMEM

DMEM F12

Opti-MEM

Glutamina

Penicilina

Estreptomina

Tritón X-100

Glucosa

Etanol

Tripsina

Tripsina-EDTA

Paraformaldehído

Cloruro de sodio

Cloruro de potasio
Cloruro de calcio dihidratado
Glicerol

❖ Biológicos

NGF
Colágena tipo I
Faloidina-TRITC (039K0691, Sigma-Aldrich)
Suero fetal bovino
Suero de caballo
Embriones de Ratas Wistar de 14 días
Línea celular de fibroblastos NIH-3T3
Sema 3A-Fc (1250-S3, R&D Systems)
Anticuerpo anti- β -tubulina (MMS-411R, Covance)
Anticuerpo anti-vimentina policlonal (V4630, Sigma-Aldrich)
Anticuerpo anti IgG de ratón alexa 488
Anticuerpo anti IgG de cabra alexa 488

❖ Material y Equipo

Cubreobjetos de 22X22mm
Cubreobjetos redondos de 18mm de diámetro
Caja de silicón
Micro agujas
Cajas para cultivo de 10cm
Pipetas de plástico
Pipetas pasteur
Matraz kitazato
Micropipetas
Pinzas de relojero inoxidable
Caja para cultivo de 12 pozos
Tubos Falcon de 15mL

Tubos Falcon de 50mL
Tubos eppendorf
Papel aluminio
Cronómetro
Estuche de disección
Cámara de Neubauer
Baño maría
Mechero
Bolsas amarillas para residuos biológicos infecciosos
Centrífuga
Incubadora de CO₂
Campana de flujo laminar
Balanza analítica
Microscopio Confocal
Microscopio de Fluorescencia
Microscopio de Fluorescencia invertido
Microscopio Estereoscópico
Refrigerador a 4°C

V.II Métodos

Se elaboraron geles de acrilamida-bispoliacrilamida con 4 diferentes grados de rigidez, los cuales se recubrieron con Poli-L- ornithina y colágena tipo I. En ellos se sembraron neuronas disgregadas de ganglios de la raíz dorsal, se evaluó el efecto en los conos de crecimiento ante la presencia de Sema 3A recombinante (Sema 3A-Fc) y se comparó el promedio de las longitudes de los axones y el área de los conos de crecimiento con la prueba estadística t de student.

V.II.1 Preparación de cubreobjetos con geles de diferente rigidez

V.II.1.1 Pre-Tratamiento de cubreobjetos

Se tomó un cubreobjetos de 18 mm de diámetro y se pasó por la flama de un mechero durante 15 segundos, enseguida se le adicionó 20 μL de NaOH 0.1N y se dejó secar, cuando esto sucedió se le añadió 20 μL de APTES y se dejó reposar por 5 minutos, posteriormente se lavó dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada lavado. El cubreobjetos se puso a secar y posteriormente se le adicionó 300 μL de glutaraldehído al 0.5% en PBS, se incubó por 30 minutos, se lavó tres veces con agua destilada, cada lavado de 2 minutos, y se dejó secar.

V.II.1.2 Adición del gel de poliacrilamida al cubreobjetos

Se elaboraron cuatro mezclas de acrilamida-bisacrilamida para la obtención de geles con diferentes grados de rigidez (Cuadro1).

Cuadro 1. Cantidad necesaria de los reactivos para la elaboración de geles de acrilamida-bisacrilamida con diferente rigidez. Un pascal (Pa) es una unidad derivada SI de presión o tensión, que se define como un newton por metro cuadrado (Chang y col., 2002).

Rigidez	0.15kPa	0.32 kPa	3.43 kPa	40.4 kPa
Acrilamida	75 μL	100 μL	100 μL	200 μL
Bisacrilamida	20 μL	20 μL	100 μL	320 μL
Agua destilada	905 μL	880 μL	800 μL	480 μL
APS	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
TEMED	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL

Se preparó la mezcla de acrilamida-bisacrilamida, ésta se desgasificó por 10 minutos, después se añadieron las cantidades señaladas de agua, APS y TEMED. De esta mezcla se tomaron 25 μL y se adicionaron a un cubreobjetos con el pre-tratamiento, y sobre la solución se colocó un cubreobjetos de 22X22 mm, se dejó reposar por 30 minutos. y posteriormente se removió el cubreobjetos superior. El

cubreobjetos inferior que tenía la mezcla ya gelificada se colocó en una caja de cultivo de 12 pozos y se lavó con HEPES 50 mM por 5 minutos.

V.II.1.3. Activación de la superficie de poliacrilamida y conjugación con colágena

A la superficie de cada cubreobjetos se le añadió 350 μ L de una solución de Sulfo-SANPAH 1 mM/ 50 Mm HEPES y se expuso a la luz ultravioleta utilizando una lámpara de luz UV (22 watts) por 8 minutos, al término de este tiempo se repitió el paso anterior con nueva solución de sulfo-SANPAH 1 mM/ 50 Mm HEPES. Después se lavó dos veces, cada lavado de 5 minutos y se le añadió 500 μ L de una solución de PLO (0.1 mg/mL) y se dejó incubando por una noche a 37°C; se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X 2 veces, 5 minutos cada lavado posteriormente se añadió nuevamente PBS 1X y se expuso a luz UV durante 15 minutos, se retiró el PBS 1X, se adicionó 500 μ L de PBS1X a cada pozo y se incubó por 45 minutos. a 37°C, posteriormente se adicionó colágena (0.20 mg/mL) (Ver anexo X1) y se incubó por una 1h, al término de esto se les adicionó 350 μ L de medio de cultivo GRD y se incubó nuevamente a 37°C por 1 h.

V.II.2 Obtención de Ganglios de la raíz dorsal

Se obtuvieron embriones de rata Wistar con un tapón vaginal de 14 días, los cuales se colocaron en una solución Ringer (Ver anexo X.1) y se mantuvieron en hielo. Se colocó un embrión en una caja con silicón bajo un microscopio estereoscópico, se le retiró la cabeza y se le colocó en posición semidorsal, se abrió con microtijeras por la zona dorsal hasta que se observó claramente la cadena de ganglios, se cortó la unión entre los ganglios dorsales y los ventrales, se tomó cada ganglio dorsal con pinzas de relojero y se colocaron en un tubo Falcon con solución Ringer. Este procedimiento se repitió para la obtención de ganglios de cada uno de los embriones.

V.II.3 Disgregación de ganglios de la raíz dorsal

Los ganglios que se obtuvieron se centrifugaron a 1000 rpm x 3 minutos, se retiró la solución Ringer y se agregó una mezcla de tripsina-EDTA 0.25 mg/mL (2mL por aproximadamente 160 ganglios) previamente calentada a 37°C. Se incubó a 37°C por 50 minutos, se agregó 5 mL de medio de cultivo GRD y se resuspendió una vez con una pipeta. Se centrifugó a 1000 rpm x 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo GRD, se resuspendió una vez con pipeta y tres veces con pipeta Pasteur y posterior a esto se centrifugó nuevamente a 1000 rpm x 3 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadieron los 3 mL necesarios para resuspender el botón de células y se adicionó NGF (100 ng/mL). Estas neuronas disgregadas se cultivaron en los cubreobjetos con geles obtenidos en la metodología V.II.1.3, se sembraron a una densidad de 1.5 galglios por cubreobjetos y se incubaron por 24 h a 37°C, 5% CO₂.

V.II.4 Ensayo de colapso

Después de 24 h de incubación, se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo GRD (Ver anexo X.2) fresco con 5 ng/mL de NGF y se incubó por 40 minutos. Al término de este tiempo se añadió sema 3A-Fc al medio de cultivo para una concentración final de 500 ng/mL. Como control negativo se mantuvieron los cultivos en el medio con NGF. El colapso de los conos de crecimiento se analizó con un microscopio invertido con contraste de fases y se obtuvieron micrografías a los tiempos post adición de Sema 3A-Fc: 0', 15', 30' y 45'.

V.II.5 Cultivo de la Línea celular 3T3

Fibroblastos de la línea celular NIH-3T3 se sembraron en caja de cultivo de 10 cm en medio de cultivo para fibroblastos (Ver anexo X.2), a una densidad de 0.5×10^6 células y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 3 días.

Al tercer día se retiró el medio de cultivo, se lavó la caja con PBS 1X, se añadió tripsina-EDTA (0.25mg/ml), y se incubó 37°C por 5 minutos; al término de

este tiempo se observó en el microscopio invertido para verificar que todas las células se hubieran despegado de la caja de cultivo. Se les adicionó medio de cultivo y se lavó la caja tres veces, el medio con las células se colocó en un tubo Falcon, se tomó una alícuota de las células para contarlas en la cámara de Neubauer y el tubo Falcon se centrifugó a 1000 rpm X 5 minutos. Al término de este tiempo se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con la cantidad requerida de medio de cultivo para sembrar 5,000 células en cada cubreobjetos con geles de distinta rigidez, previamente elaborados como se mencionó en el apartado V.II.1.3.

V.II.6 Inmunotinción

A los cultivos de GRD en los cubreobjetos se les adicionó PFA al 7% en una proporción 1:1 con el medio de cultivo en el que se encontraban, se incubó por 10 minutos a 37°C, posteriormente se retiró el PFA y se añadió PFA al 3.5% por 10 minutos más a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y se procedió a realizar la inmunotinción. Los cultivos se incubaron con anti- β -Tubulina diluido 1:100 en suero de cabra 1% / Triton X-100 0.1% / PBS1X, o anti-Vimentina diluido 1:50 en Suero de caballo 1% / Triton X-100 0.1% / PBS1X y se incubó durante toda una noche a 4°C, al término de este tiempo se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS1X y se incubó 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti- IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa 488 en el caso de la inmunotinción para tubulina, y con un anticuerpo anti IgG de cabra conjugado al mismo fluoróforo en el caso de la inmunotinción para vimentina, con una dilución 1:600 en PBS 1X. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos sobre una gota de medio de montaje y se observaron en un Microscopio Confocal (Nikon) con el cual se tomaron micrográficas para posteriormente utilizarlas en la medición y análisis del crecimiento axonal y morfología celular.

V.II.7 Tinción de Citoesqueleto

Los cubreobjetos con el cultivo de neuronas GRD previamente fijados en PFA y lavados con PBS1X como se mencionó anteriormente, se incubaron con faloidina-TRITC en una dilución 1:300 en Triton X-100 al 0.1% en PBS 1x. Se incubó durante 30 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno, teniendo el cuidado de eliminar la faloidina de manera adecuada dada su alta toxicidad. Al término de esto, se montó en portaobjetos y se observó en Microscopía confocal, se obtuvieron micrografías que posteriormente fueron utilizadas para medir el área de los conos de crecimiento.

V.II.8 Mediciones y tratamiento estadístico de los datos.

Se utilizaron las micrografías previamente obtenidas de los diferentes cultivos y se midieron los siguientes parámetros: perímetro de los fibroblastos, longitud de axones y área de conos de crecimiento, utilizando el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.), previa calibración de la imagen para obtener el equivalente de pixeles en micrómetros para cada micrografía.

Para cuantificar el efecto de colapso se obtuvo el porcentaje de disminución de los filopodios o el porcentaje de la disminución en el área de los conos de crecimiento usando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de disminución de filopodios} = \left(\frac{(\# \text{ de filopodios al } t=0' - \# \text{ de filopodios al } t= 45')}{\# \text{ de filopodios al } t=0'} \right) \left(100 \right)$$

$$\% \text{ de disminución del area} = \left(\frac{(\text{Área de filopodios al } t=0' - \text{Área de filopodios al } t= 45')}{\text{Área de filopodios al } t=0'} \right) \left(100 \right)$$

Los datos obtenidos de los experimentos por triplicado fueron analizados utilizando una comparación de medias mediante la prueba t-student.

VI. RESULTADOS

VI.1 Estandarización del cultivo de células en geles de poliacrilamida recubiertos con colágena.

Para poder analizar el efecto de la rigidez del sustrato en la respuesta a la semaforina 3A recombinante en neuronas de GRD, primeramente se estandarizó el método de elaboración de sustratos de acrilamida-bisacrilamida en los que la rigidez puede variarse según las concentraciones de ambos componentes (Wang y Pelham, 1998), las concentraciones usadas fueron las previamente reportadas para obtener geles con un grado de rigidez entre 0.15 kPa y 40.4 kPa según las mediciones obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica (Engler y col., 2006).

Una vez obtenidos los geles éstos fueron recubiertos con colágena para obtener un sustrato permisivo para la adhesión y crecimiento celular. Previamente se reportó que la rigidez del sustrato determina la morfología, el grado de extensión, así como la presencia de fibras de estrés, en fibroblastos NIH-3T3 (Pelham y Wang, 1997); de manera que mientras más rígido es el sustrato más extendidas se encuentran las células y contienen mayor cantidad de fibras de estrés. Dado lo anterior, para comprobar la eficiencia en la elaboración de los geles de poliacrilamida primeramente se cultivaron fibroblastos NIH-3T3 sobre geles de poliacrilamida recubiertos con colágena.

Se elaboraron diferentes grados de rigidez, los cuales fueron de 0.15 kPa, 0.32 kPa, 3.43 kPa y 40.4 kPa, se sembraron los fibroblastos y se incubaron por 24hrs. Los geles fijados con PFA 3.5% se sometieron a inmunohistoquímica para vimentina, un filamento intermedio que forma parte del citoesqueleto y que nos permite apreciar la morfología celular, y se capturaron micrografías en microscopía confocal. Se observó que en el sustrato menos rígido (0.15kPa) las células tenían una morfología redondeada y que conforme aumentaba la rigidez las células se

extendían más sobre el sustrato (Figura 8A), al medir el perímetro de las células NIH-3T3 sobre los sustratos de diferente rigidez, se observó un aumento del perímetro conforme se incrementó la rigidez (Figura 8B). Al realizar la prueba t-student para comparar si existían diferencias entre las medias obtenidas en cada condición, se mostró que hay diferencias significativa entre los perímetros de los fibroblastos NIH-3T3 en los diferentes grados de rigidez (* $p < 0.05$, $n = 3$). Estos resultados confirman que el proceso de elaboración de geles de poliacrilamida con diferente rigidez es correcto y que se obtienen sustratos que permiten modular el crecimiento celular.

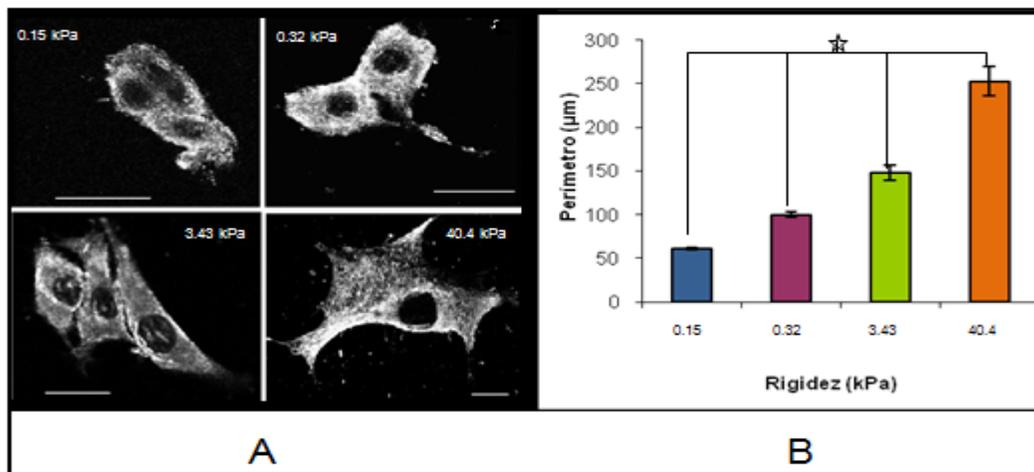


Figura 8. Los fibroblastos NIH-3T3 presentan diferentes grados de extensión sobre geles de poliacrilamida con diferentes grados de rigidez. (A) Fibroblastos de la línea celular NIH-3T3 fueron cultivados sobre geles de acrilamida-bisacrilamida con diferente grado de rigidez y teñidos con un anticuerpo anti-vimentina. Se observa que las células se extienden más conforme aumenta la rigidez del sustrato. (B) El perímetro celular fue medido y graficado para cada grado de rigidez. Se muestra que al incrementar la rigidez del sustrato, señalado en kilopascales (kPa), el perímetro de los fibroblastos aumenta. (* t-student $p < 0.05$, $n = 30$). Barra de calibración = $100 \mu\text{m}$.

Una vez estandarizada la metodología de elaboración de geles de poliacrilamida, se prosiguió a realizar los cultivos de neuronas disgregadas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de embriones de E-14.5 sobre los geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida fueron recubiertos con poli-L-ornithina (PLO) y colágena, ya que previamente se había estandarizado en el laboratorio en

el que se realizó esta tesis, el cultivo de GRD sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con PLO y colágena, y se había observado que el cultivo en ausencia de PLO produce un deficiente crecimiento de las neuronas y un aumento de células gliales y fibroblastos. Los GRD fueron obtenidos, parcialmente disgregados y sembrados sobre geles de poliacrilamida con los diferentes grados de rigidez anteriormente mencionados. Después de 24 h de cultivo se fijaron con PFA y se tiñeron con falloidina-TRITC. Se obtuvieron micrografías en microscopía confocal, en las cuales se midió la longitud de los axones y el área de los conos de crecimiento.

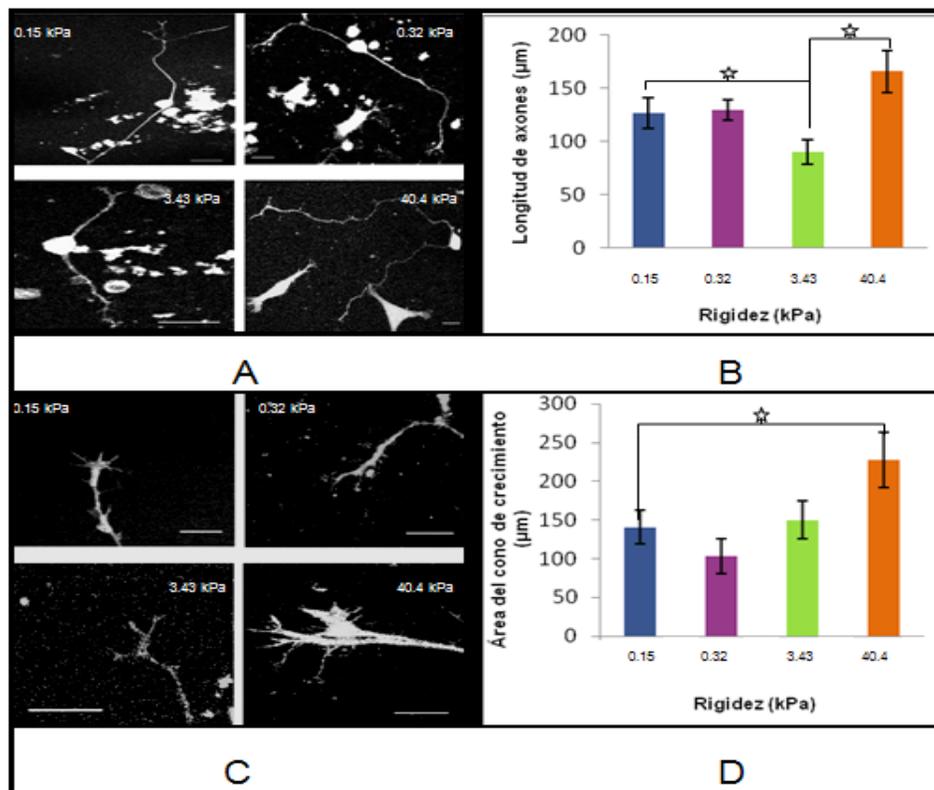


Figura 9. La rigidez del sustrato determina el crecimiento axonal y el área de los conos de crecimiento. GRD obtenidos de embriones de E-14.5, fueron disgregados, cultivadas en sustratos con diferente grado de rigidez y teñidos con falloidina-TRITC (A y C). En las micrografías obtenidas se midió la longitud de los axones (B) y el área de los conos de crecimiento (D). Observamos que al incrementar la rigidez del sustrato también hay un incremento de la longitud de los axones. También se observó un aumento en el área de los conos de crecimientos conforme aumenta la rigidez del sustrato, siendo la diferencia significativa entre el gel de 0.15kPA con el de 40.4kPA. (* t-student $p < 0.05$, $n = 30$). Barras de calibración = 20µm

Se observó que al incrementar el grado de rigidez del sustrato también aumenta la longitud del axón (Figura 9A, B) de manera que en el sustrato más rígido hay un 34% más de crecimiento en comparación con el gel más suave, siendo significativa la diferencia entre los axones de los geles de rigidez de 0.15kPa con los de 3.43kPa y los de 40.4kPa (Figura 9B) (* t-student $p < 0.05$, $n = 3$). Por otra parte se observó que también existe una relación entre el grado de rigidez y el área del cono de crecimiento, entre más rígido es el sustrato mayor extensión presentan los cono de crecimiento (Figura 9C), de manera que la diferencia en el área del cono de crecimiento entre el gel de 0.15kPA y el de 40.4kPA fue significativa (*t-student $p < 0.05$, $n = 3$) (Figura 9D).

VI.2 Ensayo de colapso en conos de crecimiento de neuronas disgregadas de los ganglios de la raíz dorsal.

Una vez caracterizado el crecimiento axonal y la morfología de los conos de crecimiento de neuronas GRD sobre sustratos con diferente rigidez, se analizó si la rigidez del sustrato afecta la respuesta de colapso de cono de crecimiento ejercido por la Sema 3A-Fc, efecto que ha sido ampliamente caracterizada con anterioridad en neuronas GRD crecidas sobre vidrio (Luo y col., 1993; Aizawa y col., 2001; Brown y col., 2009; Brown y Bridgman, 2009). Como control positivo del ensayo de colapso se utilizaron cultivos de neuronas GRD sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con PLO y colágena. Se realizó el ensayo de colapso con Sema3A recombinante, una proteína quimérica que se encuentra unida al fragmento Fc de la inmunoglobulina humana IgG (Sema 3A-Fc), según la metodología previamente reportada (Bridgman y col., 2001). Previo a la adición de Sema3A-Fc los cultivos se incubaron por 45 minutos con una concentración menor de NGF (5ng/ml) y posteriormente a uno de los cultivos se le adicionó Sema3A-Fc (500ng/ml) directamente en el medio de cultivo, y el otro cultivo (control negativo) permaneció en el medio sin semaforina. Previamente se había probado en el control negativo la adición del fragmento Fc de la inmunoglobulina humana (Ig-Fc) a una concentración semejante a la añadida para la semaforina recombinante sin

observarse ningún efecto de colapso, por lo que se omitió la adición de la inmunoglobulina en los controles negativos. Los cultivos fueron observados bajo microscopía de contraste de fases y se obtuvieron micrografías a los tiempos (t) t=0', t=15', t=30' y t=45', para monitorear el colapso de los conos de crecimiento. Para los geles de poliacrilamida se utilizaron los geles con los diferentes grados de rigidez previamente caracterizados de 0.15kPa, 0.32kPa, 3.43kPa y 40.4kPa.

Para analizar el efecto de la sema3A-Fc en el colapso de los conos de crecimiento se evaluaron dos parámetros: 1) el número de filopodios por cono de crecimiento y 2) el área del cono de crecimiento. Se consideró como colapso una disminución mayor al 50% en el número de filopodios y en el área del cono de crecimiento (Brown y col., 2009).

Los resultados observados en los ensayos de colapso con Sema 3A-Fc fueron los siguientes:

En los cultivos de neuronas GRD sobre cubreobjetos de vidrio; la adición de Sema 3A-Fc produjo la disminución del número de filopodios en un 68.8% (Figura 10B) (Figura 11), y una disminución del área de los conos de crecimiento en un 47.8% a los 45 min de añadida la semaforina (Figura 10B) (Figura 12). Mientras que en el control negativo se observó un porcentaje muy pequeño en la disminución de los filopodios (7.5%) (Figura 10A) (Figura 11) y un aumento del área del cono de crecimiento (74.9%) (Figura 10A) (Figura 12). En el caso de los cultivo tratado con Sema 3A-Fc se observó incluso en algunos casos la retracción del axón (Figura 10B).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 0.15kPa; El control negativo (Figura 10C) no presentó colapso en el cono de crecimiento, al igual que en el ensayo con Sema 3A-Fc (Figura 10D). Se observó incluso un ligero aumento en el porcentaje de filopodios (10.4%) (Figura 11), y en el área de los

conos de crecimiento (7.58%), aunque esta última no en la misma proporción que la observada para el control negativo (37.67%) (Figura 12).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 0.32kPa; tampoco se observó un efecto de colapso por Sema 3A-Fc; El control negativo (Figura 10E) no presentó un cambio significativo en el número de filopodios (14.8% de disminución) al igual que en los cultivos tratados con Sema 3A-Fc (12.5% de disminución) (Figura 10F) (Figura 11). En el caso del área del cono de crecimiento se observó una pequeña disminución en el área de los cono de crecimiento en cultivos expuestos a Sema 3A-Fc (28.23%), aunque está no fue semejante a la observada para los cultivos sobre vidrio (Figura 12). En el caso de los cultivos sin semaforina se observó un aumento en el área del cono de crecimiento (Figura 12).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 3.43kPa; se observó una tendencia a la disminución del número de filopodios en los cultivos tratados con Sema 3A-Fc (23.6%) en comparación con el gel anterior, así como en el área de los conos de crecimiento (Figura 10J); sin embargo el aumento en el porcentaje de cambio no fue suficiente como para ser considerado como colapso (Figura 11, 12), aunque al comparar las medias, éstas no fueron significativamente diferentes al experimento en vidrio. El control negativo (Figura 10G) no presentó tampoco efecto de colapso, e incluso se observó un aumento en el número de filopodios (Fig. 11, 12).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 40.4kPa; se observó una tendencia a la disminución del número de filopodios en los cultivos tratados con Sema 3A-Fc (47.7%) en comparación con el gel anterior, así como en el área de los conos de crecimiento (25.15%) (Fig. 10H); sin embargo el aumento en el porcentaje de cambio no fue suficiente como para ser considerado como colapso (Figura 11, 12), aunque como en el caso anterior, la comparación estadística de medias mostró que no existe una diferencia con el experimento

sobre vidrio. El control negativo (Figura 10G) no presentó efecto de colapso (Figura 11, 12).

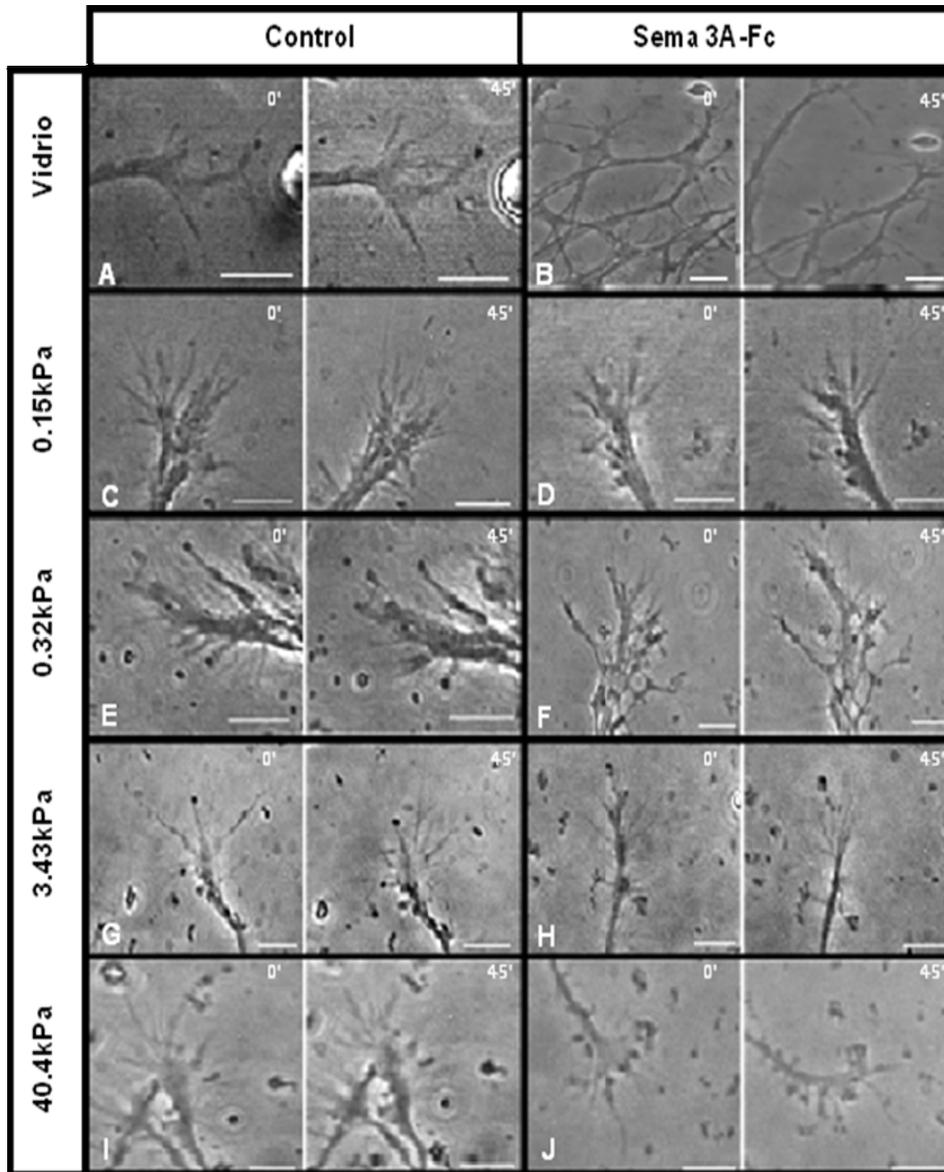


Figura10. Efecto de la Sema 3A-Fc en neuronas GRD cultivadas sobre geles de poliacrilamida con diferente rigidez. Se realizaron cultivos de neuronas GRD sobre cubreobjetos de vidrio o sobre geles de poliacrilamida recubiertos ambos con PLO y colágena y con diferentes grados de rigidez. A los cultivos se les realizó el ensayo de colapso de conos de crecimiento con Sema 3A-Fc (B, D, F, H y J) y se les tomo micrografías a diferentes tiempos, aquí se muestran las micrografías al t=0' y t=45'. Como control negativo se mantuvieron los cultivos en medio basal con NGF (A, C, E, G, I). Se observó que en los sustratos más blandos no hay un efecto de colapso y conforme aumenta la rigidez incrementa el colapso de los conos de crecimiento. Barras de calibración=10µm.

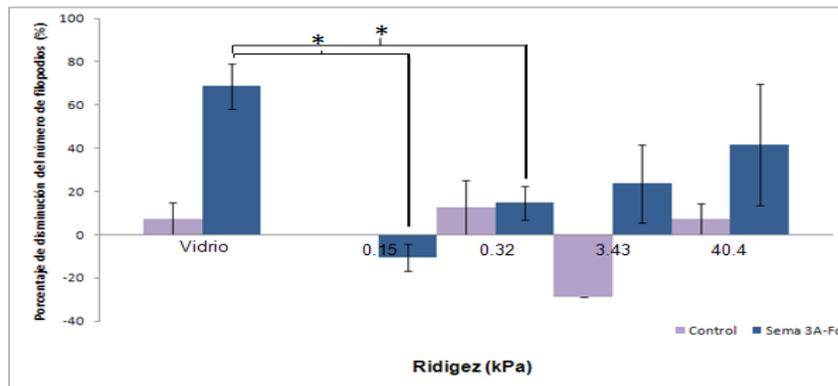


Figura 11. Cuantificación del efecto de colapso mediante la disminución en el número de filopodios por cono de crecimiento. El porcentaje de la disminución del número de filopodios por cono de crecimiento de neuronas GRD, cultivadas en sustratos con diferente grado de rigidez fue medido en micrografías de contraste de fases. Se observa que en los cultivos control no expuestos a Sema 3A-Fc no hay una disminución significativa del número de filopodios. La adición de la Sema 3A-Fc, produjo el colapso de un gran porcentaje (68.8%) de los filopodios en los cultivos en vidrio, mientras que en los sustratos mas blandos de poliacrilamida hay una inhibición del colapso. El porcentaje de colapso de conos de crecimiento tiene una diferencia significativa entre el cultivo en cubreobjetos con el cultivo en gel de 0.15kPa y el gel de 0.32kPa (* t-student $p < 0.05$, $n = 8$).

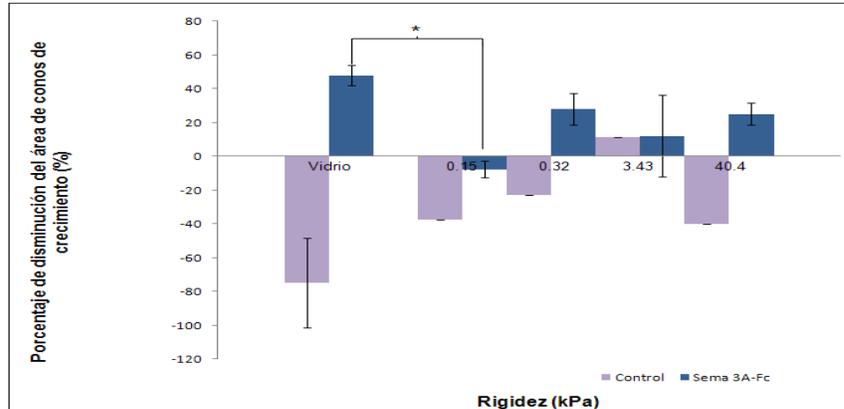


Figura 12. Cuantificación del efecto de colapso mediante la disminución en el área del cono de crecimiento. El porcentaje de cambio del área de los conos de crecimiento de neuronas GRD, cultivadas en sustratos con diferente grado de rigidez fue medido en micrografías de contraste de fases. Los controles sin semaforina no presentaron una disminución del área de cono de crecimiento y existe por el contrario una tendencia al aumento conforme incrementa la rigidez. En el caso de los cultivos tratados con Sema 3A-Fc, se observó una inhibición del efecto de colapso conforme disminuye la rigidez e incluso un aumento en el área del cono de crecimiento (0.15kPa). Se observó también que conforme la rigidez del sustrato aumenta, el porcentaje de colapso en los conos de crecimiento también aumenta. Aunque en todos los casos el porcentaje de disminución del área es menor al 30%.

VII. DISCUSIÓN

En la presente investigación mostramos la manera en que una de las propiedades mecánicas del sustrato como es la rigidez tiene efectos importantes en neuronas GRD sobre el crecimiento axonal, el área de cono de crecimiento y la respuesta de colapso ante la semaforina 3A. Para llevar a cabo este estudio se eligió un modelo experimental que consiste en el uso de geles de poliacrilamida recubiertos con componentes de matriz extracelular.

Este modelo es uno de los mejor caracterizados (Wang y Pelham, 1998; Dembo y Wang, 1999) y permite modificar parámetros físicos como la flexibilidad sin afectar sus propiedades químicas tales como la concentración de proteínas que confieren la adhesión celular. El uso de sustratos de poliacrilamida nos permitió obtener diferentes grados de rigidez del sustrato al cambiar las proporciones de acrilamida-bisacrilamida con la finalidad de monitorear el comportamiento de las células ante la presencia de una señal mecánica enviada del sustrato a la célula (Guo y col., 2006). Se entiende como rigidez la capacidad de un material de soportar un esfuerzo sin adquirir deformación, la deformación observada cuando se aplica una carga se mide en pascales (Pa, $1\text{Pa}=1\text{N}/\text{m}^2$). La rigidez de un material isotrópico es aquel en el que las propiedades son la mismas en todas direcciones, sin embargo muchos materiales poliméricos y la mayoría de los tejidos biológicos son anisotrópicos es decir que no poseen las misma propiedades en todas direcciones, por ejemplo los ligamentos son más resistentes y rígidos en la dirección de las fibras (longitudinal) que en la dirección transversal (Sastre y col., 2004). Dada la importancia de las propiedades mencionadas en la morfología, crecimiento e incluso diferenciación celular (Discher y col., 2005), se han comenzado a caracterizar estos parámetros en diferentes tejidos.

La resistencia intrínseca de un tejido al aplicar estrés (fuerza/área) es medido mediante el modulo elástico (E), que se obtiene aplicando una fuerza y midiendo el cambio en longitud de un tejido, o mediante microscopía de fuerza

atómica usando micro marcadores que aplican una fuerza micrométrica controlada (Sastre y col., 2004; Discher y col., 2005). En general se ha mostrado que el cerebro es uno de los tejidos más blandos del cuerpo con un módulo elástico de alrededor de 0.5kPa (Elkin y Morrison, 2007), comparado con el músculo (10^4 Pa) (Engler y col., 2006; Discher y col., 2005) o el hueso (10^9 - 10^{10} Pa) (Discher y col., 2005). Se ha reportado que el cerebro de ratas adultas tiene un módulo elástico que varía entre 0.125 y 0.330 kPa (Georges y col., 2006). En la presente tesis la rigidez seleccionada para los geles fue dentro de un rango de 0.15kPa y 40.4kPa, de manera que los sustratos con una rigidez de 0.15kPa y 0.32kPa simulan la rigidez presente en el cerebro, y sustratos más rígidos están cercanos a lo reportado para tejido muscular que varían entre 9 y 21kPa (Georges y col., 2006).

La estandarización de la respuesta ante las señales mecánicas generadas por los diferentes grados de rigidez, usando fibroblastos de la línea celular NIH-3T3, mostró resultados semejantes a los previamente reportados (Wang y Pelham, 1998; Dembo y Wang, 1999), y son consistentes con los mostrados por Guo y col (2006) donde observaron que los fibroblastos son redondeados y compactos en sustratos suaves (2.68kPa). Lo anterior debido a que las adhesiones son débiles y se retraen con facilidad (Lo y col., 2000), favoreciendo una migración más rápida en busca de un sustrato más rígido (durotaxis) (Dembo y Wang., 1999). Por el contrario en sustratos más rígidos los fibroblastos tienden a presentar haptotaxis la cual está mediada por el incremento de miosina II, que al interaccionar con actina produce fuerzas de tensión que aumentan la tracción en el lamelopodio de los fibroblastos (Askt, 2009). También se presentan adhesiones más fuertes con el sustrato debido a un incremento en la expresión de integrina $\beta 5$ (Dembo y Wang., 1999).

Ya que se observaron diferencias significativas entre los cultivos de fibroblastos sobre sustratos con diferente grado de rigidez, proseguimos a observar cómo se modifica el comportamiento de las neuronas GRD en los sustratos anteriormente mencionados recubiertos con poli-L-ornitina (PLO) y colágena. La

adición de PLO se debió a que se ha observado una preferencia de los axones a sustratos con PLO-colágena, ya que la PLO aumenta la estabilidad de las adhesiones (Letourneau, 1995). Se observó que al aumentar la rigidez, tanto la longitud de los axones como el área de los conos de crecimiento se incrementaron. Estos resultados difieren con los observados por Flanagan y col. (2002), en los que reportan que conforme incrementa la rigidez del sustrato disminuye la longitud de los axones en geles de una variación entre 0.150 y 1.65kPa. Esta diferencia puede deberse al tipo de adhesión y a que el gel de poliacrilamida lo recubrieron con poli-D-lisina la cual mantiene una adhesión al sustrato por cargas electrostáticas.

En los resultados obtenidos en esta investigación las neuronas además de tener una adhesión por cargas provista por la PLO, presentan una adhesión mediada por integrinas (receptores a colágena), las cual puede proveer adhesiones más estables y podría ser reguladas por la consistencia del sustrato. Se ha reportado que en sustratos suaves (~ 1kPa) los complejos de adhesión mediados por integrinas son difusos y muy dinámicos, mientras que en sustratos más rígidos (~30-100kPa) las células forman adhesiones mayores y más estables (Pelham y Wang, 1997). La presencia de sitios de adhesión más estables podría explicar la mayor extensión de los conos de crecimiento, una mayor tracción sobre el sustrato y probablemente una elongación mayor de los axones.

La diferencia significativa entre el sustrato de 3.43kPa con el de 40.4kPa es consistentes con el trabajo realizado por Jiang y col. (2008) en el cual realizaron cultivos en geles de entrecruzamiento de DNA con diferentes grados de rigidez (6.6-30kPa) y observaron un decremento del 25% de la longitud axonal en geles con una rigidez menor a 10kPa. En los geles de 0.15kPa y 0.32kPa no observamos una diferencia significativa, esto se puede atribuir a que neuronas GRD crecen *in vivo* en sustratos con un grado de rigidez que varía entre 0.125 y 0.330kPa, lo que sugiere que esta variación puede no ser suficiente para determinar cambios en el comportamiento neuronal.

Al modificar la rigidez del sustrato se observó que también se modula el comportamiento de las neuronas GRD, por esta razón procedimos a observar que efecto tendrían la semaforina 3A recombinante en neuronas crecidas en diferentes sustratos. Para esto se utilizó como control positivo un cultivo de neuronas GRD sobre cubreobjetos recubierto con PLO y colágena, el cual mostró un colapso del 68.8% en los conos de crecimiento, por otra vez la retracción del axón. Esto se puede atribuir a la concentración de Semaforina 3A-Fc empleada (500ng/ml), ya que recientemente Brown y col. (2009) describieron que a concentraciones menores a 600ng/mL los conos de crecimiento de neuronas GRD sólo presentan colapso y no retracción del cono de crecimiento.

La modulación de la rigidez del sustrato influyó en la respuesta de Sema 3A, ya que en los sustratos de 0.15kPa y 0.32kPa no se observó el colapso en los conos de crecimiento; además se observó que conforme incrementaba la rigidez aumentaba la respuesta a la semaforina. Cabe mencionar que, aunque en ninguno de los cultivos sobre geles de poliacrilamida se observó claramente el colapso de los conos de crecimiento según el parámetro establecido, al comparar la rigidez de 0.15kPa con la de 40.4kPa sí se mostró una mayor respuesta en el sustrato más rígido. Mientras más rígido es el sustrato mayor formación de adhesiones y mayor activación de integrinas (Discher y col., 2005), lo anterior hace pensar que estos dos factores podrían inhibir el efecto de colapso de Sema 3A como previamente han mostrado Brown y col. (2009); quienes al aumentar la cantidad de laminina en el sustrato y por tanto los sitios de adhesión y activación de integrinas, previenen el colapso inducido por sema3A.

También se ha reportado que la rigidez del sustrato induce la formación de fibras de actina y activa la contractilidad celular, dos elementos clave en la respuesta de colapso a Sema 3A (Brown y col., 2009). Por otra parte en un sustrato blando las fibras de estrés y la contractilidad son inhibidas (Discher y col., 2005), lo cual podría favorecer la falta de colapso ante la presencia de sema3A. Lo anterior muestra que el mecanismo por el cual la rigidez del sustrato esta modulando la

respuesta de colapso es compleja y podrían residir en un fino balance entre la adhesión y la contractilidad celular.

Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que el comportamiento de las neuronas *in situ* ante Sema 3A podría variar con respecto a los estudios *in vitro*, de manera que las neuronas podrían modificar su respuesta dependiendo de las propiedades mecánicas del tejido. Por ejemplo en el tejido normal o ante una cicatriz glial en la que se observa que Sema 3A impide la regeneración y el crecimiento de los axones (Pasterkamp y Verhaagen, 2000).

Estudio de este tipo serán relevantes también para el diseño de biomateriales con propiedades mecánicas adecuadas que permitan la regeneración neuronal y la respuesta ante los factores presentes en un proceso de cicatrización.

VIII CONCLUSIONES

- La rigidez del sustrato modula la expansión de fibroblastos NIH-3T3 sobre el sustrato.
- La rigidez del sustrato determina el área de los conos de crecimiento y el crecimiento axonal de neuronas de GRD, a mayor rigidez mayor área del cono de crecimiento y mayor longitud axonal.
- La rigidez del sustrato determina el efecto de colapso por la Sema 3A-FC en conos de crecimiento de neuronas de GRD, a mayor rigidez mayor efecto de colapso.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., Yahara, I. 2001. Phosphorylation of cofilin by LIMkinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nature neuroscience*. Vol. 4: 367-373.

Anda, F., Pollarolo, G., Silva, D., Camoletto, P., Feiguin, F., Dotti, C. 2005. Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*. Vol. 436: 704-708.

Anda, F., Dotti, C. 2008. Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *Journal of cell science*. Vol. 121: 178-85.

Antonini, A., Stryker, M. 1993. Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science*. Vol. 260: 1819-1821.

Alzola, R. 2002. www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Documentos/Tejidoepitelial.pdf.

Artigiani, S., Comoglio, P., Tamagnone, L. 1999. Plexins, Semaphorins, and Scatter Factor Receptors: A Common Root for Cell Guidance Signals?. *International union of biochemistry and molecular biology life*. Vol. 48: 477-482

Askt, J. 2009 Physical forces acting in and around cells are fast and making waves in the world of molecular biology. *The scientist*. Vol. 23: 26-33

Ávila, H., Barrio, D., Zhang, R. 2007. Modelando el crecimiento de neuritas. *Revista especializada en ciencias químico biológicas*. Vol. 10: 5-13.

Bridgman, P., Dave, S., Ansnes, C., Tulio, A., Adelstein, R. 2001. Myosin IIB is required for growth cone motility. *The journal of neuroscience*. Vol. 21: 6159-6169.

Brownn, J., Bridgman, P. 2009. The disruption of the cytoskeleton during semaphoring 3A induced growth cone collapse correlates with differences in actin organization and associated binding proteins. *Developmental neurobiology* Vol. 69: 633-646.

Brown, J., Wysolmerski, R., Bridgman, P. 2009. Dorsal root ganglion neurons react to semaphoring 3A application through a biphasic response that requires multiple myosin II isoforms. *Molecular biology of the cell*. Vol. 20: 1167-1179.

Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R., Leung, T., Lim, L., Hall, C. 2004. Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its

target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A induced growth-cone collapse. *Journal of neuroscience*. Vol. 24: 8994-9004.

Campbell, D., Holt, C. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*. Vol. 32: 1013-1026.

Castellani, V., Angelis, E., Kenwrick, S., Rougon, G. 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *The European molecular biology organization*. Vol. 21: 6348-6357

Chan, C., Odde, D. 2008. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*. Vol. 322: 1687-1691.

Chang, R., College, W. 2002. Química. 7^a. ed, Mc Graw Hill, México: 156.

Dembo, M., Wang, Y-L. 1999. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical journal*. Vol. 76: 2307,2313-2314.

Dent, E., Gertler, F. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*. Vol. 40: 209-227.

Dent, E., Tang, F., Kalil, K. 2003 Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist*. Vol. 5: 343-53.

Dickson, B. 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*. Vol. 6: 1959-1963.

Discher, D., Janmey, P., Wang, Y-L. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. Vol. 310: 1139-1143.

Eickholt, B., Walsh, F., Doherty, P. 2002. An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *The journal of cell biology*. Vol. 157: 211-217.

Elkin, B., Morrison, B. 2007. Region-specific tolerance criteria for the living brain. *Stapp car crash journal*. Vol. 51: 127-138.

Engler, A., Sen, S., Sweeney, H., Discher, E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. Vol. 126: 677-689.

Fan, J., Mansfield, S., Redmond, T., Gordon-Weeks, P., Raper, J. 1993. The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *The journal of cell biology*. Vol. 121: 867-878.

Fiore, R., Puschel, A. 2003. The function of semaphorins during nervous system development. *Frontiers in bioscience*. Vol. 8: 484-499.

Flanagan, L., Ju, Y-E., Marg, B., Osterfield, M., Janmey, P. 2002. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport*. Vol. 20: 2411-2415.

Fournier, A., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, G., Strittmatter, S. 2000. Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *The journal of cell biology*. Vol. 149: 411-422.

Georges, P., Miller, W., Meaney, D., Sawyer, E., Janmey, P. 2006. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophysical journal*. Vol. 90: 3012-3018.

Gherardi, E., Love, C., Esnouf, R., Jones, E. 2004. The sema domain. *Current opinion in structural biology*. Vol. 14: 669-678.

Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., Strittmatter, S. 1995. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature*. Vol. 376: 509-514.

Guijarro, P. 2006. Función de Netrina y semaforinas secretables en la guía neuronal y axonal en el hipocampo y el cerebelo. Barcelona. Universidad de Barcelona. Tesis para obtener el título de Doctorado en Biología Celular. 4-37.

Guo, W-H., Frey, M., Burnham, N., Wang, Y-L. 2006. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophysical journal*. Vol. 90: 2213-2220.

Guyton, A., Hall, J. 2001. Tratado de fisiología Médica. 10ª. ed., Mc. Graw. Hill, México: 621-626, 751-753.

Jiang, F., Yurke, B., Firestein, B., Langrana, N. 2008. Neurite outgrowth on a DNA crosslinked hydrogel with tunable stiffnesses. *Annals of biomedical engineering*. Vol. 36: 1565-1579.

Kalil, K., Szebenyi, G., Dent, E. 2000. Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *Journal of neurobiology*. Vol. 44: 145-158.

Kolodkin, A., Matthes, D., Goodman, S. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*. Vol. 75: 1389-1399.

Kolodkin, A., Leventgood, D., Rowe, E., Tai, Y-T., Giger, R., Ginty, D. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*. Vol. 90: 753-754.

Kruger, R., Aurandt, J., Guan, K. 2005. Semaphorins command cells to move. *Nature reviews*. Vol. 6: 789-800.

Lauffenburger, D., Wells, A. 2001. Getting a grip: new insights for cell adhesion and traction. *Nature cell biology*. Vol. 3: 110-112.

Letourneau, P., 1975. Cell to substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Developmental biology*. Vol. 44: 92-101.

Lo, C-M., Wang, H-B., Dembo, M., Wang, Y-L. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*. Vol. 79: 144-152.

Luo, Y., Raible, D., Raper, J. 1993. Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*. Vol. 75: 217-227

Martinez, M., Quiroga, N., Castellanos, J. 2000. Subpoblaciones neuronales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomédica*. Vol. 20: 248-249.

McKinley, M., O'Loughlin, D. 2006. academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Nervous%20System.htm

Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., Yanagi, S. 2002. Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *The European molecular biology organization*. Vol. 21: 3274-3285.

Negishi, M., Oinuma, I., Katoh, H. 2005. Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cellular and molecular life sciences*. Vol. 62: 1363-1371.

Palay, S., Sotelo, C., Orkand, P. 1968. The axon hillock and the initial segment. *The journal of cell biology*. Vol. 38: 193-201.

Pasterkamp, R., Verhaagen, J. 2000. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain research reviews*. Vol. 35: 36-54.

Pelham, J., Wang, Y-L. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 94: 13661-13665.

Polleux, F., Morrow, T., Ghosh, A. 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*. Vol. 404: 567-73.

Ramón, Cajal, S. 1891. Comunicación acerca de la significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de la sustancia gris. *Revista de ciencias médicas de Barcelona*. Vol. 17: 671-679, 715-723.

Ramón, Cajal, S. 1897. Leyes de la morfología y el dinamismo de las células nerviosas. *Revista micrográfica*. Vol. 2: 1-28.

Raper, J. 2000. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Current opinion in neurobiology*. Vol. 10: 88-94

Sastre, R., Aza, S., Román, J. 2004. *Biomateriales*. 2da. ed., Faenza Editrice Iberica, México: 151-171.

Silva, D., Medina, M., Zuloani, C., Nardo, A., Witke, W., Dotti, C. 2003. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *The Journal of cell biology*. Vol. 162: 1267-1279.

Silva, D., Dotti, C. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature reviews neuroscience*. Vol. 3: 694-704.

Silvera, L., Barrios, C., 2002. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud univorte*. Vol. 16: 9-16.

Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. 1998 Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, Vol. 281: 1515-1518.

Song, H., Poo, M. 1999. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Current opinion in neurobiology*. Vol. 9: 355-363.

Song, H., Poo, M. 2001. The cell biology of neuronal navigation. *Nature cell biology*, Vol. 3: 81-888.

Sundararaghavan, H., Monteiro, G., Firestein, B., Shreiber, D. 2008. Neurite growth in 3D collagen gels with gradients of mechanical properties. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 102: 632-643.

Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M., Goodman, C., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., Comoglio, P. 1999.

Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*. Vol. 99: 71-80.

Tamagnone, L., Comoglio, P. **2004**. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *The European molecular biology organization*. Vol. 5: 356-359.

Terman, J., Mao, T., Pasterkamp, R., Yu, H., Kolodkin, A. **2002**. MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell*. Vol. 109: 887-900.

Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. **1996**. The molecular biology of axon guidance. *Science*. Vol. 274: 1123-1133.

Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., Kikutani, H. **2005**. FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nature neuroscience*. Vol. 8: 1712-1719

Valdembri, D., Caswell, P., Anderson, K., Schwarz, J., König, I., Astanina, E., Caccavari, F., Norman, J., Humphries, M., Bussolino, F., Serini, G. **2009**. Neuropilin 1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *Plos biology*. Vol. 7: 115-132

Ventura, A., Pelicci, P. **2002**. Semaphorins: green light for redox signaling?. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. Vol. 155: 44.

Yeung, T., Georges, L., Flanagan, B., Marg, M., Ortiz, M., Funaki, N., Zahir, M., Weaver, V., Janmey, P. **2005**. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*. Vol. 60: 24-34.

Yu, W., Qiang, L., Solowska, J., Karabay, A., Korulr, S., Baas, P. **2008**. The Microtubule severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches. *Molecular Cell Biology*. Vol. 19: 1485-98.

Wang, Y-L., Pelham, R. **1998**. Preparation of flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods in enzymology*. Vol. 298: 489-496.

Wehrle, B., Imhif, B. **2002**. The inner of focal adhesions. *Trends in cell biology*. Vol. 12: 382-386.

Wolman, M., Liu, Y., Tawarayama, H., Shoji, W., Halloran, M. 2004. Repulsion and attraction of axons by semaphorin3D are mediated by different neuropilins in vivo. *The Journal of neuroscience*. Vol. 24: 8428-8435.

ANEXOS

Soluciones

a. Howard's Ringer (pH 7.2)

Reactivo	Para 1L
NaCl	7.2 g
CaCl ₂	0.17 g
KCl	0.37 g

b. PBS 10X (pH 7.3)

Reactivo	Para 1L
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g

c. PFA 3.5%

Reactivo	Para 1L
Paraformaldehido	35 g
PBS 10X	100 mL
NaOH 5N	1 mL

d. Colágena (0.2 mg/mL)

Reactivo	Para 1mL
Colágena tipo 1 (3 mg/mL)	66 µL

DMEM	934 μ L
10XMEM	2 μ L
NaOH 0.1N	2 μ L

Medios de cultivo

a. Medio de cultivo para fibroblastos

Reactivo	Para 250 mL
DMEM	225 mL
SFB	25 mL
Penicilina / Estreptomicina (10, 000 μ g /mL)	2.5 mL

b. Medio GRD

Reactivo	Para 50 mL
DMEM-F12	25 mL
Opti-MEM	69 mL
Glutamina (200mM)	1 mL
Penicilina/ Estreptomicina (10, 000 μ g/mL)	1 mL
SFB inactivado	0.5 mL
Glucosa 1M	3.5 mL

I. INTRODUCCIÓN

En México las lesiones a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC) se presentan en 200 de cada 100 mil personas. Tanto las lesiones como las enfermedades del cerebro y médula espinal han adquirido una enorme importancia a nivel social y económico. Las lesiones de médula espinal son el principal ejemplo de lesión del SNC ya que los axones del SNC maduro son incapaces de regenerarse espontáneamente tras una lesión.

Actualmente se piensa que la falta de regeneración axonal del SNC maduro es resultado del efecto combinado de diferentes factores, incluyendo la activación incompleta de los programas de crecimiento axonal tras la lesión y la generación de un ambiente inhibitorio para el crecimiento axonal en el SNC maduro.

Después de una lesión se forma tejido cicatrizal que tiene una composición particular tanto de células como de componentes de matriz extracelular, lo cual proporciona un sustrato diferente al que originalmente conformaba el tejido antes de la lesión. Así se generan cambios en la composición de proteínas y matriz extracelular y en las propiedades mecánicas del sustrato tales como su flexibilidad o rigidez.

Algunas de las proteínas inhibitorias presentes en el sitio de lesión son las llamadas Semaforinas (Sema); en específico Sema 3A restringe la regeneración axonal ya que produce inhibición de la proyección axonal o colapso en los conos de crecimiento y como consecuencia provoca la retracción del axón.

Sema 3A es expresada en el SNC adulto tras una lesión por fibroblastos que se infiltran al SNC procedentes de las meninges, contribuyendo a crear una barrera química en la cicatriz glial la cual tarda entre 7 y 10 días en formarse.

El efecto de Sema 3A se da a través de la regulación del citoesqueleto y de

la adhesión al sustrato, dos factores que también son modulados por las propiedades mecánicas del sustrato. Diversas evidencias han mostrado la importancia de las propiedades mecánicas del sustrato en la migración, formación de adhesiones celulares e incluso en el crecimiento de neuritas; sin embargo hasta el momento no se ha estudiado de que manera la rigidez del sustrato influye en la respuesta a factores que inhiben o promueven el crecimiento axonal, El presente trabajo tiene por objetivo estudiar el efecto inhibitorio de la proteína quimiotrópica Sema 3A sobre el crecimiento axonal de neuronas de ganglios de la raíz dorsal cultivadas en sustratos con diferentes grados de rigidez .

II. ANTECEDENTES

II.1 Sistema Nervioso.

El sistema nervioso es excepcional por la gran complejidad de los procesos mentales y las acciones de control que puede realizar (Guyton y Hall, 2001). Por ejemplo nuestros movimientos, las percepciones sensoriales de lo que ocurre a nuestro alrededor y la generación de una respuesta a ellas dependen de una compleja red de neuronas en nuestro sistema nervioso central y periférico (Ramón y Cajal, 1891) el cual recibe literalmente millones de datos de los distintos órganos de los sentidos.

El sistema nervioso está formado por más de cien mil millones de neuronas. Las señales de entrada (aférentes) llegan a la neurona a través de las sinapsis que establecen, sobre todo, las dendritas, aunque también el cuerpo celular. Según los distintos tipos de neuronas, el número de conexiones sinápticas que mantienen esas fibras de entrada oscila entre unos cientos y doscientas mil. Por el contrario, la señal de salida (eferente) se transmite generalmente por un único axón de la neurona, pero dicho axón puede tener muchas ramas separadas destinadas a distintas partes del sistema nervioso o a la periferia del cuerpo. Un rasgo especial de la mayoría de las sinapsis es que la señal se transmite solamente del axón a las dendritas. Así se consigue que las señales se dirijan en la dirección requerida y cumplan las funciones nerviosas necesarias.

La mayoría de las funciones del sistema nervioso parten de una experiencia sensitiva que proviene de los receptores sensitivos, ya sean receptores visuales, receptores auditivos, receptores táctiles o receptores de otras clases. Esta experiencia sensitiva produce, a veces, una reacción inmediata desde el cerebro; el recuerdo de la experiencia se conserva en el cerebro durante minutos, semanas o años y determina las reacciones del cuerpo en algún momento posterior.

II.1.1 Sistema nervioso central (SNC)

Existen tres niveles principales del sistema nervioso con atributos funcionales concretos:

a) El nivel encefálico inferior o subcortical

Muchas, si no la mayoría de las actividades del organismo que llamamos subconscientes están controladas por las áreas inferiores del encéfalo situadas en el bulbo raquídeo, la protuberancia, el mesencéfalo, el hipotálamo, el tálamo, el cerebelo y los ganglios basales. Por ejemplo; los reflejos de la alimentación, como la secreción salival en respuesta al sabor de los alimentos y la acción de lamerse los labios están gobernados por áreas del bulbo, la protuberancia, el mesencéfalo, la amígdala y el hipotálamo.

b) El nivel encefálico superior o cortical

La corteza cerebral es un almacén de la memoria de enormes dimensiones. La corteza nunca funciona sola, sino siempre en asociación con los centros encefálicos inferiores, ya que estos inician el despertar de la corteza cerebral, abriendo así su banco de recuerdos a la maquinaria pensante del cerebro. El enorme depósito de datos que se conserva en la corteza suele convertir esas funciones en operaciones determinantes y precisas.

c) El nivel espinal o medular

Es una vía que conduce las señales desde la periferia del cuerpo hacia el encéfalo o, en dirección opuesta, desde el encéfalo hacia el cuerpo. Los circuitos neuronales de la médula pueden originar: a) los movimientos de la marcha, b) los reflejos de retirada cuando una parte del cuerpo recibe estímulos dolorosos, c) los reflejos de contracción forzada de las piernas para sostener el cuerpo contra la acción de la gravedad, y d) los reflejos que regulan los vasos sanguíneos locales, los movimientos gastrointestinales y los reflejos que controlan la excreción urinaria. Con frecuencia los niveles superiores del sistema nervioso no actúan enviando

directamente señales a la periferia del cuerpo, sino enviando señales a los centros medulares de control.

II.1.1.1 Organización de la médula espinal

La sustancia gris medular es una zona integradora de los reflejos medulares. Casi todas las señales sensitivas penetran en la médula a través de las raíces sensitivas. Después de ingresar en la médula, cada señal sensitiva sigue dos destinos separados. En primer lugar, una rama del nervio sensitivo termina de inmediato en la sustancia gris de la médula y desencadena reflejos segmentarios locales y otros efectos de carácter local. En segundo lugar, otra rama transmite las señales a niveles más altos del sistema nervioso a zonas más altas de la misma médula, el tronco encefálico, o incluso la corteza cerebral.

La sustancia gris de cada segmento de la médula espinal tiene varios millones de neuronas. Aparte de las neuronas sensitivas de relevo, estas neuronas son de dos tipos:

a) Motoneuronas

En cada segmento de las astas anteriores de la sustancia gris medular existen varios miles de neuronas denominadas motoneuronas. Dan lugar a las fibras nerviosas que salen de la médula por las raíces anteriores e inervan las fibras musculares esqueléticas (Figura 1).

b) Interneuronas:

Las interneuronas están presentes en todas las zonas también de la sustancia gris medular (en las astas posteriores, las astas anteriores y las áreas intermedias entre ambas). Estas células son pequeñas, muy excitables y llegan a conducir hasta 1500 impulsos por segundo. Tienen muchas interconexiones entre sí, y muchas de ellas inervan directamente las motoneuronas. Las interconexiones

entre las interneuronas y las motoneuronas justifican la mayor parte de las funciones integradoras de la médula espinal (Figura 1).

Más de la mitad de las fibras nerviosas que ascienden y descienden por la médula espinal son fibras propioespinales que discurren de un segmento de la médula a otro. Además, cuando las fibras sensitivas entran en la médula desde las raíces medulares posteriores, se bifurcan y ramifican tanto hacia arriba como hacia abajo por la médula espinal; algunas de las ramas transmiten señales sólo a uno o dos segmentos, mientras que otras transmiten señales a muchos segmentos (Guyton y Hall, 2001).

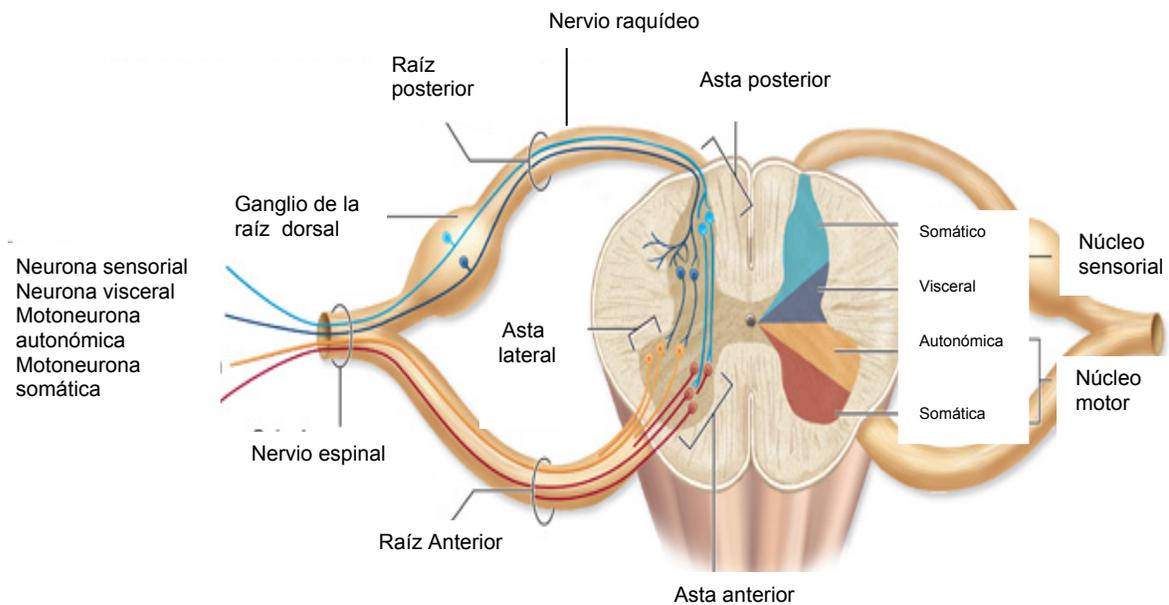


Figura 1. Organización de la medula espinal (Adaptado de McKinley y O'Loughlin, 2006).

II.1.1.2 Ganglios de la raíz dorsal (GRD)

Los ganglios de la raíz dorsal (GRD) también llamados ganglios espinales o sensitivos, son protuberancias ubicadas en la raíz dorsal de la médula espinal, en específico en los agujeros intervertebrales de la columna (Figura 1). Se distribuyen en cervicales, torácicos, lumbares, sacros y coccígeos.

Histológicamente las poblaciones celulares más comunes en el ganglio son las neuronas, los fibroblastos, las células satélites y las células de Schwann. Estas dos últimas están muy relacionadas ya que las células satélite bajo ciertas condiciones pueden adquirir la morfología y desempeñar las funciones de las células de Schwann. Las células satélite envuelven cada neurona sensitiva del ganglio. Por otro lado, las células de Schwann que son la glia del sistema nervioso periférico (SNP), se encuentran asociadas a los axones, envolviendo a varios con su citoplasma o rodeando un solo axón, formando una vaina de mielina característica. La función de las células gliales es principalmente de protección y soporte metabólico neural y axonal. Los fibroblastos, por otro lado, son los productores de la matriz extracelular presente en el tejido conjuntivo del ganglio. Por su parte, las neuronas presentes en los ganglios son exclusivamente de tipo aferente sensitivo que evolucionan a partir de neuroblastos bipolares provenientes de la cresta neural. Las fibras de las neuronas, luego de su nacimiento se dividen en dos ramas divergentes, una medial o central y otra lateral o periférica. Las ramas mediales forman la raíz dorsal, la cual penetra en la médula a través del surco lateral dorsal y se establecen conexión con neuronas presentes en el asta dorsal o posterior. Por su parte las ramificaciones de cada ganglio se unen a la raíz ventral medular formando el nervio raquídeo o mixto (Figura 1), y luego se dirigen a la periferia para terminar en los distintos receptores sensitivos ya sean cutáneos musculares, articulares o viscerales. Estos receptores pueden ser terminaciones libres o estar encapsulados por células especializadas, cuya función es captar y convertir los estímulos del medio en impulsos nerviosos aferentes (Martinez y col., 2000).

II.1.1.2.1 Formación y elongación axonal.

El inicio de la funcionalidad neuronal comienza por la formación de un axón y la generación de dos dominios funcionales, axonal y somatodendrítico. En estos dominios se forman subdominios especializados en la recepción de señales y la propagación de los impulsos nerviosos (Ramón y Cajal, 1897).

Tras la última división, la neurona postmitótica presenta una forma redondeada. En las fases más tempranas, en cultivo, genera un lamelipodio de actina polimerizada a su alrededor (estadio 1). El primer paso en la ruptura de esta simetría es la concentración, en uno o varios puntos, de receptores de factores y proteínas que regulan la polimerización de actina. Se ha descrito que la detección de una señal positiva de crecimiento, a través de receptores de membrana, transforma RhoA-GTP a su forma inactiva, RhoA-GDP. Esta inactivación rompe el complejo de RhoA-ROCK-Profilina e induce la despolimerización de actina en este punto concreto. Otra proteína asociada a actina que participa en la despolimerización de la actina es la cofilina (Silva y col., 2003). Esta ruptura de la barrera de actina es utilizada entonces por los microtúbulos para crecer y generar las neuritas (estadio 2). La regulación del citoesqueleto de actina durante el crecimiento neurítico y axonal es aún poco conocida. Además de la regulación de la dinámica de ensamblaje de los filamentos de actina, su nucleación también juega un papel importante en los mecanismos de crecimiento y motilidad neuronal (Silva y Dotti, 2002). La adquisición de la polaridad neuronal comienza con la formación de un axón a partir de una de las neuritas generadas (estadio 3). El crecimiento del axón a un mayor ritmo que el resto de neuritas requiere la concentración de mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, así como de mecanismos de transporte específicos del axón. Se ha descrito que el punto de crecimiento del axón depende de la posición del centrosoma tras la última división (Anda y col., 2005), lo que supondría un apoyo a la organización de los microtúbulos, su crecimiento y el transporte de proteínas axonales. Sin embargo, el estudio del crecimiento del axón en el modelo de cultivo de neuronas de hipocampo no muestra una relación entre la posición del centrosoma y el punto de crecimiento del axón. Recientemente, un trabajo sugiere que el axón se forma a partir de una de las dos primeras neuritas generadas (Anda y Dotti, 2008).

El segmento inicial del axón (AIS) fue identificado en los años 60 como una estructura que se diferenciaba estructuralmente del resto del axón y del dominio somatodendrítico. Sus principales características son: a) una capa densa granular e

intracelular, b) la presencia de algunos grupos de ribosomas, y c) la presencia de fascículos de microtúbulos (Palay y col., 1968). Esta estructura es la responsable de la generación del potencial de acción y actúa también como una barrera de difusión que controla el tráfico de proteínas hacia el axón.

El axón, una vez formado, debe elongarse y alcanzar dianas específicas para generar contactos sinápticos con otras neuronas o células especializadas en diferentes tejidos. Esta elongación está regulada por señales externas positivas y negativas que regulan el crecimiento y guían al axón hacia su diana. Diversos estudios han mostrado que la ramificación axonal está ligada al comportamiento del cono de crecimiento. Éste cuenta con receptores de señales que están acoplados a mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, tales como receptores a moléculas guía (p.e DDC, receptor de netrina, neuropilina, receptor de Sema 3A) o receptores a componentes de matriz extracelular (p.e.integrinas) (Kalil y col., 2000; Dent y col., 2003). Estos factores pueden regular de manera indirecta la dinámica de los filamentos de actina o microtúbulos en zonas específicas del cono de crecimiento, permitiendo su giro hacia una u otra dirección o incluso el colapso del cono de crecimiento. La neurona, a través del conjunto de receptores y sensores en su cono de crecimiento, realiza exploraciones y crece en la dirección permitida o colapsa ese cono de crecimiento si el ambiente no permite el crecimiento, impidiendo de esta forma la generación de ramificaciones axonales (Antonini y Stryker, 1993; Yu y col., 2008).

II.1.1.2.2 Conos de crecimiento

Para que el sistema nervioso sea funcional, las neuronas extienden sus axones, a menudo, a largas distancias, hasta alcanzar sus dianas. En este proceso se ven implicadas señales moleculares específicas que guían los axones hacia sus objetivos y estas señales, son reconocidas por el cono de crecimiento.

En función de las señales, el cono de crecimiento elabora una respuesta

dentro de un determinado contexto celular, es decir, el ambiente que rodea las células proporciona un juego complejo de órdenes para el axón en vías de crecimiento.

Los conos de crecimiento tienen tres regiones principales. El núcleo central que es rico en microtúbulos, mitocondrias y otros organelos. Del cuerpo proliferan largas y delgadas extensiones conocidas como filopodios. Entre los filopodios están los lamelipodios, que son también móviles y dan al cono de crecimiento su característico aspecto erizado (Figura 2) (Dickson, 2002).

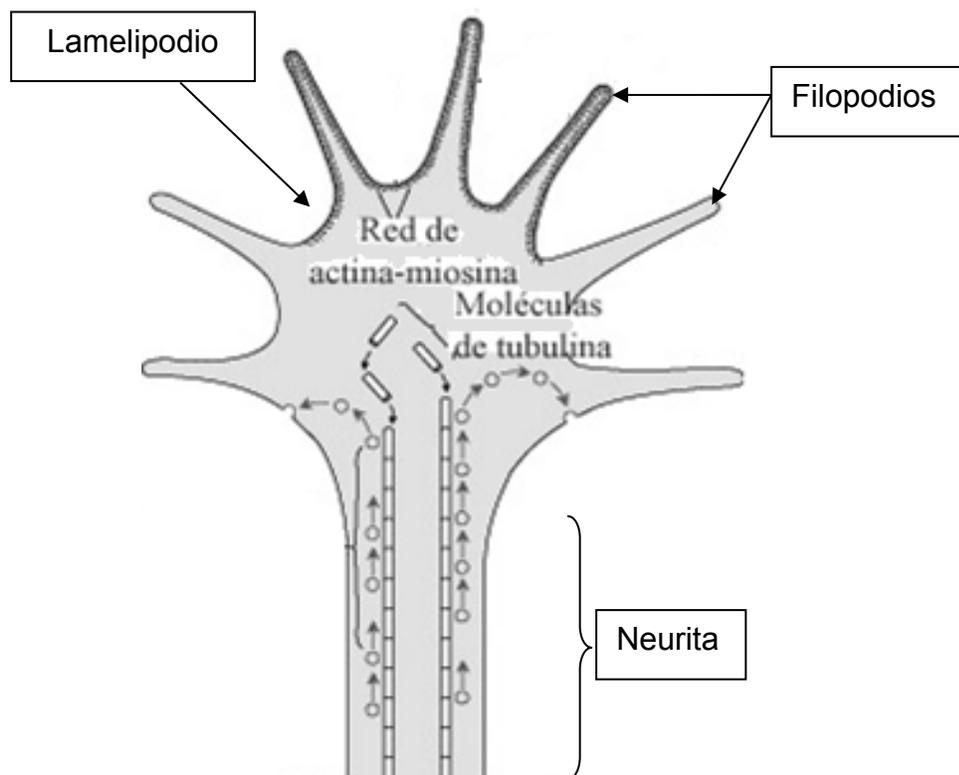


Figura 2. Esquema de cono de crecimiento (Adaptado de Ávila y col., 2007).

La capacidad sensitiva del cono de crecimiento depende en gran parte de sus filopodios. Estas estructuras en forma de cilindro, ricas en actina son muy móviles. Sus membranas poseen receptores para las moléculas que sirven como

señales de dirección para el axón. La longitud de los filopodios les permite tantear el terreno mucho antes que el núcleo central, sus rápidos movimientos les permite hacer un inventario detallado del ambiente y su flexibilidad les permite navegar a través de células y de otros obstáculos. Cuando los receptores de los filopodios encuentran señales en el medio ambiente, el cono es estimulado para avanzar, retraerse o girar. Para la guía de filopodios es particularmente importante el acoplamiento entre las capacidades sensitiva y motora del cono de crecimiento. Es decir, que los receptores en los filopodios no intervengan simplemente en la adherencia sino más bien sean receptores y transmisores de señales acoplados a numerosas vías de segundos mensajeros. Los segundos mensajeros afectan a su vez a la organización del citoesqueleto, y regulan de esa manera la dirección y la velocidad a la que se mueve el cono de crecimiento (Dickson, 2002).

Varios motores moleculares que interactúan con actina, miosina y componentes de la membrana impulsan estas reacciones y la contribución de cada motor molecular al avance del cono de crecimiento probablemente varía de una situación a otra. El paso final implica el flujo de microtúbulos desde el núcleo central a la protusión recientemente creada, de forma que el cono de crecimiento se mueve hacia delante y deja atrás un nuevo fragmento axónico. En el nuevo cono de crecimiento se forman otra vez lamelipodios y filopodios, y el proceso comienza de nuevo (Dent y Gertler, 2003).

Diversas moléculas actúan como señales en la guía del axón. Las integrinas de los conos de crecimiento interactúan en la matriz extracelular. Estas moléculas intervienen en la adherencia y también favorecen el crecimiento del axón. Existen también receptores a moléculas quimiotrópicas que señalizan para permitir el avance o retroceso del cono de crecimiento (Dickson, 2002)

II.1.1.2.3 Efecto de las moléculas quimiotrópicas sobre la proyección axonal.

El efecto de las moléculas quimiotrópicas se da a través de la formación de

gradientes de concentración y de acuerdo a su capacidad de difusión se pueden considerar como de corto o largo alcance. Las proteínas quimiotrópicas de corto alcance pueden estar ancladas a la membrana de otras células o a componentes de la matriz extracelular, las proteínas de largo alcance son secretadas al medio extracelular y pueden difundir grandes distancias (Song y Poo, 2001).

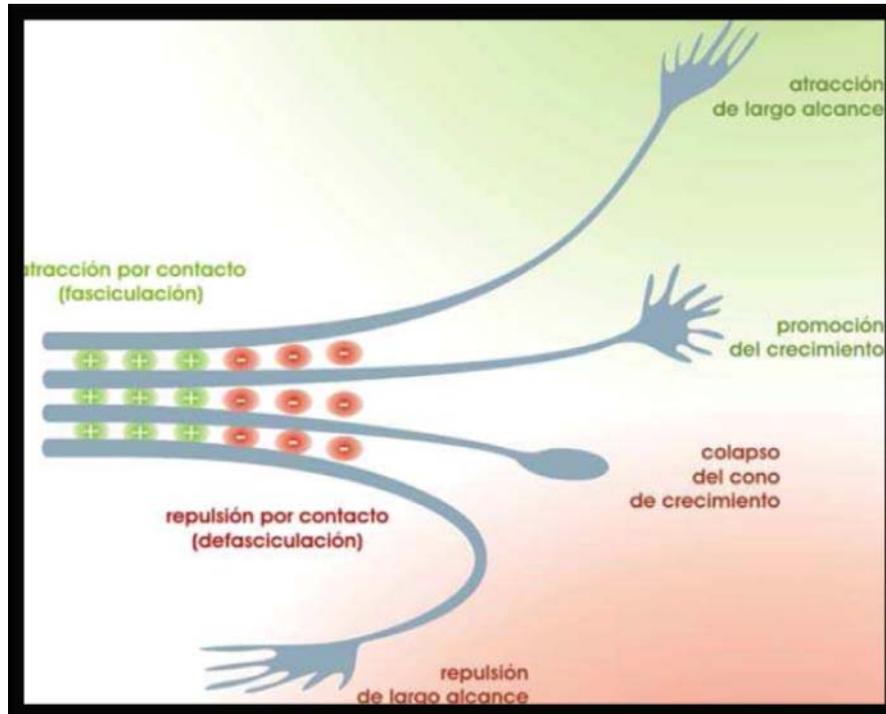


Figura 3. Mecanismos de acción de moléculas quimiotrópicas. Los factores guía influyen en la navegación axonal aportando estímulos de dos naturalezas distintas: positivos o atractivos (representados en verde), y negativos o repelentes (representados en rojo) (Guijarro, 2006).

Se pueden diferenciar tres efectos distintos en la acción de las proteínas quimiotrópicas en axones y neuronas, como se observa en la Figura 3:

a) Atracción o repulsión de corto alcance o de contacto, que permite, por ejemplo, la fasciculación axonal formando haces de fibras nerviosas, y la defasciculación selectiva de dichos haces en puntos concretos.

b) Atracción o repulsión de largo alcance, que permite dirigir al axón o neurona hacia la región diana o evitar la invasión de regiones inapropiadas.

c) Estimulación del crecimiento axonal o colapso del cono de crecimiento, acciones que generan el avance o la detención del cono de crecimiento sin implicar direccionalidad (Song y Poo, 1999; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).

II.1.1.2.4 Comportamiento neuronal ante moléculas quimiotrópicas

Se ha descrito una secuencia de eventos que ocurren en el cono de crecimiento axonal tras el encuentro con moléculas quimiotrópicas distribuidas en gradiente de concentración:

a) Detección del gradiente de las moléculas quimiotrópicas, mediante la ocupación desigual de su receptor específico en la superficie del cono de crecimiento, que se traduce primero en un débil gradiente de activación del receptor, y luego en el agrupamiento de varias moléculas de receptor y/o de sus efectores citosólicos, iniciándose así una o varias vías de señalización intracelular.

b) Amplificación de la señal inicial. El agrupamiento inicial de receptores y/o efectores específicamente en una zona del cono de crecimiento desencadena el reclutamiento y concentración en esa misma zona de más intermediarios de la cascada de señalización, y la consiguiente ausencia de dichos intermediarios en el resto del cono; finalmente, la amplificación de la señal intracelular termina en la concentración y ensamblaje de moléculas de actina en un lado del cono de crecimiento según una orientación determinada, por donde se forman nuevas prolongaciones membranosas (filopodios, lamelipodios) que lideran la extensión del axón en la nueva dirección.

c) Adaptación al gradiente de moléculas quimiotrópicas. Una vez detectadas las moléculas quimiotrópicas, y tras la respuesta inicial (atracción/repulsión), el

cono de crecimiento reajusta su sensibilidad hacia las moléculas quimiotrópicas, un mecanismo llamado adaptación, que consiste en un ciclo de desensibilización y posterior resensibilización del cono de crecimiento hacia las distintas concentraciones del gradiente de moléculas quimiotrópicas. Tras cada ciclo de adaptación, el axón avanza ascendiendo (atracción) o descendiendo (repulsión) el gradiente de las moléculas quimiotrópicas (Song y Poo, 2001) (Figura 4).

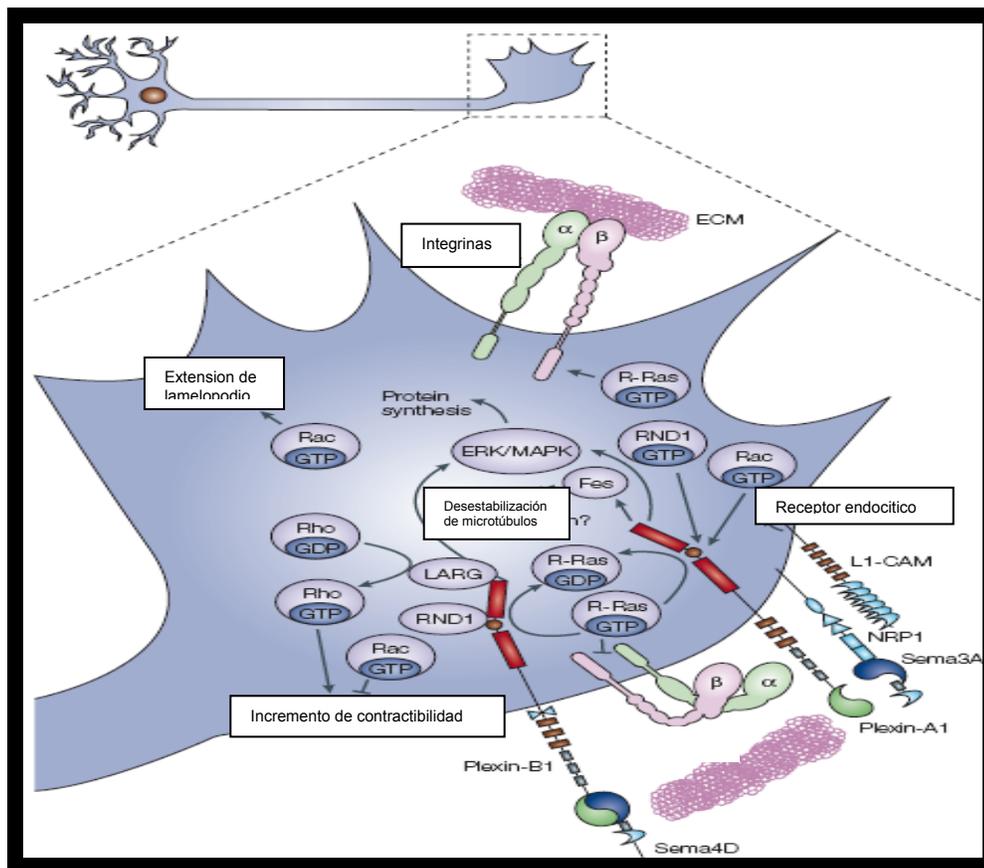


Figura 4. Comportamiento del cono de crecimiento ante la presencia de moléculas quimiotrópicas. En el extremo inferior de la imagen, el cono de crecimiento se encuentra en contacto con semaforinas presentes en células vecinas (como Sema4D en oligodendrocitos) o solubles (como Sema3A), se inician las vías de señalización mediadas por plexinas y/o neuropilinas, que en última instancia producen la inhibición del crecimiento axonal. Al mismo tiempo, en el lado opuesto del cono de crecimiento (donde no hay semaforina), se produce un aumento de la unión a la matriz extracelular mediada por integrinas que facilita el crecimiento. Existe por lo tanto un crecimiento desigual en ambos lados del cono axonal, que causa un cambio de dirección en contra de la fuente de semaforinas (Adaptado de Kruger y col., 2005).

II.2 Semaforinas

Las semaforinas son moléculas quimiotrópicas que se definen por la presencia de un dominio amino-terminal denominado “sema”, altamente conservado y clave para la señalización. El dominio sema equivale estructuralmente a una variante del pliegue tipo hélice- β , un tipo de topología proteica muy común tanto en proteínas extracelulares como citosólicas, y junto con el dominio CDR (Dominio rico en cisteína) constituyen el dominio de aproximadamente 500 aminoácidos que contienen cisteínas conservada y una secuencia rica en cisteínas denominada Met Related (MRS) que es la que confiere la especificidad biológica (Artigiani y col., 1999; Raper, 2000). Además del dominio sema existen otros como el PSI (plexina semaforina e integrina), el dominio carboxi-terminal que contiene aminoácidos básicos con un dominio de inmunoglobulina adyacente que ayuda a reafirmar la unión de la clase III de semaforinas a sus receptores (Kruger y col., 2005; Raper, 2000), (Figura 5).

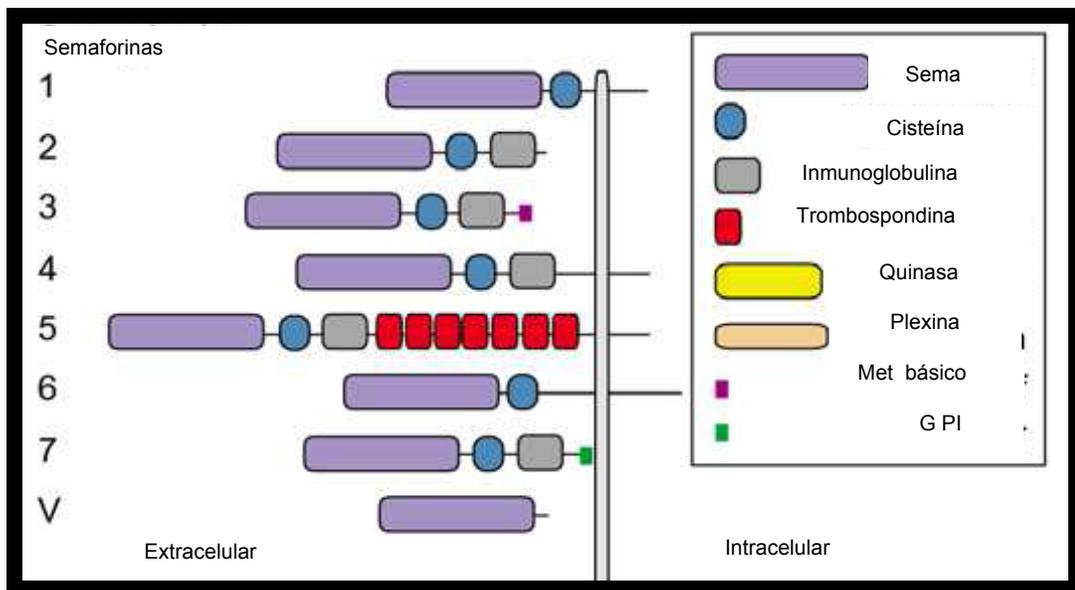


Figura 5. Estructura de las ocho clases de semaforinas (Adaptado de Gheradi y col., 2004).

II.2.1 Clasificación de las semaforinas

Las semaforinas han sido clasificadas según sus dominios adicionales en ocho clases (Raper, 2000), todas ellas de origen animal excepto la clase V, formada por proteínas virales. Las semaforinas de clase II y III son solubles, mientras que el resto contienen semaforinas ancladas a la membrana plasmática; entre ellas, las clases I, IV, V y VI las componen proteínas transmembranales de tipo I (con su extremo N-terminal en el medio extracelular, y su extremo C-terminal en el citosol), y las semaforinas de clase VII presentan un dominio GPI de unión a membrana. Las clases I y II de semaforinas son de origen invertebrado y las clases III, IV, V, VI y VII son de origen vertebrado (Gheradi y col., 2004; Kolodkin y col., 1993), (Figura 5).

II.2.1.1 Semaforina 3A

Fue el miembro de la clase III el que inauguró la familia de las semaforinas, en el año 1993 se purificó y clonó una glucoproteína de 100 kDa con capacidad de colapsar el cono de crecimiento axonal in vitro de los GRD, por lo que fue bautizada como Colapsina y posteriormente renombrada semaforina 3A. La estructura de Sema 3A, común a todos los miembros de la clase III, consiste en el dominio sema más el dominio PSI en su extremo N-terminal, seguidos por un dominio Ig y una región básica en el extremo C-terminal. El dominio sema es necesario y además suficiente para producir colapso axonal, y una secuencia de 70 amino ácidos dentro del dominio específica la actividad propia de cada semaforina.

Sema 3A contiene además tres secuencias consenso para furin-proteasas, cuya acción permite activar la proteína (ya que su versión completa es inactiva) dando lugar a varios péptidos con distinta capacidad de repulsión: la forma de 95 kDa generada por hidrólisis en el punto C-terminal es la más activa, y su posterior digestión en el punto entre los dominios sema y PSI reduce su actividad considerablemente. Tanto Sema 3A como la semaforina transmembranal sema 4B forman homodímeros, y en el caso de Sema 3A la dimerización resulta imprescindible para su función, ya que parece ser necesaria para hidrolizar la

proteína completa y obtener así la forma más activa de 95kDa. Es importante señalar que en embriones de rata, Sema 3A puede actuar como un quimiorepelente para neuronas GRD dependientes de NGF, pero dicho efecto sólo tiene resultado en embriones de estadio 14 (E-14). Esto se debe a que el E-14 la médula espinal ventral segrega una actividad quimiorepelente selectiva para las neuronas responsivas a NGF. Esto se correlaciona bien con el patrón de expresión de Sema 3A en el cordón ventral durante el tiempo de la inervación sensorial aferente, etapa en la que las proyecciones están llegando a su blanco (Kolodkin y col., 1997).

A partir de datos *in vitro* se ha demostrado la acción quimiotrópica de las semaforinas secretables sobre distintas clases de axones, y en particular la función de Sema 3A en colapso o repulsión axonal en los sistemas periférico, sensorial y motor, así como en el sistema nervioso central: Sema 3A repele axones olfativos, corticales e hipocampales. *In vitro*, las semaforinas de clase III también pueden ser factores quimioattractivos: Sema 3C sobre axones corticales, sema 3B sobre axones de bulbo olfativo, y sema 3D sobre axones telencefálicos que forman la comisura anterior (Fiore y Puschel, 2003; Wolman y col., 2004). Sema 3A también puede regular el desarrollo dendrítico; ensayos *in vitro* demuestran que Sema 3A actúa en neuronas corticales atrayendo sus dendritas hacia la superficie pial, y al mismo tiempo repele los axones de esas mismas neuronas, empujándolas hacia la sustancia blanca. La presencia predominantemente dendrítica de la enzima guanililciclase (cuya actividad de producción de cGMP puede cambiar la respuesta axonal ante Sema 3A de repulsión a atracción) podría ser responsable de la dualidad funcional de Sema 3A sobre neuronas corticales (Song y col., 1998; Polleux y col., 2000).

II.2.2 Receptores a semaforina

Se han identificado los receptores de alta afinidad de las semaforinas. Entre ellos están las plexinas, que son una gran familia de moléculas transmembranales que se conservan de invertebrados a humanos, y las neuropilinas (Npn 1 y Npn 2)

que se encuentran solamente en vertebrados. Las semaforinas se unen directamente a las plexinas, mientras que las semaforinas secretadas también requieren neuropilinas como correceptores obligatorios (Figura 6). Varias evidencias indican que el dominio citoplásmico de las plexinas es requerido en la señalización por semaforinas, mientras que el lado citosólico de las neuropilinas es prescindible (Tamagnone y Comoglio, 2004).

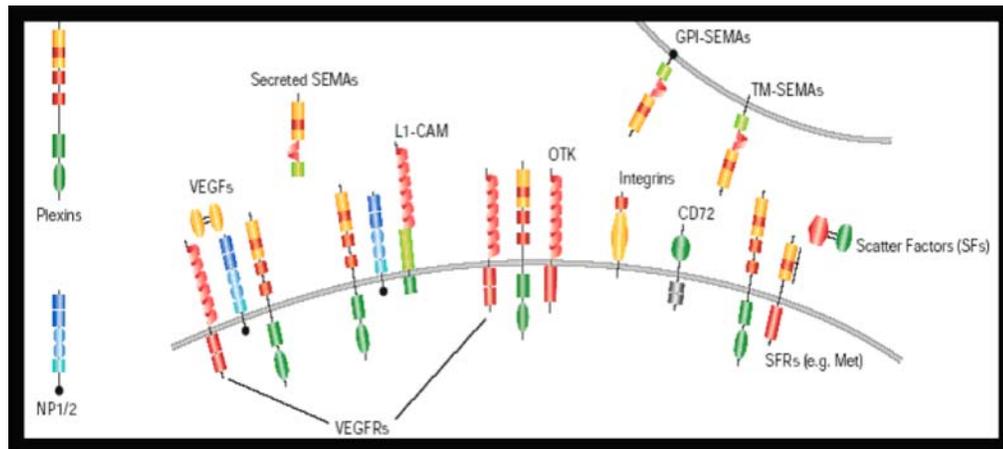


Figura 6. Complejos receptores para la familia de las Semaforinas. Las Plexinas unen a Semaforinas (SEMA) y pueden formar complejos receptores con Neuropilinas (NP1/2), moléculas de adhesión celular como L1 (L1-CAM), receptores tirosina-quinasa como Otk, receptores Met y Ron (que forman parte de la familia de los receptores para proteínas “Scatter” (SFR)), y receptores de VEGF (VEGFR). Neuropilinas son co-receptores de semaforinas secretables y VEGF. Integrina $\beta 1$ participa en la señal de Sema7A. CD72 es un receptor de baja afinidad de Sema4D. GPI: molécula glucosil-fosfatidilinositol. TM: transmembrana (Adaptado de Tamagnone y Comoglio, 2004).

Sin embargo recientemente se ha comenzado a describir la interacción de neuropilina con proteínas de adhesión célula-célula como L1-CAM, o de adhesión al sustrato tales como integrinas, o proteínas de adhesiones focales (Castellani y col., 2002; Valdembrì y col., 2009; Tamagnone y Comoglio, 2004), lo que sugiere que su papel en la regulación de la respuesta a semaforinas podría estar ligada a la regulación de la adhesión al sustrato.

II.2.3 Señalización intracelular inducida por semaforinas

El cono de crecimiento se desensibiliza ante Sema 3A mediante la endocitosis de su receptor neuropilina-1 (Npn1), que recupera su presencia en la membrana plasmática durante la resensibilización mediante tráfico endosomal y síntesis proteica. La respuesta repulsiva del axón inducida por Sema 3A depende de síntesis de proteínas a nivel local (de forma independiente del soma), pero no de su degradación (Campbell y Holt, 2001). Aunque no se conoce del todo la vía de señalización inducida por semaforinas, recientemente se ha comenzado a describir una serie de proteínas involucradas tales como algunas GTPAsas de la familia de las proteínas G pequeñas, algunas cinasas, e incluso reacciones redox a través de la proteína MICAL.

Algunas de las GTPAsas implicadas pertenecen a la familia de las GTPAsas Rho: Rac1, RhoA, y Rnd1. Se ha reportado que Sema 3A activa a Rac1, a través FARP2 un factor intercambiador de guanina (GEF por sus siglas en inglés) que cataliza el cambio de GDP por GTP, y que se encuentra unido a Npn1. La forma activa de Rac1 (ligada a GTP) une la zona intermedia entre los dominios intracelulares C1 y C2 de PlexA1, e induce la unión de Rnd1. Rnd1 induce la actividad de GTPAsas de R-Ras de PlexA1 al estimular la hidrólisis de GTP a GDP, e induciendo a su vez la desactivación de R-Ras (Toyofuku y col., 2005). R-Ras, un miembro de la familia Ras de GTPAsas pequeñas, juega un papel esencial en los procesos de adhesión celular y crecimiento neurítico, y a diferencia de otros miembros de la familia Ras de pequeñas GTPAsas, no señala mediante Erk/MAPK, sino que regula la actividad de integrinas. R-Ras constitutivamente activa aumenta la adhesión celular mediada por integrinas, y este efecto es contrarrestado por una forma mutada de R-Ras que presenta dominancia negativa. Teniendo en cuenta la actividad GAP sobre R-Ras de plexinas, la inhibición de R-Ras resultaría su vez la supresión de la actividad de integrinas, generando colapso axonal y retracción neurítica (Kruger y col., 2005; Negishi y col., 2005).

Por otra parte, la familia de las plexinas contiene en su dominio intracelular residuos tirosina conservados entre sus distintos miembros. Varios estudios

demuestran la participación de las quinasas Fes/Fps, Fyn y Cdk5 en el colapso de axones GRD inducido por Sema 3A (Tamagone y col., 1999).

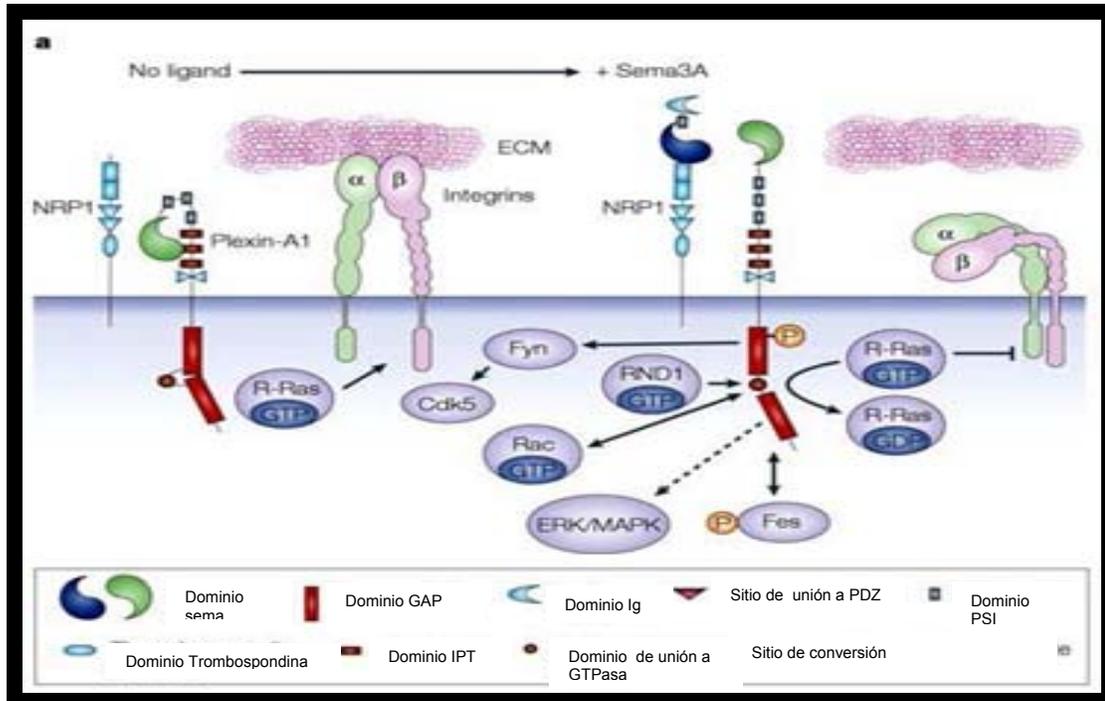


Figura 7. Señalización mediada por PlexA1 (a). Sin ligando, r-Ras activa estimula la adhesión a la matriz extracelular a través de integrinas. La unión de semaforina a Np1 inicia la vía de señalización de PlexA1, cuya actividad GAP (dependiente de Rnd1) estimula la actividad GTPasa intrínseca de r-Ras y, en consecuencia, su inactivación y la posterior disminución de la adhesión a través de integrinas. La cascada de señalización inducida por PlexA1 también produce la activación de Fyn (que a su vez activa Cdk5) y de Erk/MAPK. La señalización entre PlexA1, Fes y Rac podría ser bidireccional (Adaptado de Kruger y col., 2005).

La tirosina-quinasa Fes/Fps une la región intracelular de PlexA1, y en estado basal, Npn1 impide la interacción entre PlexA1 y Fes; la unión de Sema 3A con su receptor Npn1 permite a Fes unirse a PlexA1 y activarse, fosforilando PlexA1 y el complejo Cram/Crmp2 (Mitsui y col., 2002). Se ha demostrado la participación de la tirosina-quinasa Fyn y Sema 3A *in vivo* en el desarrollo dendrítico de neuronas corticales. Fyn une y fosforila la región intracelular de PlexA1 y A2, y la fosforilación aumenta en presencia de Npn1; Cdk5, con actividad serina/treonina quinasa, interacciona con PlexA2 uniéndose a Fyn activo, que a su vez fosforila y activa a

Cdk5. Cdk5 puede fosforilar Crmp2, facilitando posiblemente la posterior fosforilación de Crmp2 por parte de Gsk3 (Eickholt y col., 2002; Brown y col., 2004). Por otra parte, Gsk3, que al igual que Cdk5 tiene actividad serina/treonina quinasa, colocaliza en su forma inactiva con F-actina en la periferia del cono de crecimiento axonal. Sema 3A activa Gsk3, y la actividad de Gsk3 es necesaria para el colapso axonal inducido por Sema 3A. Por lo tanto, Gsk3 puede participar en la señalización de Sema 3A, acoplándola con la reorganización del citoesqueleto de actina y regulando así la motilidad axonal. En la vía de señalización de Sema3A, se identificó Crmp-62, una proteína intracelular homóloga a Unc33 en *C.elegans*, que resultaba esencial en el colapso de axones GRD inducido por Sema 3A. Crmp2 reconstituye la cascada de señalización de Sema 3A dependiente de proteínas G, y es fosforilada por quinasas que forman parte de la señal intracelular iniciada por semaforinas, como Fes/Fps o Cdk5. Crmp2 promueve el ensamblaje de microtúbulos, y estimula el crecimiento y la ramificación del axón, lo que subraya la importancia que la regulación de proteínas Crmp por parte de semaforinas podría tener en repulsión y colapso (Goshima y col., 1995)

Finalmente se ha reportado que MICAL, una proteína citosólica con actividad de flavoproteína-monooxigenasa que cataliza la oxidación de distintos substratos, interacciona con el extremo C-terminal de la región intracelular de plexinas clase A. MICAL interviene en la señalización de semaforinas clases 1 y 3 y la función oxidativa de MICAL es imprescindible para los efectos repulsivos mediados por dichas semaforinas (Terman y col., 2002). Las flavoproteínas monooxigenasas pueden actuar de forma indirecta, generando un aumento local de oxígeno reactivo en la célula, o bien directamente cambiando el estado redox de varios substratos, como proteínas del citoesqueleto o miembros de la familia Rho de pequeñas GTPasas (Ventura y col., 2002); de hecho, se ha demostrado que la oxidación de actina provoca su despolimerización (Kolodkin y col., 1997).

II.2.3.1 Sema 3A y el citoesqueleto de actina

Se cree que los factores guía influyen en el movimiento del axón alterando el citoesqueleto neuronal, lo que produce el cambio en la morfología del cono de crecimiento. Así, Sema 3A estimula la despolimerización de actina en la periferia del cono de crecimiento durante su colapso, sin alterar significativamente los microtúbulos (Fan y col., 1993). En el cono de crecimiento colapsado por acción de Sema 3A, la actina se concentra en su centro, alrededor de estructuras endosomales derivadas del aumento de la actividad endocítica (Fournier y col., 2000). Sema 3A altera el estado de polimerización de actina a través de la cinasa LIM, una quinasa serina/treonina que fosforila e inactiva a una proteína despolimerizadora de actina llamada Cofilina. Sema 3A produce la fosforilación y defosforilación de Cofilina en conos de crecimiento de axones GRD, y es necesaria la activación de cinasa LIM (que depende de las quinasas Pak y Rock) para que axones GRD se colapsen ante Sema 3A. En la señal intracelular iniciada por Sema 3A, la cinasa LIM es activada y fosforila a Cofilina, liberándola de la molécula de actina a la que estaba ligada; Cofilina fosforilada es aún inactiva, por lo que es posible que, además de la cinasa LIM, participe también en la señal de Sema 3A un enzima con actividad fosfatasa que defosforila Cofilina y la vuelve a su estado activo (Aizawa y col., 2001).

II.3 Matriz extracelular

La matriz extracelular está formada por un conjunto de macromoléculas que se localizan entre las células de un determinado tejido o en la zona externa de la membrana plasmática de cualquier célula (Silvera y Barrios, 2002). Estos componentes son en general producidos por células locales, especialmente fibroblastos, distribuidos en la matriz (Alzola, 2002), o los aporta la corriente sanguínea. En ambos casos forman el medio donde las células sobreviven, se multiplican y desempeñan sus funciones.

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son de cuatro grandes tipos: a) sistema colágeno b) sistema elástico c) proteoglicanos d)

glicoproteínas multifuncionales (laminina, fibronectina, tenascina, trombospondina y otras). Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás; esto hace que la matriz sea calificada como un verdadero complejo funcional. El sistema de colágeno y el sistema elástico constituyen la arquitectura de la matriz extracelular (Silvera y Barrios, 2002). Las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato y son importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Las cuales están implicadas en el anclaje del citoesqueleto durante la migración y el control de la tensión intracelular o extracelular. Por ejemplo; el citoesqueleto de actina está vinculado a través de varios adaptadores de proteínas como vinculina, paxilina, entre otras a los receptores de la familia de las integrinas. Las integrinas se unen a proteínas de matriz extracelular organizada en cualquiera de las membranas basales o del tejido conectivo. Es importante destacar que si una adhesión focal o sitio de contacto de la células con la matriz extracelular, está formada sobre una superficie plana (cubreobjetos por ejemplo) o dentro de una red de proteínas de la matriz extracelular, los receptores de la integrina se limitan al plano 2D de la membrana plasmática, en el que se pueden difundir lateralmente (Wehrle y Imhif, 2002).

Las magnitudes de la fuerza de tracción local que presentan las células sobre la matriz extracelular son proporcionales al área de adhesión, los sitios de adhesión menores a $1\mu\text{m}^2$ ejercen una fuerza de tracción insignificante, y los sitios mayores a $1\mu\text{m}^2$ ejercen fuerzas que se incrementan linealmente con el área (Lauffenburger y Wells, 2001). Varios estudios han sugerido que la tensión mecánica que se ejerce en la célula-sustrato y célula-célula en los límites de la interfase está implicada en la regulación de una variedad de procesos fisiológicos. Éstos incluyen muchos tipos de movimientos ameboides, la dependencia de anclaje para el control de crecimiento y la remodelación de la matriz extracelular. Debido a que los sitios de contacto permanecen fijos en el sustrato durante la locomoción de la célula, las nuevas adhesiones frontales, así como nuevos cables de conexión deben ser continuamente producidos (Dembo y col., 1999).

Sin embargo no sólo la composición de la matriz extracelular determina su funcionalidad y el tipo de interacciones con las células; las propiedades mecánicas de la matriz tales como la rigidez también son fundamentales para regular funciones celulares como el crecimiento y el movimiento (Sundararaghavan y col., 2008). En investigaciones anteriores se ha observado en cultivos de fibroblastos un comportamiento conocido como durotaxi, en el que las células preferentemente migran hacia las regiones con mayor rigidez del sustrato (Chan y Odde, 2008), y por otro lado las motoneuronas de la médula espinal muestran una preferencia por un sustrato suave que por uno rígido, ya que en el sustrato suave la longitud de las neuritas aumenta al igual que su ramificación (Georges y col., 2006).

Los trabajos pioneros de Pelham y Wang (1997) mostraron que la flexibilidad del sustrato modula la motilidad y la formación de adhesiones al sustrato, de manera que un sustrato con poca rigidez aumenta la motilidad de fibroblastos 3T3, reduce el tamaño de las adhesiones y aumenta su recambio, mientras que en un sustrato rígido las células forman adhesiones estables. Por otra parte se ha descrito que en sustratos blandos los fibroblastos carecen de fibras de estrés (filamentos de actina polimerizada que proporcionan la tensión celular interna), y la expresión de la integrina alfa 5 se ve disminuida (Yeung y col., 2005). Por otra parte, se ha visto que la flexibilidad del sustrato modula la señalización intracelular, de manera que la fosforilación en tirosinas de múltiples proteínas, por ejemplo paxilina una proteína que forma parte del complejo de adhesión celular, es mucho mayor en sustratos rígidos (Discher y col., 2005).

Como se puede apreciar los eventos que llevan a la respuesta de atracción o repulsión ejercido por las semaforinas son sumamente complejos, implican una gran cantidad de proteínas que forman parte de la vía de transducción de señales y finalmente converge en la regulación del citoesqueleto y de la adhesión al sustrato. Por otra parte son numerosas las evidencias que apuntan al papel que tiene las propiedades mecánicas del sustrato en el que se encuentran las células para determinar su adhesión, rearrreglo del citoesqueleto y finalmente su motilidad. Sin

embargo hasta a fecha no se ha reportado de qué manera una de las propiedades del sustrato como la rigidez podría influir en la respuesta a Sema 3A, respuesta en la que también está implicada la regulación del citoesqueleto y de la adhesión al sustrato.

III. HIPÓTESIS

La rigidez del sustrato modula el efecto de colapso por la semaforina 3A recombinante en conos de crecimiento de neuronas obtenidas de ganglios de la raíz dorsal de embriones de ratas Wistar de E-14.5.

IV. OBJETIVOS

IV.I General

Evaluar el efecto de la rigidez del sustrato sobre el colapso de conos de crecimiento de neuronas obtenidas de ganglios de la raíz dorsal de embriones de ratas Wistar de 14 días, expuestas a semaforina 3A recombinante.

IV. II Específicos

- 1) Estandarizar el método de colapso de conos de crecimiento de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (GRD) expuestas a semaforina 3A y cultivadas sobre cubreobjetos recubiertos con matriz extracelular.
- 2) Evaluar el crecimiento axonal de neuronas de GRD sobre sustratos con diferentes grados de rigidez
- 3) Evaluar el efecto de Sema 3A en el colapso de conos de crecimiento de neuronas de GRD sobre sustratos con diferentes grados de rigidez.

V. METODOLOGÍA

V.I Materiales

❖ Químicos

Hidróxido de sodio

3-Aminopropiltriétoxissilano (APTES)

Agua destilada

Agua tridestilada

Glutaraldehído

PBS

HEPES

TEMED

Persulfato de amonio (APS)

Bis-acrilamida

Acrilamida

Sulfo-SANPAH

DMEM

10XMEM

DMEM F12

Opti-MEM

Glutamina

Penicilina

Estreptomina

Tritón X-100

Glucosa

Etanol

Tripsina

Tripsina-EDTA

Paraformaldehído

Cloruro de sodio

Cloruro de potasio
Cloruro de calcio dihidratado
Glicerol

❖ Biológicos

NGF
Colágena tipo I
Faloidina-TRITC (039K0691, Sigma-Aldrich)
Suero fetal bovino
Suero de caballo
Embriones de Ratas Wistar de 14 días
Línea celular de fibroblastos NIH-3T3
Sema 3A-Fc (1250-S3, R&D Systems)
Anticuerpo anti- β -tubulina (MMS-411R, Covance)
Anticuerpo anti-vimentina policlonal (V4630, Sigma-Aldrich)
Anticuerpo anti IgG de ratón alexa 488
Anticuerpo anti IgG de cabra alexa 488

❖ Material y Equipo

Cubreobjetos de 22X22mm
Cubreobjetos redondos de 18mm de diámetro
Caja de silicón
Micro agujas
Cajas para cultivo de 10cm
Pipetas de plástico
Pipetas pasteur
Matraz kitazato
Micropipetas
Pinzas de relojero inoxidable
Caja para cultivo de 12 pozos
Tubos Falcon de 15mL

Tubos Falcon de 50mL
Tubos eppendorf
Papel aluminio
Cronómetro
Estuche de disección
Cámara de Neubauer
Baño maría
Mechero
Bolsas amarillas para residuos biológicos infecciosos
Centrífuga
Incubadora de CO₂
Campana de flujo laminar
Balanza analítica
Microscopio Confocal
Microscopio de Fluorescencia
Microscopio de Fluorescencia invertido
Microscopio Estereoscópico
Refrigerador a 4°C

V.II Métodos

Se elaboraron geles de acrilamida-bispoliacrilamida con 4 diferentes grados de rigidez, los cuales se recubrieron con Poli-L- ornithina y colágena tipo I. En ellos se sembraron neuronas disgregadas de ganglios de la raíz dorsal, se evaluó el efecto en los conos de crecimiento ante la presencia de Sema 3A recombinante (Sema 3A-Fc) y se comparó el promedio de las longitudes de los axones y el área de los conos de crecimiento con la prueba estadística t de student.

V.II.1 Preparación de cubreobjetos con geles de diferente rigidez

V.II.1.1 Pre-Tratamiento de cubreobjetos

Se tomó un cubreobjetos de 18 mm de diámetro y se pasó por la flama de un mechero durante 15 segundos, enseguida se le adicionó 20 μL de NaOH 0.1N y se dejó secar, cuando esto sucedió se le añadió 20 μL de APTES y se dejó reposar por 5 minutos, posteriormente se lavó dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada lavado. El cubreobjetos se puso a secar y posteriormente se le adicionó 300 μL de glutaraldehído al 0.5% en PBS, se incubó por 30 minutos, se lavó tres veces con agua destilada, cada lavado de 2 minutos, y se dejó secar.

V.II.1.2 Adición del gel de poliacrilamida al cubreobjetos

Se elaboraron cuatro mezclas de acrilamida-bisacrilamida para la obtención de geles con diferentes grados de rigidez (Cuadro1).

Cuadro 1. Cantidad necesaria de los reactivos para la elaboración de geles de acrilamida-bisacrilamida con diferente rigidez. Un pascal (Pa) es una unidad derivada SI de presión o tensión, que se define como un newton por metro cuadrado (Chang y col., 2002).

Rigidez	0.15kPa	0.32 kPa	3.43 kPa	40.4 kPa
Acrilamida	75 μL	100 μL	100 μL	200 μL
Bisacrilamida	20 μL	20 μL	100 μL	320 μL
Agua destilada	905 μL	880 μL	800 μL	480 μL
APS	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
TEMED	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL

Se preparó la mezcla de acrilamida-bisacrilamida, ésta se desgasificó por 10 minutos, después se añadieron las cantidades señaladas de agua, APS y TEMED. De esta mezcla se tomaron 25 μL y se adicionaron a un cubreobjetos con el pre-tratamiento, y sobre la solución se colocó un cubreobjetos de 22X22 mm, se dejó reposar por 30 minutos. y posteriormente se removió el cubreobjetos superior. El

cubreobjetos inferior que tenía la mezcla ya gelificada se colocó en una caja de cultivo de 12 pozos y se lavó con HEPES 50 mM por 5 minutos.

V.II.1.3. Activación de la superficie de poliacrilamida y conjugación con colágena

A la superficie de cada cubreobjetos se le añadió 350 μ L de una solución de Sulfo-SANPAH 1 mM/ 50 Mm HEPES y se expuso a la luz ultravioleta utilizando una lámpara de luz UV (22 watts) por 8 minutos, al término de este tiempo se repitió el paso anterior con nueva solución de sulfo-SANPAH 1 mM/ 50 Mm HEPES. Después se lavó dos veces, cada lavado de 5 minutos y se le añadió 500 μ L de una solución de PLO (0.1 mg/mL) y se dejó incubando por una noche a 37°C; se lavaron los cubreobjetos con PBS 1X 2 veces, 5 minutos cada lavado posteriormente se añadió nuevamente PBS 1X y se expuso a luz UV durante 15 minutos, se retiró el PBS 1X, se adicionó 500 μ L de PBS1X a cada pozo y se incubó por 45 minutos. a 37°C, posteriormente se adicionó colágena (0.20 mg/mL) (Ver anexo X1) y se incubó por una 1h, al término de esto se les adicionó 350 μ L de medio de cultivo GRD y se incubó nuevamente a 37°C por 1 h.

V.II.2 Obtención de Ganglios de la raíz dorsal

Se obtuvieron embriones de rata Wistar con un tapón vaginal de 14 días, los cuales se colocaron en una solución Ringer (Ver anexo X.1) y se mantuvieron en hielo. Se colocó un embrión en una caja con silicón bajo un microscopio estereoscópico, se le retiró la cabeza y se le colocó en posición semidorsal, se abrió con microtijeras por la zona dorsal hasta que se observó claramente la cadena de ganglios, se cortó la unión entre los ganglios dorsales y los ventrales, se tomó cada ganglio dorsal con pinzas de relojero y se colocaron en un tubo Falcon con solución Ringer. Este procedimiento se repitió para la obtención de ganglios de cada uno de los embriones.

V.II.3 Disgregación de ganglios de la raíz dorsal

Los ganglios que se obtuvieron se centrifugaron a 1000 rpm x 3 minutos, se retiró la solución Ringer y se agregó una mezcla de tripsina-EDTA 0.25 mg/mL (2mL por aproximadamente 160 ganglios) previamente calentada a 37°C. Se incubó a 37°C por 50 minutos, se agregó 5 mL de medio de cultivo GRD y se resuspendió una vez con una pipeta. Se centrifugó a 1000 rpm x 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo GRD, se resuspendió una vez con pipeta y tres veces con pipeta Pasteur y posterior a esto se centrifugó nuevamente a 1000 rpm x 3 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadieron los 3 mL necesarios para resuspender el botón de células y se adicionó NGF (100 ng/mL). Estas neuronas disgregadas se cultivaron en los cubreobjetos con geles obtenidos en la metodología V.II.1.3, se sembraron a una densidad de 1.5 galglios por cubreobjetos y se incubaron por 24 h a 37°C, 5% CO₂.

V.II.4 Ensayo de colapso

Después de 24 h de incubación, se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo GRD (Ver anexo X.2) fresco con 5 ng/mL de NGF y se incubó por 40 minutos. Al término de este tiempo se añadió sema 3A-Fc al medio de cultivo para una concentración final de 500 ng/mL. Como control negativo se mantuvieron los cultivos en el medio con NGF. El colapso de los conos de crecimiento se analizó con un microscopio invertido con contraste de fases y se obtuvieron micrográficas a los tiempos post adición de Sema 3A-Fc: 0', 15', 30' y 45'.

V.II.5 Cultivo de la Línea celular 3T3

Fibroblastos de la línea celular NIH-3T3 se sembraron en caja de cultivo de 10 cm en medio de cultivo para fibroblastos (Ver anexo X.2), a una densidad de 0.5×10^6 células y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 3 días.

Al tercer día se retiró el medio de cultivo, se lavó la caja con PBS 1X, se añadió tripsina-EDTA (0.25mg/ml), y se incubó 37°C por 5 minutos; al término de

este tiempo se observó en el microscopio invertido para verificar que todas las células se hubieran despegado de la caja de cultivo. Se les adicionó medio de cultivo y se lavó la caja tres veces, el medio con las células se colocó en un tubo Falcon, se tomó una alícuota de las células para contarlas en la cámara de Neubauer y el tubo Falcon se centrifugó a 1000 rpm X 5 minutos. Al término de este tiempo se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con la cantidad requerida de medio de cultivo para sembrar 5,000 células en cada cubreobjetos con geles de distinta rigidez, previamente elaborados como se mencionó en el apartado V.II.1.3.

V.II.6 Inmunotinción

A los cultivos de GRD en los cubreobjetos se les adicionó PFA al 7% en una proporción 1:1 con el medio de cultivo en el que se encontraban, se incubó por 10 minutos a 37°C, posteriormente se retiró el PFA y se añadió PFA al 3.5% por 10 minutos más a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y se procedió a realizar la inmunotinción. Los cultivos se incubaron con anti- β -Tubulina diluido 1:100 en suero de cabra 1% / Triton X-100 0.1% / PBS1X, o anti-Vimentina diluido 1:50 en Suero de caballo 1% / Triton X-100 0.1% / PBS1X y se incubó durante toda una noche a 4°C, al término de este tiempo se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS1X y se incubó 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti- IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa 488 en el caso de la inmunotinción para tubulina, y con un anticuerpo anti IgG de cabra conjugado al mismo fluoróforo en el caso de la inmunotinción para vimentina, con una dilución 1:600 en PBS 1X. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos sobre una gota de medio de montaje y se observaron en un Microscopio Confocal (Nikon) con el cual se tomaron micrografías para posteriormente utilizarlas en la medición y análisis del crecimiento axonal y morfología celular.

V.II.7 Tinción de Citoesqueleto

Los cubreobjetos con el cultivo de neuronas GRD previamente fijados en PFA y lavados con PBS1X como se mencionó anteriormente, se incubaron con faloidina-TRITC en una dilución 1:300 en Triton X-100 al 0.1% en PBS 1x. Se incubó durante 30 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno, teniendo el cuidado de eliminar la faloidina de manera adecuada dada su alta toxicidad. Al término de esto, se montó en portaobjetos y se observó en Microscopía confocal, se obtuvieron micrografías que posteriormente fueron utilizadas para medir el área de los conos de crecimiento.

V.II.8 Mediciones y tratamiento estadístico de los datos.

Se utilizaron las micrografías previamente obtenidas de los diferentes cultivos y se midieron los siguientes parámetros: perímetro de los fibroblastos, longitud de axones y área de conos de crecimiento, utilizando el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.), previa calibración de la imagen para obtener el equivalente de pixeles en micrómetros para cada micrografía.

Para cuantificar el efecto de colapso se obtuvo el porcentaje de disminución de los filopodios o el porcentaje de la disminución en el área de los conos de crecimiento usando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de disminución de filopodios} = \left(\frac{(\# \text{ de filopodios al } t=0' - \# \text{ de filopodios al } t= 45')}{\# \text{ de filopodios al } t=0'} \right) \left(100 \right)$$

$$\% \text{ de disminución del area} = \left(\frac{(\text{Área de filopodios al } t=0' - \text{Área de filopodios al } t= 45')}{\text{Área de filopodios al } t=0'} \right) \left(100 \right)$$

Los datos obtenidos de los experimentos por triplicado fueron analizados utilizando una comparación de medias mediante la prueba t-student.

VI. RESULTADOS

VI.1 Estandarización del cultivo de células en geles de poliacrilamida recubiertos con colágena.

Para poder analizar el efecto de la rigidez del sustrato en la respuesta a la semaforina 3A recombinante en neuronas de GRD, primeramente se estandarizó el método de elaboración de sustratos de acrilamida-bisacrilamida en los que la rigidez puede variarse según las concentraciones de ambos componentes (Wang y Pelham, 1998), las concentraciones usadas fueron las previamente reportadas para obtener geles con un grado de rigidez entre 0.15 kPa y 40.4 kPa según las mediciones obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica (Engler y col., 2006).

Una vez obtenidos los geles éstos fueron recubiertos con colágena para obtener un sustrato permisivo para la adhesión y crecimiento celular. Previamente se reportó que la rigidez del sustrato determina la morfología, el grado de extensión, así como la presencia de fibras de estrés, en fibroblastos NIH-3T3 (Pelham y Wang, 1997); de manera que mientras más rígido es el sustrato más extendidas se encuentran las células y contienen mayor cantidad de fibras de estrés. Dado lo anterior, para comprobar la eficiencia en la elaboración de los geles de poliacrilamida primeramente se cultivaron fibroblastos NIH-3T3 sobre geles de poliacrilamida recubiertos con colágena.

Se elaboraron diferentes grados de rigidez, los cuales fueron de 0.15 kPa, 0.32 kPa, 3.43 kPa y 40.4 kPa, se sembraron los fibroblastos y se incubaron por 24hrs. Los geles fijados con PFA 3.5% se sometieron a inmunohistoquímica para vimentina, un filamento intermedio que forma parte del citoesqueleto y que nos permite apreciar la morfología celular, y se capturaron micrografías en microscopía confocal. Se observó que en el sustrato menos rígido (0.15kPa) las células tenían una morfología redondeada y que conforme aumentaba la rigidez las células se

extendían más sobre el sustrato (Figura 8A), al medir el perímetro de las células NIH-3T3 sobre los sustratos de diferente rigidez, se observó un aumento del perímetro conforme se incrementó la rigidez (Figura 8B). Al realizar la prueba t-student para comparar si existían diferencias entre las medias obtenidas en cada condición, se mostró que hay diferencias significativa entre los perímetros de los fibroblastos NIH-3T3 en los diferentes grados de rigidez (* $p < 0.05$, $n = 3$). Estos resultados confirman que el proceso de elaboración de geles de poliacrilamida con diferente rigidez es correcto y que se obtienen sustratos que permiten modular el crecimiento celular.

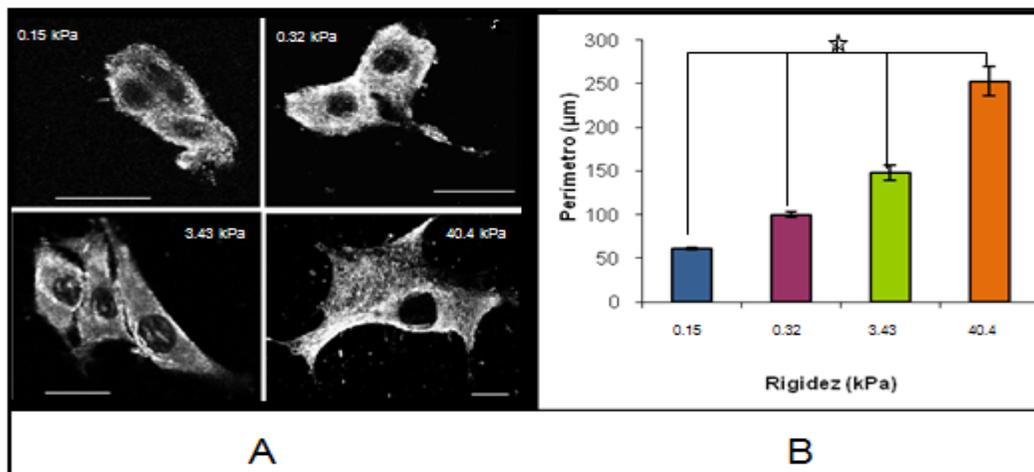


Figura 8. Los fibroblastos NIH-3T3 presentan diferentes grados de extensión sobre geles de poliacrilamida con diferentes grados de rigidez. (A) Fibroblastos de la línea celular NIH-3T3 fueron cultivados sobre geles de acrilamida-bisacrilamida con diferente grado de rigidez y teñidos con un anticuerpo anti-vimentina. Se observa que las células se extienden más conforme aumenta la rigidez del sustrato. (B) El perímetro celular fue medido y graficado para cada grado de rigidez. Se muestra que al incrementar la rigidez del sustrato, señalado en kilopascales (kPa), el perímetro de los fibroblastos aumenta. (* t-student $p < 0.05$, $n = 30$). Barra de calibración = $100 \mu\text{m}$.

Una vez estandarizada la metodología de elaboración de geles de poliacrilamida, se prosiguió a realizar los cultivos de neuronas disgregadas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de embriones de E-14.5 sobre los geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida fueron recubiertos con poli-L-ornithina (PLO) y colágena, ya que previamente se había estandarizado en el laboratorio en

el que se realizó esta tesis, el cultivo de GRD sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con PLO y colágena, y se había observado que el cultivo en ausencia de PLO produce un deficiente crecimiento de las neuronas y un aumento de células gliales y fibroblastos. Los GRD fueron obtenidos, parcialmente disgregados y sembrados sobre geles de poliacrilamida con los diferentes grados de rigidez anteriormente mencionados. Después de 24 h de cultivo se fijaron con PFA y se tiñeron con falloidina-TRITC. Se obtuvieron micrografías en microscopía confocal, en las cuales se midió la longitud de los axones y el área de los conos de crecimiento.

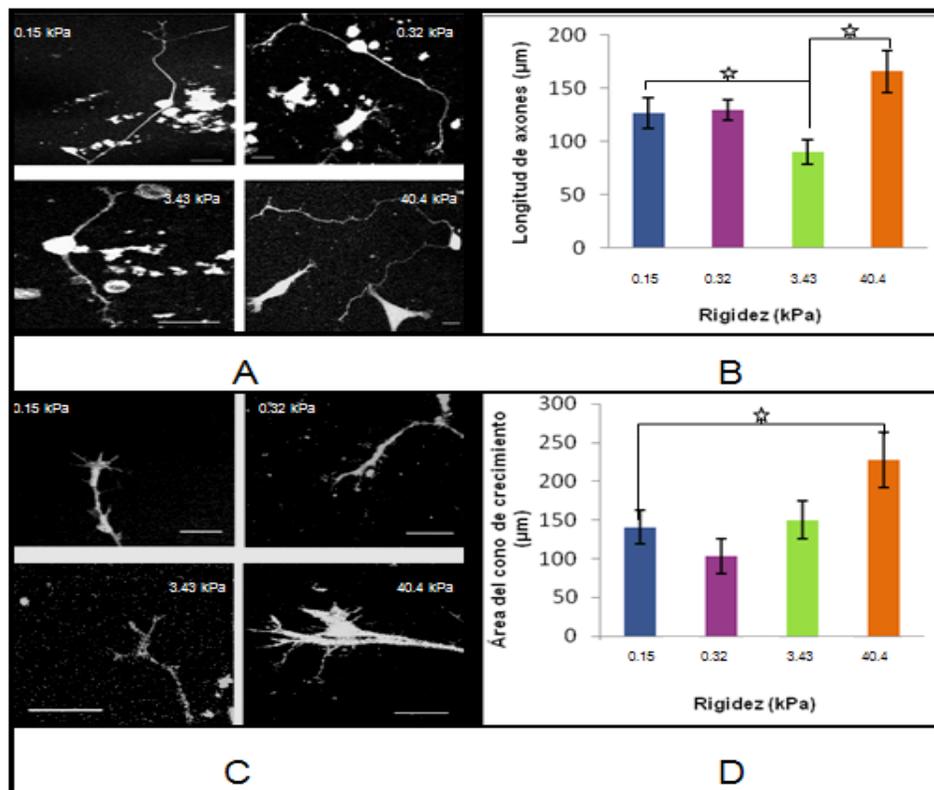


Figura 9. La rigidez del sustrato determina el crecimiento axonal y el área de los conos de crecimiento. GRD obtenidos de embriones de E-14.5, fueron disgregados, cultivadas en sustratos con diferente grado de rigidez y teñidos con falloidina-TRITC (A y C). En las micrografías obtenidas se midió la longitud de los axones (B) y el área de los conos de crecimiento (D). Observamos que al incrementar la rigidez del sustrato también hay un incremento de la longitud de los axones. También se observó un aumento en el área de los conos de crecimientos conforme aumenta la rigidez del sustrato, siendo la diferencia significativa entre el gel de 0.15kPA con el de 40.4kPA. (* t-student $p < 0.05$, $n = 30$). Barras de calibración = 20µm

Se observó que al incrementar el grado de rigidez del sustrato también aumenta la longitud del axón (Figura 9A, B) de manera que en el sustrato más rígido hay un 34% más de crecimiento en comparación con el gel más suave, siendo significativa la diferencia entre los axones de los geles de rigidez de 0.15kPa con los de 3.43kPa y los de 40.4kPa (Figura 9B) (* t-student $p < 0.05$, $n=3$). Por otra parte se observó que también existe una relación entre el grado de rigidez y el área del cono de crecimiento, entre más rígido es el sustrato mayor extensión presentan los cono de crecimiento (Figura 9C), de manera que la diferencia en el área del cono de crecimiento entre el gel de 0.15kPA y el de 40.4kPA fue significativa (*t-student $p < 0.05$, $n=3$) (Figura 9D).

VI.2 Ensayo de colapso en conos de crecimiento de neuronas disgregadas de los ganglios de la raíz dorsal.

Una vez caracterizado el crecimiento axonal y la morfología de los conos de crecimiento de neuronas GRD sobre sustratos con diferente rigidez, se analizó si la rigidez del sustrato afecta la respuesta de colapso de cono de crecimiento ejercido por la Sema 3A-Fc, efecto que ha sido ampliamente caracterizada con anterioridad en neuronas GRD crecidas sobre vidrio (Luo y col., 1993; Aizawa y col., 2001; Brown y col., 2009; Brown y Bridgman, 2009). Como control positivo del ensayo de colapso se utilizaron cultivos de neuronas GRD sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con PLO y colágena. Se realizó el ensayo de colapso con Sema3A recombinante, una proteína quimérica que se encuentra unida al fragmento Fc de la inmunoglobulina humana IgG (Sema 3A-Fc), según la metodología previamente reportada (Bridgman y col., 2001). Previo a la adición de Sema3A-Fc los cultivos se incubaron por 45 minutos con una concentración menor de NGF (5ng/ml) y posteriormente a uno de los cultivos se le adicionó Sema3A-Fc (500ng/ml) directamente en el medio de cultivo, y el otro cultivo (control negativo) permaneció en el medio sin semaforina. Previamente se había probado en el control negativo la adición del fragmento Fc de la inmunoglobulina humana (Ig-Fc) a una concentración semejante a la añadida para la semaforina recombinante sin

observarse ningún efecto de colapso, por lo que se omitió la adición de la inmunoglobulina en los controles negativos. Los cultivos fueron observados bajo microscopía de contraste de fases y se obtuvieron micrografías a los tiempos (t) t=0', t=15', t=30' y t=45', para monitorear el colapso de los conos de crecimiento. Para los geles de poliacrilamida se utilizaron los geles con los diferentes grados de rigidez previamente caracterizados de 0.15kPa, 0.32kPa, 3.43kPa y 40.4kPa.

Para analizar el efecto de la sema3A-Fc en el colapso de los conos de crecimiento se evaluaron dos parámetros: 1) el número de filopodios por cono de crecimiento y 2) el área del cono de crecimiento. Se consideró como colapso una disminución mayor al 50% en el número de filopodios y en el área del cono de crecimiento (Brown y col., 2009).

Los resultados observados en los ensayos de colapso con Sema 3A-Fc fueron los siguientes:

En los cultivos de neuronas GRD sobre cubreobjetos de vidrio; la adición de Sema 3A-Fc produjo la disminución del número de filopodios en un 68.8% (Figura 10B) (Figura 11), y una disminución del área de los conos de crecimiento en un 47.8% a los 45 min de añadida la semaforina (Figura 10B) (Figura 12). Mientras que en el control negativo se observó un porcentaje muy pequeño en la disminución de los filopodios (7.5%) (Figura 10A) (Figura 11) y un aumento del área del cono de crecimiento (74.9%) (Figura 10A) (Figura 12). En el caso de los cultivo tratado con Sema 3A-Fc se observó incluso en algunos casos la retracción del axón (Figura 10B).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 0.15kPa; El control negativo (Figura 10C) no presentó colapso en el cono de crecimiento, al igual que en el ensayo con Sema 3A-Fc (Figura 10D). Se observó incluso un ligero aumento en el porcentaje de filopodios (10.4%) (Figura 11), y en el área de los

conos de crecimiento (7.58%), aunque esta última no en la misma proporción que la observada para el control negativo (37.67%) (Figura 12).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 0.32kPa; tampoco se observó un efecto de colapso por Sema 3A-Fc; El control negativo (Figura 10E) no presentó un cambio significativo en el número de filopodios (14.8% de disminución) al igual que en los cultivos tratados con Sema 3A-Fc (12.5% de disminución) (Figura 10F) (Figura 11). En el caso del área del cono de crecimiento se observó una pequeña disminución en el área de los cono de crecimiento en cultivos expuestos a Sema 3A-Fc (28.23%), aunque está no fue semejante a la observada para los cultivos sobre vidrio (Figura 12). En el caso de los cultivos sin semaforina se observó un aumento en el área del cono de crecimiento (Figura 12).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 3.43kPa; se observó una tendencia a la disminución del número de filipodios en los cultivos tratados con Sema 3A-Fc (23.6%) en comparación con el gel anterior, así como en el área de los conos de crecimiento (Figura 10J); sin embargo el aumento en el porcentaje de cambio no fue suficiente como para ser considerado como colapso (Figura 11, 12), aunque al comparar las medias, éstas no fueron significativamente diferentes al experimento en vidrio. El control negativo (Figura 10G) no presentó tampoco efecto de colapso, e incluso se observó un aumento en el número de filopodios (Fig. 11, 12).

En los cultivos de neuronas GRD sobre gel con una rigidez de 40.4kPa; se observó una tendencia a la disminución del número de filopodios en los cultivos tratados con Sema 3A-Fc (47.7%) en comparación con el gel anterior, así como en el área de los conos de crecimiento (25.15%) (Fig. 10H); sin embargo el aumento en el porcentaje de cambio no fue suficiente como para ser considerado como colapso (Figura 11, 12), aunque como en el caso anterior, la comparación estadística de medias mostró que no existe una diferencia con el experimento

sobre vidrio. El control negativo (Figura 10G) no presentó efecto de colapso (Figura 11, 12).

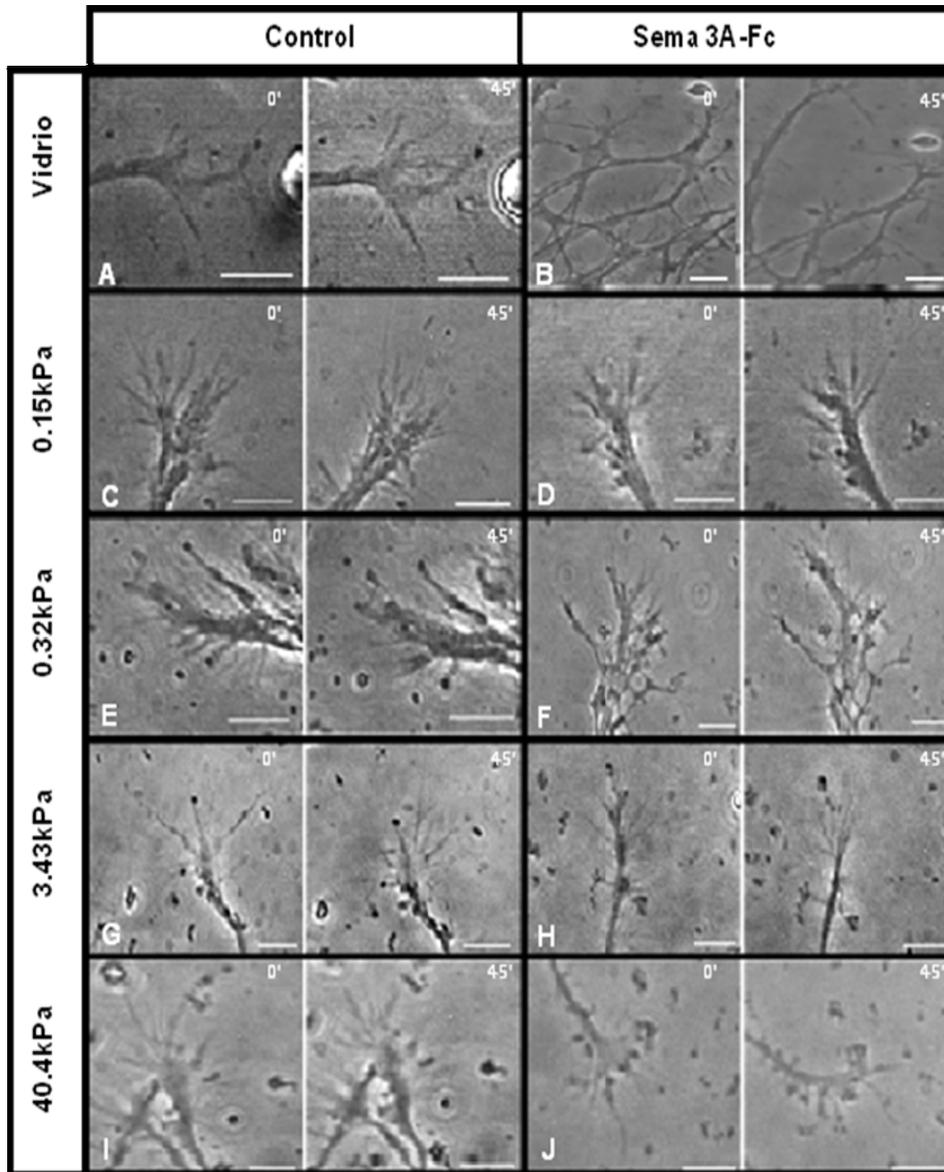


Figura10. Efecto de la Sema 3A-Fc en neuronas GRD cultivadas sobre geles de poliacrilamida con diferente rigidez. Se realizaron cultivos de neuronas GRD sobre cubreobjetos de vidrio o sobre geles de poliacrilamida recubiertos ambos con PLO y colágena y con diferentes grados de rigidez. A los cultivos se les realizó el ensayo de colapso de conos de crecimiento con Sema 3A-Fc (B, D, F, H y J) y se les tomo micrografías a diferentes tiempos, aquí se muestran las micrografías al t=0' y t=45'. Como control negativo se mantuvieron los cultivos en medio basal con NGF (A, C, E, G, I). Se observó que en los sustratos más blandos no hay un efecto de colapso y conforme aumenta la rigidez incrementa el colapso de los conos de crecimiento. Barras de calibración=10µm.

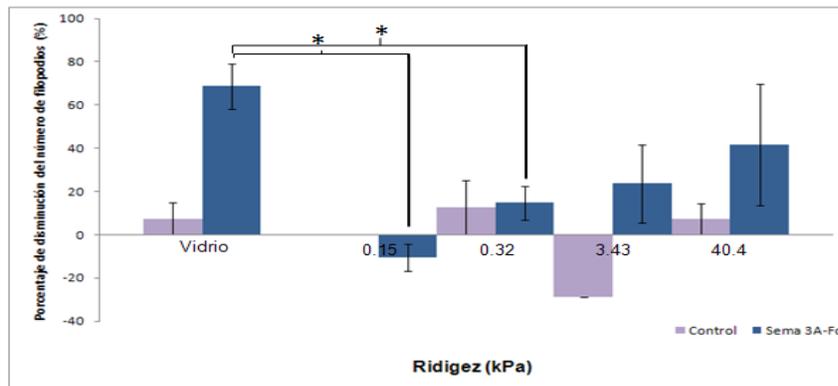


Figura 11. Cuantificación del efecto de colapso mediante la disminución en el número de filopodios por cono de crecimiento. El porcentaje de la disminución del número de filopodios por cono de crecimiento de neuronas GRD, cultivadas en sustratos con diferente grado de rigidez fue medido en micrografías de contraste de fases. Se observa que en los cultivos control no expuestos a Sema 3A-Fc no hay una disminución significativa del número de filopodios. La adición de la Sema 3A-Fc, produjo el colapso de un gran porcentaje (68.8%) de los filopodios en los cultivos en vidrio, mientras que en los sustratos mas blandos de poliacrilamida hay una inhibición del colapso. El porcentaje de colapso de conos de crecimiento tiene una diferencia significativa entre el cultivo en cubreobjetos con el cultivo en gel de 0.15kPa y el gel de 0.32kPa (* t-student $p < 0.05$, $n = 8$).

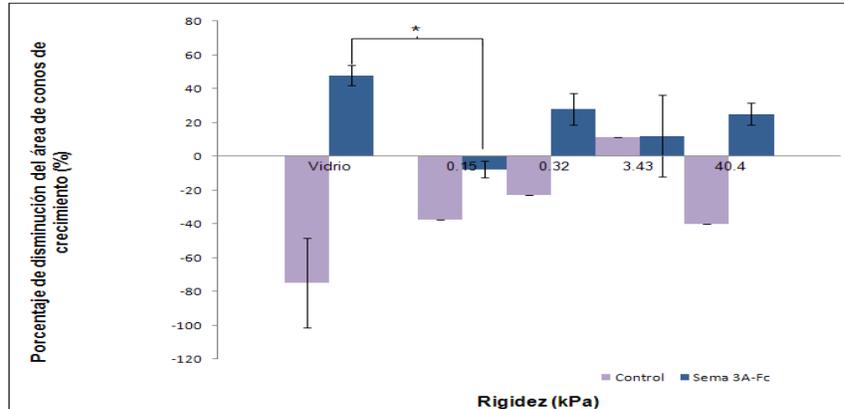


Figura 12. Cuantificación del efecto de colapso mediante la disminución en el área del cono de crecimiento. El porcentaje de cambio del área de los conos de crecimiento de neuronas GRD, cultivadas en sustratos con diferente grado de rigidez fue medido en micrografías de contraste de fases. Los controles sin semaforina no presentaron una disminución del área de cono de crecimiento y existe por el contrario una tendencia al aumento conforme incrementa la rigidez. En el caso de los cultivos tratados con Sema 3A-Fc, se observó una inhibición del efecto de colapso conforme disminuye la rigidez e incluso un aumento en el área del cono de crecimiento (0.15kPa). Se observó también que conforme la rigidez del sustrato aumenta, el porcentaje de colapso en los conos de crecimiento también aumenta. Aunque en todos los casos el porcentaje de disminución del área es menor al 30%.

VII. DISCUSIÓN

En la presente investigación mostramos la manera en qué una de las propiedades mecánicas del sustrato como es la rigidez tiene efectos importantes en neuronas GRD sobre el crecimiento axonal, el área de cono de crecimiento y la respuesta de colapso ante la semaforina 3A. Para llevar a cabo este estudio se eligió un modelo experimental que consiste en el uso de geles de poliacrilamida recubiertos con componentes de matriz extracelular.

Este modelo es uno de los mejor caracterizados (Wang y Pelham, 1998; Dembo y Wang, 1999) y permite modificar parámetros físicos como la flexibilidad sin afectar sus propiedades químicas tales como la concentración de proteínas que confieren la adhesión celular. El uso de sustratos de poliacrilamida nos permitió obtener diferentes grados de rigidez del sustrato al cambiar las proporciones de acrilamida-bisacrilamida con la finalidad de monitorear el comportamiento de las células ante la presencia de una señal mecánica enviada del sustrato a la célula (Guo y col., 2006). Se entiende como rigidez la capacidad de un material de soportar un esfuerzo sin adquirir deformación, la deformación observada cuando se aplica una carga se mide en pascales (Pa, $1\text{Pa}=1\text{N}/\text{m}^2$). La rigidez de un material isotrópico es aquel en el que las propiedades son la mismas en todas direcciones, sin embargo muchos materiales poliméricos y la mayoría de los tejidos biológicos son anisotrópicos es decir que no poseen las misma propiedades en todas direcciones, por ejemplo los ligamentos son más resistentes y rígidos en la dirección de las fibras (longitudinal) que en la dirección transversal (Sastre y col., 2004). Dada la importancia de las propiedades mencionadas en la morfología, crecimiento e incluso diferenciación celular (Discher y col., 2005), se han comenzado a caracterizar estos parámetros en diferentes tejidos.

La resistencia intrínseca de un tejido al aplicar estrés (fuerza/área) es medido mediante el modulo elástico (E), que se obtiene aplicando una fuerza y midiendo el cambio en longitud de un tejido, o mediante microscopía de fuerza

atómica usando micro marcadores que aplican una fuerza micrométrica controlada (Sastre y col., 2004; Discher y col., 2005). En general se ha mostrado que el cerebro es uno de los tejidos más blandos del cuerpo con un módulo elástico de alrededor de 0.5kPa (Elkin y Morrison, 2007), comparado con el músculo (10^4 Pa) (Engler y col., 2006; Discher y col., 2005) o el hueso (10^9 - 10^{10} Pa) (Discher y col., 2005). Se ha reportado que el cerebro de ratas adultas tiene un módulo elástico que varía entre 0.125 y 0.330 kPa (Georges y col., 2006). En la presente tesis la rigidez seleccionada para los geles fue dentro de un rango de 0.15kPa y 40.4kPa, de manera que los sustratos con una rigidez de 0.15kPa y 0.32kPa simulan la rigidez presente en el cerebro, y sustratos más rígidos están cercanos a lo reportado para tejido muscular que varían entre 9 y 21kPa (Georges y col., 2006).

La estandarización de la respuesta ante las señales mecánicas generadas por los diferentes grados de rigidez, usando fibroblastos de la línea celular NIH-3T3, mostró resultados semejantes a los previamente reportados (Wang y Pelham, 1998; Dembo y Wang, 1999), y son consistentes con los mostrados por Guo y col (2006) donde observaron que los fibroblastos son redondeados y compactos en sustratos suaves (2.68kPa). Lo anterior debido a que las adhesiones son débiles y se retraen con facilidad (Lo y col., 2000), favoreciendo una migración más rápida en busca de un sustrato más rígido (durotaxis) (Dembo y Wang., 1999). Por el contrario en sustratos más rígidos los fibroblastos tienden a presentar haptotaxis la cual está mediada por el incremento de miosina II, que al interaccionar con actina produce fuerzas de tensión que aumentan la tracción en el lamelopodio de los fibroblastos (Askt, 2009). También se presentan adhesiones más fuertes con el sustrato debido a un incremento en la expresión de integrina $\beta 5$ (Dembo y Wang., 1999).

Ya que se observaron diferencias significativas entre los cultivos de fibroblastos sobre sustratos con diferente grado de rigidez, proseguimos a observar cómo se modifica el comportamiento de las neuronas GRD en los sustratos anteriormente mencionados recubiertos con poli-L-ornitina (PLO) y colágena. La

adición de PLO se debió a que se ha observado una preferencia de los axones a sustratos con PLO-colágena, ya que la PLO aumenta la estabilidad de las adhesiones (Letourneau, 1995). Se observó que al aumentar la rigidez, tanto la longitud de los axones como el área de los conos de crecimiento se incrementaron. Estos resultados difieren con los observados por Flanagan y col. (2002), en los que reportan que conforme incrementa la rigidez del sustrato disminuye la longitud de los axones en geles de una variación entre 0.150 y 1.65kPa. Esta diferencia puede deberse al tipo de adhesión y a que el gel de poliacrilamida lo recubrieron con poli-D-lisina la cual mantiene una adhesión al sustrato por cargas electrostáticas.

En los resultados obtenidos en esta investigación las neuronas además de tener una adhesión por cargas provista por la PLO, presentan una adhesión mediada por integrinas (receptores a colágena), las cual puede proveer adhesiones más estables y podría ser reguladas por la consistencia del sustrato. Se ha reportado que en sustratos suaves (~ 1kPa) los complejos de adhesión mediados por integrinas son difusos y muy dinámicos, mientras que en sustratos más rígidos (~30-100kPa) las células forman adhesiones mayores y más estables (Pelham y Wang, 1997). La presencia de sitios de adhesión más estables podría explicar la mayor extensión de los conos de crecimiento, una mayor tracción sobre el sustrato y probablemente una elongación mayor de los axones.

La diferencia significativa entre el sustrato de 3.43kPa con el de 40.4kPa es consistentes con el trabajo realizado por Jiang y col. (2008) en el cual realizaron cultivos en geles de entrecruzamiento de DNA con diferentes grados de rigidez (6.6-30kPa) y observaron un decremento del 25% de la longitud axonal en geles con una rigidez menor a 10kPa. En los geles de 0.15kPa y 0.32kPa no observamos una diferencia significativa, esto se puede atribuir a que neuronas GRD crecen *in vivo* en sustratos con un grado de rigidez que varía entre 0.125 y 0.330kPa, lo que sugiere que esta variación puede no ser suficiente para determinar cambios en el comportamiento neuronal.

Al modificar la rigidez del sustrato se observó que también se modula el comportamiento de las neuronas GRD, por esta razón procedimos a observar que efecto tendrían la semaforina 3A recombinante en neuronas crecidas en diferentes sustratos. Para esto se utilizó como control positivo un cultivo de neuronas GRD sobre cubreobjetos recubierto con PLO y colágena, el cual mostró un colapso del 68.8% en los conos de crecimiento, por otra vez la retracción del axón. Esto se puede atribuir a la concentración de Semaforina 3A-Fc empleada (500ng/ml), ya que recientemente Brown y col. (2009) describieron que a concentraciones menores a 600ng/mL los conos de crecimiento de neuronas GRD sólo presentan colapso y no retracción del cono de crecimiento.

La modulación de la rigidez del sustrato influyó en la respuesta de Sema 3A, ya que en los sustratos de 0.15kPa y 0.32kPa no se observó el colapso en los conos de crecimiento; además se observó que conforme incrementaba la rigidez aumentaba la respuesta a la semaforina. Cabe mencionar que, aunque en ninguno de los cultivos sobre geles de poliacrilamida se observó claramente el colapso de los conos de crecimiento según el parámetro establecido, al comparar la rigidez de 0.15kPa con la de 40.4kPa sí se mostró una mayor respuesta en el sustrato más rígido. Mientras más rígido es el sustrato mayor formación de adhesiones y mayor activación de integrinas (Discher y col., 2005), lo anterior hace pensar que estos dos factores podrían inhibir el efecto de colapso de Sema 3A como previamente han mostrado Brown y col. (2009); quienes al aumentar la cantidad de laminina en el sustrato y por tanto los sitios de adhesión y activación de integrinas, previenen el colapso inducido por sema3A.

También se ha reportado que la rigidez del sustrato induce la formación de fibras de actina y activa la contractilidad celular, dos elementos clave en la respuesta de colapso a Sema 3A (Brown y col., 2009). Por otra parte en un sustrato blando las fibras de estrés y la contractilidad son inhibidas (Discher y col., 2005), lo cual podría favorecer la falta de colapso ante la presencia de sema3A. Lo anterior muestra que el mecanismo por el cual la rigidez del sustrato esta modulando la

respuesta de colapso es compleja y podrían residir en un fino balance entre la adhesión y la contractilidad celular.

Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que el comportamiento de las neuronas *in situ* ante Sema 3A podría variar con respecto a los estudios *in vitro*, de manera que las neuronas podrían modificar su respuesta dependiendo de las propiedades mecánicas del tejido. Por ejemplo en el tejido normal o ante una cicatriz glial en la que se observa que Sema 3A impide la regeneración y el crecimiento de los axones (Pasterkamp y Verhaagen, 2000).

Estudio de este tipo serán relevantes también para el diseño de biomateriales con propiedades mecánicas adecuadas que permitan la regeneración neuronal y la respuesta ante los factores presentes en un proceso de cicatrización.

VIII CONCLUSIONES

- La rigidez del sustrato modula la expansión de fibroblastos NIH-3T3 sobre el sustrato.
- La rigidez del sustrato determina el área de los conos de crecimiento y el crecimiento axonal de neuronas de GRD, a mayor rigidez mayor área del cono de crecimiento y mayor longitud axonal.
- La rigidez del sustrato determina el efecto de colapso por la Sema 3A-FC en conos de crecimiento de neuronas de GRD, a mayor rigidez mayor efecto de colapso.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., Yahara, I. 2001. Phosphorylation of cofilin by LIMkinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nature neuroscience*. Vol. 4: 367-373.

Anda, F., Pollarolo, G., Silva, D., Camoletto, P., Feiguin, F., Dotti, C. 2005. Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*. Vol. 436: 704-708.

Anda, F., Dotti, C. 2008. Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *Journal of cell science*. Vol. 121: 178-85.

Antonini, A., Stryker, M. 1993. Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science*. Vol. 260: 1819-1821.

Alzola, R. 2002. www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Documentos/Tejidoepitelial.pdf.

Artigiani, S., Comoglio, P., Tamagnone, L. 1999. Plexins, Semaphorins, and Scatter Factor Receptors: A Common Root for Cell Guidance Signals?. *International union of biochemistry and molecular biology life*. Vol. 48: 477-482

Askt, J. 2009 Physical forces acting in and around cells are fast and making waves in the world of molecular biology. *The scientist*. Vol. 23: 26-33

Ávila, H., Barrio, D., Zhang, R. 2007. Modelando el crecimiento de neuritas. *Revista especializada en ciencias químico biológicas*. Vol. 10: 5-13.

Bridgman, P., Dave, S., Ansnes, C., Tulio, A., Adelstein, R. 2001. Myosin IIB is required for growth cone motility. *The journal of neuroscience*. Vol. 21: 6159-6169.

Brownn, J., Bridgman, P. 2009. The disruption of the cytoskeleton during semaphoring 3A induced growth cone collapse correlates with differences in actin organization and associated binding proteins. *Developmental neurobiology* Vol. 69: 633-646.

Brown, J., Wysolmerski, R., Bridgman, P. 2009. Dorsal root ganglion neurons react to semaphoring 3A application through a biphasic response that requires multiple myosin II isoforms. *Molecular biology of the cell*. Vol. 20: 1167-1179.

Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R., Leung, T., Lim, L., Hall, C. 2004. Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its

target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A induced growth-cone collapse. *Journal of neuroscience*. Vol. 24: 8994-9004.

Campbell, D., Holt, C. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*. Vol. 32: 1013-1026.

Castellani, V., Angelis, E., Kenwrick, S., Rougon, G. 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *The European molecular biology organization*. Vol. 21: 6348-6357

Chan, C., Odde, D. 2008. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*. Vol. 322: 1687-1691.

Chang, R., College, W. 2002. Química. 7^a. ed, Mc Graw Hill, México: 156.

Dembo, M., Wang, Y-L. 1999. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical journal*. Vol. 76: 2307,2313-2314.

Dent, E., Gertler, F. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*. Vol. 40: 209-227.

Dent, E., Tang, F., Kalil, K. 2003 Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist*. Vol. 5: 343-53.

Dickson, B. 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*. Vol. 6: 1959-1963.

Discher, D., Janmey, P., Wang, Y-L. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. Vol. 310: 1139-1143.

Eickholt, B., Walsh, F., Doherty, P. 2002. An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *The journal of cell biology*. Vol. 157: 211-217.

Elkin, B., Morrison, B. 2007. Region-specific tolerance criteria for the living brain. *Stapp car crash journal*. Vol. 51: 127-138.

Engler, A., Sen, S., Sweeney, H., Discher, E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. Vol. 126: 677-689.

Fan, J., Mansfield, S., Redmond, T., Gordon-Weeks, P., Raper, J. 1993. The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *The journal of cell biology*. Vol. 121: 867-878.

Fiore, R., Puschel, A. 2003. The function of semaphorins during nervous system development. *Frontiers in bioscience*. Vol. 8: 484-499.

Flanagan, L., Ju, Y-E., Marg, B., Osterfield, M., Janmey, P. 2002. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport*. Vol. 20: 2411-2415.

Fournier, A., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, G., Strittmatter, S. 2000. Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *The journal of cell biology*. Vol. 149: 411-422.

Georges, P., Miller, W., Meaney, D., Sawyer, E., Janmey, P. 2006. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophysical journal*. Vol. 90: 3012-3018.

Gherardi, E., Love, C., Esnouf, R., Jones, E. 2004. The sema domain. *Current opinion in structural biology*. Vol. 14: 669-678.

Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., Strittmatter, S. 1995. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature*. Vol. 376: 509-514.

Guijarro, P. 2006. Función de Netrina y semaforinas secretables en la guía neuronal y axonal en el hipocampo y el cerebelo. Barcelona. Universidad de Barcelona. Tesis para obtener el título de Doctorado en Biología Celular. 4-37.

Guo, W-H., Frey, M., Burnham, N., Wang, Y-L. 2006. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophysical journal*. Vol. 90: 2213-2220.

Guyton, A., Hall, J. 2001. Tratado de fisiología Médica. 10ª. ed., Mc. Graw. Hill, México: 621-626, 751-753.

Jiang, F., Yurke, B., Firestein, B., Langrana, N. 2008. Neurite outgrowth on a DNA crosslinked hydrogel with tunable stiffnesses. *Annals of biomedical engineering*. Vol. 36: 1565-1579.

Kalil, K., Szebenyi, G., Dent, E. 2000. Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *Journal of neurobiology*. Vol. 44: 145-158.

Kolodkin, A., Matthes, D., Goodman, S. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*. Vol. 75: 1389-1399.

Kolodkin, A., Levenson, D., Rowe, E., Tai, Y-T., Giger, R., Ginty, D. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*. Vol. 90: 753-754.

Kruger, R., Aurandt, J., Guan, K. 2005. Semaphorins command cells to move. *Nature reviews*. Vol. 6: 789-800.

Lauffenburger, D., Wells, A. 2001. Getting a grip: new insights for cell adhesion and traction. *Nature cell biology*. Vol. 3: 110-112.

Letourneau, P., 1975. Cell to substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Developmental biology*. Vol. 44: 92-101.

Lo, C-M., Wang, H-B., Dembo, M., Wang, Y-L. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*. Vol. 79: 144-152.

Luo, Y., Raible, D., Raper, J. 1993. Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*. Vol. 75: 217-227

Martinez, M., Quiroga, N., Castellanos, J. 2000. Subpoblaciones neuronales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomédica*. Vol. 20: 248-249.

McKinley, M., O'Loughlin, D. 2006. academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Nervous%20System.htm

Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., Yanagi, S. 2002. Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *The European molecular biology organization*. Vol. 21: 3274-3285.

Negishi, M., Oinuma, I., Katoh, H. 2005. Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cellular and molecular life sciences*. Vol. 62: 1363-1371.

Palay, S., Sotelo, C., Orkand, P. 1968. The axon hillock and the initial segment. *The journal of cell biology*. Vol. 38: 193-201.

Pasterkamp, R., Verhaagen, J. 2000. Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain research reviews*. Vol. 35: 36-54.

Pelham, J., Wang, Y-L. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 94: 13661-13665.

Polleux, F., Morrow, T., Ghosh, A. 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*. Vol. 404: 567-73.

Ramón, Cajal, S. 1891. Comunicación acerca de la significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de la sustancia gris. *Revista de ciencias médicas de Barcelona*. Vol. 17: 671-679, 715-723.

Ramón, Cajal, S. 1897. Leyes de la morfología y el dinamismo de las células nerviosas. *Revista micrográfica*. Vol. 2: 1-28.

Raper, J. 2000. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Current opinion in neurobiology*. Vol. 10: 88-94

Sastre, R., Aza, S., Román, J. 2004. *Biomateriales*. 2da. ed., Faenza Editrice Iberica, México: 151-171.

Silva, D., Medina, M., Zuloani, C., Nardo, A., Witke, W., Dotti, C. 2003. RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin Ila-mediated control of actin stability. *The Journal of cell biology*. Vol. 162: 1267-1279.

Silva, D., Dotti, C. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature reviews neuroscience*. Vol. 3: 694-704.

Silvera, L., Barrios, C., 2002. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud univorte*. Vol. 16: 9-16.

Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. 1998 Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, Vol. 281: 1515-1518.

Song, H., Poo, M. 1999. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Current opinion in neurobiology*. Vol. 9: 355-363.

Song, H., Poo, M. 2001. The cell biology of neuronal navigation. *Nature cell biology*, Vol. 3: 81-888.

Sundararaghavan, H., Monteiro, G., Firestein, B., Shreiber, D. 2008. Neurite growth in 3D collagen gels with gradients of mechanical properties. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 102: 632-643.

Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M., Goodman, C., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., Comoglio, P. 1999.

Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*. Vol. 99: 71-80.

Tamagnone, L., Comoglio, P. **2004**. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *The European molecular biology organization*. Vol. 5: 356-359.

Terman, J., Mao, T., Pasterkamp, R., Yu, H., Kolodkin, A. **2002**. MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell*. Vol. 109: 887-900.

Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. **1996**. The molecular biology of axon guidance. *Science*. Vol. 274: 1123-1133.

Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., Kikutani, H. **2005**. FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nature neuroscience*. Vol. 8: 1712-1719

Valdembri, D., Caswell, P., Anderson, K., Schwarz, J., König, I., Astanina, E., Caccavari, F., Norman, J., Humphries, M., Bussolino, F., Serini, G. **2009**. Neuropilin 1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *Plos biology*. Vol. 7: 115-132

Ventura, A., Pelicci, P. **2002**. Semaphorins: green light for redox signaling?. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. Vol. 155: 44.

Yeung, T., Georges, L., Flanagan, B., Marg, M., Ortiz, M., Funaki, N., Zahir, M., Weaver, V., Janmey, P. **2005**. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*. Vol. 60: 24-34.

Yu, W., Qiang, L., Solowska, J., Karabay, A., Korulr, S., Baas, P. **2008**. The Microtubule severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches. *Molecular Cell Biology*. Vol. 19: 1485-98.

Wang, Y-L., Pelham, R. **1998**. Preparation of flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods in enzymology*. Vol. 298: 489-496.

Wehrle, B., Imhif, B. **2002**. The inner of focal adhesions. *Trends in cell biology*. Vol. 12: 382-386.

Wolman, M., Liu, Y., Tawarayama, H., Shoji, W., Halloran, M. 2004. Repulsion and attraction of axons by semaphorin3D are mediated by different neuropilins in vivo. *The Journal of neuroscience*. Vol. 24: 8428-8435.

ANEXOS

Soluciones

a. Howard's Ringer (pH 7.2)

Reactivo	Para 1L
NaCl	7.2 g
CaCl ₂	0.17 g
KCl	0.37 g

b. PBS 10X (pH 7.3)

Reactivo	Para 1L
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g

c. PFA 3.5%

Reactivo	Para 1L
Paraformaldehido	35 g
PBS 10X	100 mL
NaOH 5N	1 mL

d. Colágena (0.2 mg/mL)

Reactivo	Para 1mL
Colágena tipo 1 (3 mg/mL)	66 µL

DMEM	934 μ L
10XMEM	2 μ L
NaOH 0.1N	2 μ L

Medios de cultivo

a. Medio de cultivo para fibroblastos

Reactivo	Para 250 mL
DMEM	225 mL
SFB	25 mL
Penicilina / Estreptomicina (10, 000 μ g /mL)	2.5 mL

b. Medio GRD

Reactivo	Para 50 mL
DMEM-F12	25 mL
Opti-MEM	69 mL
Glutamina (200mM)	1 mL
Penicilina/ Estreptomicina (10, 000 μ g/mL)	1 mL
SFB inactivado	0.5 mL
Glucosa 1M	3.5 mL