

167.
2e)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CRECIMIENTO NEURITICO Y FORMACION DE
SINAPSIS EN NEURONAS CULTIVADAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
JAVIER VARGAS SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO FERNANDEZ DE MIGUEL

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Crecimiento neurítico y formación de sinapsis en neuronas cultivadas.

realizado por Javier Vargas Sánchez

con número de cuenta 7817006-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Francisco Fernández de Miguel

Propietario

Dr. Jesús Manuel León Cázares

Propietario

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Suplente

Dr. Octavio Quesada García

Suplente

M. en C. Silvestre Alavez Espidio

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mesa

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

Este trabajo de investigación se lo dedico a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

en especial a el

MAESTRO JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

AGRADECIMIENTOS

A Francisco Fernández de Miguel por la dirección de esta tesis.

A Jesús Manuel León Cázares por su apoyo y ejemplo.

A Guadalupe Sánchez Arredondo y Raúl Vargas Mejía por su apoyo y cariño.

El sistema de registro periódico lo ideó Francisco Fernández de Miguel y fue instrumentado con la ayuda de Gabriel Corkidi, del Centro de Instrumentos de la UNAM y Alejandro González Palacios, de la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma De México.

ÍNDICE

I - RESUMEN.....	2
II - INTRODUCCIÓN.....	4
Componentes de la matriz extracelular.....	5
Papel de la matriz extracelular en la regeneración de neuritas y sinapsis en el SNC.....	6
Regeneración de neuritas y conexiones en neuronas cultivadas de sanguijuela.....	9
Crecimiento de neuronas AP en el embrión y en cultivo.....	12
Tipos de conexiones en el sistema nervioso.....	12
Formación de sinapsis en neuronas de sanguijuela.....	13
III - HIPÓTESIS.....	15
IV - OBJETIVOS.....	16
V - MÉTODOS	
Aislamiento y cultivo de neuronas.....	17
Preparación de las cápsulas ganglionares.....	18
Homogenado enriquecido en laminina de sanguijuela y concanavalina A.....	18
Homogenado crudo del SNC.....	19
Homogenado de cápsulas.....	20
Cuantificación del patrón de crecimiento.....	20
Dinámica de neuronas en crecimiento.....	22
Determinación de los componentes de la matriz extracelular.....	24
Registros electrofisiológicos.....	25

VI - RESULTADOS	
PARTE I. Influencia de la matriz extracelular en los patrones	
de crecimiento de neuronas AP.....	26
Crecimiento de las células AP sobre la cápsula ganglionar.....	26
Crecimiento de las células AP en homogenados de SNC.....	31
Curso temporal de crecimiento.....	36
Análisis cuantitativo del patrón de crecimiento.....	38
Etapas en la formación del patrón de crecimiento.....	42
Determinantes del patrón morfológico de crecimiento.....	44
PARTE II. Influencia del sustrato en el crecimiento y formación	
de sinapsis en neuronas cultivadas.....	50
Patrón de crecimiento de neuronas solas N y AE sobre	
cápsula ganglionar y concanavalina A.....	50
Crecimiento de pares de neuronas N y AE.....	52
Formación de sinapsis entre neuronas N y AE.....	54
VII - DISCUSIÓN.....	56
Efecto del sustrato en el patrón de crecimiento.....	57
Efecto del sustrato en la formación de sinapsis.....	59
VIII - CONCLUSIONES.....	62
IX - BIBLIOGRAFÍA.....	63

ABREVIATURAS

AE - Erectora de los Músculos Anulares (Motoneurona)

AP - Pagoda Anterior (Neurona de función desconocida)

Con A - Concanavalina A

DTT - Ditiotreitól

N - Nociceptiva (Neurona Sensorial)

Rz - Retzius (Neurona que participa en la coordinación del nado)

SN - Sistema Nervioso

SNC - Sistema Nervioso Central

I - RESUMEN

En este trabajo se estudió la influencia del sustrato en el crecimiento y la formación de conexiones en neuronas cultivadas. El estudio, se realizó en neuronas identificadas de sanguijuela, mantenidas en cultivo, en donde crecen y forman conexiones específicas. Las neuronas fueron aisladas rompiendo la cápsula ganglionar y succionandolas una por una. Como sustratos se utilizaron cápsulas ganglionares de las que habían sido retiradas las neuronas, homogenados del SNC, concanavalina A (Con A) y laminina de sanguijuela. En estos sustratos las neuronas empezaron a crecer después de unos cuantos minutos de haber sido sembradas.

De particular interés fue el patrón de crecimiento de las neuronas Pagoda Anterior (AP, de función desconocida). El patrón de las neuronas AP en las cápsulas consistió en dos neuritas dirigidas a extremos opuestos (Fernández de Miguel, 1997), semejante al del día 9 de desarrollo embrionario (Gao y Macagno, 1987). Este patrón fue distinto al de las células de Retzius o de las motoneuronas AE, o al de la misma célula en Con A o laminina. Las células AP crecieron en homogenados crudos del SNC o de cápsulas ganglionares, reproduciendo el patrón de crecimiento en las cápsulas. Sin embargo, el patrón no se reprodujo al sembrar las células sobre plástico o vidrio. La captura periódica de imágenes a intervalos de 2 minutos y su posterior edición a video, mostró una dinámica de crecimiento y reabsorción de neuritas, que dio como producto final las dos neuritas características.

La reproducción del patrón de crecimiento neurítico de las células AP en homogenados crudos, hizo interesante explorar la composición protéica de

los extractos. La incubación de las cápsulas con diferentes proteasas modificó la adhesividad y el patrón de crecimiento de las células AP, lo que sugirió que su patrón es regulado por proteínas de la matriz extracelular. La electroforesis de los homogenados de cápsulas ganglionares en geles de poliacrilamida en gradiente de 3 % a 10 %, dio lugar a 22 bandas con pesos moleculares entre 100 y 1,000 kilodaltones (kDa). Cuando los homogenados se redujeron con ditioneitol (DTT), aparecieron 16 bandas.

Dado que la matriz extracelular de las cápsulas induce patrones similares a los del desarrollo, además de crecimiento dirigido entre pares de células (Fernández de Miguel, 1997), exploramos si también podría influir en los atributos sinápticos. Para ello, comparamos las sinapsis que se establecen en cultivo entre las células sensoriales nociceptivas (N) y las motoneuronas erectoras de los músculos anulares (AE) en distintos substratos. Estas neuronas en el animal forman una sinapsis química, pero en cultivo, al ser sembradas sobre Con A, forman una sinapsis eléctrica. Al sembrar pares mixtos de células N y AE en la misma cápsula, ambas células crecieron con un patrón distinto al de Con A y establecieron contactos. Sin embargo, la conexión fue eléctrica rectificante, similar a la formada en Con A pero distinta a la formada en el ganglio. Estos datos sugieren que el substrato puede influir el patrón de crecimiento de múltiples maneras pero, al menos en este caso, no determina los atributos sinápticos.

II - INTRODUCCIÓN

El funcionamiento del sistema nervioso depende del patrón correcto de crecimiento y conectividad neuronal. De aquí que uno de los problemas de interés en neurobiología es conocer cómo durante el desarrollo y la regeneración del sistema nervioso, una neurona crece hasta sus blancos y establece las conexiones correctas con ellos. En este proceso participan varios elementos que interactúan con la identidad neuronal: moléculas que difunden desde las células blanco y que funcionan como atractores (Ramón y Cajal, 1893; Sperry, 1963) como las netrinas (Serafini et al., 1994; Kennedy et al., 1994), algunos neurotransmisores (Zheng, 1994) y las neurotrofinas (Ernfors et al., 1994; Hoyle, et al., 1993; Diamond et al., 1992); moléculas repelentes como las colapsinas (Luo et al., 1993); moléculas que promueven el crecimiento neurítico, como las de la matriz extracelular (Venstrom y Reichard, 1993; Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992), o que lo inhiben como las fracciones NI-35 y NI-250 en membranas de los oligodendrocitos (Schwab et al., 1993); células y moléculas en puntos intermedios que funcionan como guía (Kuhn et al., 1995); y la actividad eléctrica (Hubel et al., 1977; Shatz y Stryker, 1978) que es necesaria para la formación de patrones precisos de conectividad (Stryker y Harris, 1986).

Aunque cada uno de los elementos anteriores presenta características que los hacen interesantes por sí mismos, el presente estudio se enfocó en las moléculas de la matriz extracelular, sustrato sobre el cual muchas neuronas crecen y forman sinapsis durante su desarrollo y regeneración. Parte de su interés radica en que posiblemente, la interacción entre la neurona y la matriz

extracelular genera las primeras señales que las células reciben después de la última división mitótica.

La matriz extracelular es una red de macromoléculas que está en el espacio extracelular de los tejidos y se compone de proteínas y polisacáridos ensamblados de manera organizada. Anteriormente se pensaba que la matriz extracelular servía principalmente como un andamiaje inerte para estabilizar la estructura física de los tejidos. Ahora está claro que tiene un papel mucho más activo y complejo, ya que influye a las células en su desarrollo, migración, proliferación, forma y funciones metabólicas.

Componentes de la matriz extracelular

Los elementos de la matriz extracelular se clasifican en: glucosaminoglucanos (que generalmente se unen a proteínas y forman proteoglucanos); proteínas estructurales como la colágena y la elastina, y proteínas de adhesión como la laminina y la fibronectina (Alberts et al., 1989). En la matriz extracelular, la fase acuosa del gel de polisacáridos permite la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células de los tejidos; las fibras de colágena la fortalecen y organizan; la elastina le da flexibilidad y las proteínas de adhesión ayudan a las células a adherirse a ella.

Los glucosaminoglucanos son cadenas de polisacáridos sin ramificar, compuestas de unidades de disacáridos repetidos, que contienen un aminoazúcar (N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina). Los grupos carboxilo y los grupos sulfato de los azúcares, generan una carga negativa intensa que atrae una nube de cationes hidratados, lo que produce un gel en el que las proteínas están embebidas. Los principales grupos de

glucosaminoglucanos son los sulfatos de heparano, de condroitino, de keratano y de dermatano. Estos al unirse a proteínas forman los proteoglucanos. El ácido hialurónico es un glucosaminoglucano que no se une a ninguna proteína.

Hay una variedad de moléculas de la matriz extracelular que promueven el crecimiento neurítico (Tabla 1) (Venstrom y Reichard, 1993; Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992). Estas incluyen a la laminina, la fibronectina, la tenascina, y la trombospondina. Estas glucoproteínas se componen de dos o más cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Cada subunidad tiene partes estructurales repetidas y algunas de ellas se encuentran en varias glucoproteínas del grupo (Fig. 1).

Papel de la matriz extracelular en la regeneración de neuritas y sinapsis en el SNC

Las neuronas en el sistema nervioso periférico pueden regenerar con éxito axones seccionados en el organismo y frecuentemente logran recuperar la función (Guth, 1956), en contraste, el SNC difícilmente regenera (Manthorpe et al., 1983). Uno de los requisitos para que haya regeneración es que las neuronas dañadas se encuentren en un ambiente favorable para que las neuritas puedan avanzar. La matriz extracelular de los injertos del sistema nervioso periférico, favorece la regeneración axonal de neuronas del SNC (David y Aguayo, 1981). El crecimiento de los axones de neuronas del SNC tiene lugar a través de la matriz extracelular de nervios periféricos con la cual están en contacto. Los elementos de la matriz extracelular, en particular las glucoproteínas, pueden constituir una familia de agentes promotores de

Tabla 1 - Efecto de las moléculas de la matriz extracelular en el crecimiento neurítico.

Moléculas de la Matriz Extracelular		Receptores en la membrana celular	Papel en el crecimiento neurítico
Proteínas de Adhesión	Lamininas	Integrinas: alfa1beta1; alfa2beta2; alfa3beta1; alfa6beta1; alfa7beta1; alfaVbeta3; alfa6beta4 y proteoglicanos.	Promueven la regeneración de neuronas centrales y periféricas en cultivo (Reichardt y Tomaselli, 1991; Mantorpe et al., 1983).
	Fibronectina	Integrinas: alfa1beta1; alfaVbeta3; alfaVbeta6; alfa3beta1; alfa5beta1; y proteoglicanos	Uno de los dominios permite la adhesión y la migración de células de la cresta neural y el crecimiento neurítico de neuronas periféricas (Hynes, 1992).
	Tenascinas	Integrinas: alfaXbeta1, y proteoglicanos.	Se expresan en los caminos por donde migran las células de la cresta neural, en los caminos de nervios periféricos y en diversas regiones del SNC durante el desarrollo (Venstrom y Reichardt, 1993).
	Trombospondina	Integrinas: alfaVbeta3, alfaVbetaX, alfaXbeta1 y proteoglicanos.	Participa en la migración celular y el crecimiento neurítico (Neugebauer et al., 1991). Puede actuar como modulador de algunas neurotrofinas, como el factor beta de crecimiento transformante (Murphy-Ullrich et al., 1992).
	Colágenas	Integrinas y ácido hialurónico.	La colágena IV se ensambla en una red y forma la estructura central de la lámina basal. Los tipos I y IV promueven el crecimiento neurítico en cultivo (Reichardt y Tomaselli, 1991).
Proteínas Estructurales	Colágenas Elastina		Las fibras de colágena fortalecen y ayudan a organizar la matriz extracelular y las moléculas de elastina le dan flexibilidad (Alberts et al., 1989).
Proteoglicanos	Sulfato de heparano (Perlecano)		Solo o en asociación con la laminina promueve el crecimiento neurítico (Hantas-Ambrose et al., 1987).
	Sulfato de Condroitino (Neurocano)		Se expresa sólo en el sistema nervioso y puede auxiliar en el desarrollo de la corteza y en el encuentro de los blancos neuronales (Sheppard A., 1991; Rauch et al., 1992).
	Sulfato de Dermatano (Deconina)		Se expresa en zonas donde hay daño o enfermedad en el sistema nervioso y se propone que inhibe la síntesis de matriz la cual causa la enfermedad (Border et al., 1992).
Acido hialurónico			Se propone que participa en la migración neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso, porque aparece en grandes cantidades en este periodo y después es degradado (Alberts et al., 1989).

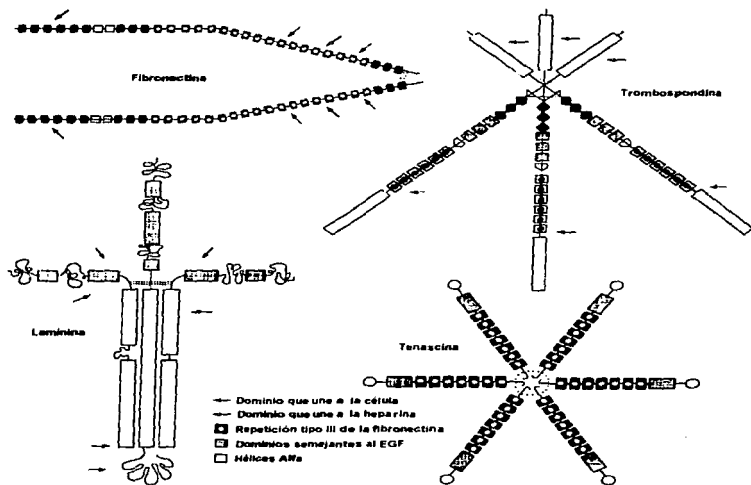


Figura 1 - Proteínas de adhesión de la matriz extracelular. Estas glucoproteínas consisten de dos o más subunidades polipéptidicas unidas por puentes disulfuro (líneas punteadas). La fibronectina y la tenascina presentan varias repeticiones del tipo III de la fibronectina. La laminina, la tenascina y la trombospondina tienen varias repeticiones de los dominios parecidos al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Modificado de Lander (1989) y Nicholls et al., (1992).

neuritas que operan por contacto (Manthorpe et al., 1983). En el organismo, el papel de la matriz extracelular en el crecimiento y en la formación de sinapsis, ha sido difícil de evaluar por la gran complejidad estructural y funcional del sistema nervioso (SN). Sin embargo, los estudios realizados en preparaciones de vertebrados e invertebrados, mediante el bloqueo selectivo de moléculas de adhesión de la matriz extracelular no detienen totalmente el crecimiento, por lo que se ha postulado la acción concertada de múltiples moléculas (Bixby et al., 1988; Chiquet et al., 1988; Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992). Los estudios para conocer las interacciones entre tales elementos, han estado limitados por la presencia de otras familias moleculares. Además al intentar llevar a cabo el análisis de una familia de moléculas en el embrión, se tiene la dificultad de que existen interacciones con otras células y con factores solubles. Por estas razones, una alternativa ha sido utilizar substratos nativos en los que la matriz extracelular se mantiene intacta, pero las neuronas al ser sembradas en ellos, están libres de interacciones con otras células o factores solubles (Fernández de Miguel, 1997). Esto se ha logrado sembrando neuronas identificadas en cápsulas ganglionares, que permiten tener una preparación de estudio rica en matriz extracelular y que es intermedia entre el organismo y el cultivo. Otra alternativa ha consistido en utilizar neuronas cultivadas en substratos de composición conocida.

Regeneración de neuritas y conexiones en neuronas cultivadas de sanguijuela

Para nuestro estudio, el sistema nervioso de la sanguijuela ofrece la ventaja de poder aislar diferentes tipos de neuronas identificadas (Ready y

Nicholls, 1979; Dietzel et al., 1986) que en cultivo conservan su capacidad de regeneración, ya que crecen (Zhang y Nicholls, 1983; Chiquet y Acklin, 1986) y forman conexiones específicas (Ready y Nicholls, 1979; Fuchs et al., 1981; Nicholls, 1987). El sistema nervioso de la sanguijuela, se compone de una cadena longitudinal de 32 ganglios. Cuatro de ellos están fusionados en la parte anterior y siete en la parte posterior. A los 21 ganglios restantes se les llama ganglios intermedios (Payton, 1981) (Fig. 2A) y son casi idénticos entre sí, a excepción de el quinto y el sexto que participan en la reproducción (Macagno, 1980). Cada ganglio contiene alrededor de 400 neuronas que controlan casi de manera independiente el segmento que corresponde (Fig. 2B).

Los estudios con neuronas identificadas del sistema nervioso de la sanguijuela, han mostrado que el contacto de la neurona con un sustrato particular, determina un patrón de crecimiento característico (Chiquet y Acklin, 1986; Grumbacher-Reinert, 1989). En Con A se forman neuritas lamelares cortas, curvas y muy ramificadas, mientras que en laminina de sanguijuela las neuritas son largas, rectas y menos ramificadas. La tenascina induce un crecimiento semejante al de la Con A (Masuda-Nakagawa y Wiedemann, 1992). Los extractos de laminina y tenascina promueven patrones de crecimiento característicos para cada uno de ellos. Estos patrones correlacionan bien con el crecimiento neurítico en los nervios conectivos y periféricos o en el neurópilo respectivamente, donde se encuentran estas proteínas.

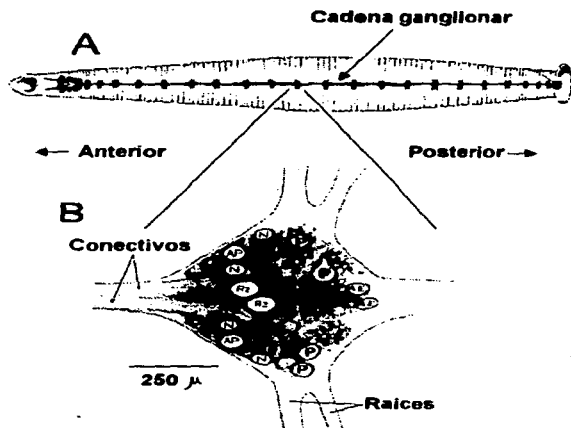


Figura 2 - A) Cadena ganglionar que forma el sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*; B) Algunas de las neuronas identificadas de uno de los ganglios. La distribución neuronal es muy estereotipada. Rz = célula de Retzius; AP = células pagoda anterior; AE = motoneurona erectora de anillos corporales; T, P, N = células sensoriales al tacto, presión y estímulos nociceptivos en la piel.

Crecimiento de neuronas AP en el embrión y en cultivo

Para este estudio las neuronas Pagoda Anterior (AP) de función desconocida (Sunderland, 1980) fueron de particular interés por su capacidad de regenerar proyecciones neuríticas en cultivo (Fuchs et al., 1981). Durante los días 9 y 10 del desarrollo generan proyecciones longitudinales que crecen por los nervios conectivos hacia los ganglios vecinos anterior y posterior. Estas proyecciones posteriormente se retraen, y únicamente prevalecen las proyecciones contralaterales hacia blancos periféricos no identificados (Gao y Macagno, 1987). Un patrón similar se ha reproducido al cultivar neuronas AP en cápsulas ganglionares (Fernández de Miguel, 1997), lo que sugiere que las moléculas de la matriz extracelular proveen la información que determina los aspectos iniciales del patrón de crecimiento de estas neuronas.

En la primera parte de este trabajo se cuantificó el efecto de los sustratos nativos sobre el patrón de crecimiento neurítico. Para esto, se sembraron neuronas identificadas en cápsulas ganglionares y se analizaron variables del crecimiento tales como la longitud total de las neuritas, su ramificación, su número y la distribución de sus neuritas. Como controles se utilizaron neuronas que crecieron sobre Con A y laminina de sanguijuela. Para hacer un estudio detallado del patrón de crecimiento, se tomaron imágenes de algunas de estas neuronas a intervalos de dos minutos.

Tipos de conexiones en el sistema nervioso

A las conexiones que establecen las neuronas se les llama sinapsis. Las sinapsis químicas se componen de una terminal presináptica, una terminal postsináptica y la hendidura sináptica. En éstas, la información fluye mediante un neurotransmisor que es secretado por la terminal presináptica y que

difunde hasta la terminal postsináptica. Las sinapsis químicas pueden ser inhibitoras o excitadoras. La diferencia entre ambas es el tipo de conductancia activada en la membrana postsináptica por el neurotransmisor. Las ventajas que pueden tener las sinapsis químicas son la posibilidad de neuromodulación, facilitación, depresión y potenciación postetánica, entre otras (Nicholls et al., 1992).

En 1959 Furshpan y Potter descubrieron las sinapsis eléctricas. En ellas las membranas celulares de dos neuronas están unidas por conexones que tienen un poro central por el que fluye la corriente entre las dos células. En algunas sinapsis eléctricas la corriente pasa de igual manera entre dos neuronas en ambos sentidos, a estas se les llama sinapsis eléctricas no rectificadoras; en otras sinapsis eléctricas, hay rectificación, es decir, la corriente hiperpolarizante fluye en ambos sentidos, pero la despolarizante fluye en uno solo. Hay también sinapsis con doble rectificación en las que la corriente despolarizante pasa en ambos sentidos pero la hiperpolarizante pasa muy poco (Nicholls et al., 1992). Es posible que las sinapsis eléctricas tengan algunas ventajas funcionales sobre las sinapsis químicas. El retardo sináptico presente en las sinapsis químicas pero ausente en las sinapsis eléctricas puede ser importante en conductas de escape o tener relevancia en la sincronización de grupos neuronales (Nicholls et al., 1992).

Formación de sinapsis en neuronas de sanguijuela

La especificidad en la formación de las conexiones entre dos neuronas cultivadas de sanguijuela es específica. Las células de Retzius forman sinapsis eléctricas no rectificadoras con muchos de sus blancos, mientras que

las células P y N forman, generalmente, sinapsis eléctricas rectificantes. Lo anterior muestra que los atributos sinápticos pueden ser determinados por la identidad neuronal (Nicholls, 1987; Fernández de Miguel y Drapeau, 1995). Sin embargo, las conexiones formadas en cultivo pueden diferir de las que se dan en el animal. En cultivo no se reproducen todos los patrones sinápticos del animal, y en ocasiones pueden aparecer nuevas conexiones (Fernández de Miguel y Drapeau, 1995). Por ejemplo las células de Retzius en cultivo, forman sinapsis químicas que no se han registrado en el animal (Liu y Nicholls, 1989).

Si como en los ejemplos anteriores, el patrón correcto de conectividad no está determinado únicamente por las células que entran en contacto, sería factible que el substrato también influyera los atributos de las sinapsis formadas. Esta posibilidad se probó en la segunda parte de este trabajo. Para ello se usaron neuronas sensoriales nociceptivas (N) y motoneuronas erectoras de los anillos corporales (AE). Estas neuronas están conectadas en el animal por una sinapsis química excitadora (Stuart, 1970), pero en cultivo con un sustrato con base en poli-L-lisina o Con A, forman una sinapsis eléctrica rectificadora (Viklicky y Nicholls, 1988). Como sustratos se utilizaron cápsulas ganglionares y Con A. En estos sustratos se sembraron neuronas solas o en pares y la formación de las sinapsis se probó mediante registro intracelular simultáneo en ambas neuronas.

III - HIPÓTESIS

El funcionamiento del SN depende del que las neuronas crezcan y se conecten correctamente durante su desarrollo o regeneración. Si la interacción con la matriz extracelular genera las primeras señales que las células reciben después de la última división mitótica en el desarrollo o durante la regeneración del SNC, esta interacción puede ser determinante en la morfofisiología celular, en particular en la formación de los patrones de crecimiento y en la conectividad neuronal.

IV - OBJETIVOS

1) Reproducir los patrones de crecimiento de las neuronas AP entre los sustratos nativos, la laminina de sanguijuela y Con A.

2) Realizar una caracterización cuantitativa de los patrones de crecimiento que presentan las neuronas AP, por la influencia de la matriz extracelular en los sustratos nativos y de la laminina de sanguijuela.

3) Realizar un estudio bioquímico preliminar para conocer los elementos de la matriz extracelular en los sustratos nativos, que intervienen en la formación de los patrones de crecimiento neuronal.

4) Determinar si el sustrato influye los atributos sinápticos.

V - MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de neuronas

Con el objeto de tener neuronas identificadas de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, la cadena ganglionar del sistema nervioso se aisló y se fijó sobre un plato con silicón, que contenía medio de cultivo Leibowitz-15 (L-15, Gibco), glucosa (6 mg/ml), gentamicina (0.1 mg/ml) (Schering Corp.) y suero bovino fetal inactivado con calor (Sigma). La cápsula ganglionar se rompió con pinzas, dejando el paquete neuronal expuesto. La cadena se incubó una hora en medio de cultivo y una mezcla de las enzimas colagenasa y dispasa (2mg/ml; Boehringer-Mannheim, Corp.) (Dietzel, et al., 1986). Posteriormente los ganglios se lavaron con medio de cultivo sin las enzimas. Las células AP, Retzius, N y AE se identificaron por sus posiciones y tamaños en el ganglio, se aislaron individualmente por aspiración mediante una pipeta de succión y se lavaron en medio de cultivo. Para cultivar las neuronas, los substratos utilizados fueron: cápsulas ganglionares, homogenados del SNC de la sanguijuela, laminina de sanguijuela, Con A o el plato de cultivo directamente. Los homogenados, la laminina de sanguijuela y la Con A se incubaron durante 2 h en el plato de cultivo antes de sembrar las células. Posteriormente, el plato de cultivo se lavó tres veces con agua desionizada estéril y se agregó medio L-15 sin suero bovino fetal. Las neuronas se sembraron una por una con una pipeta de succión. Para estudiar la formación de sinapsis se sembraron pares de células N y AE a distancias menores de 300 μm en las cápsulas y en Con A. En todos los casos el cultivo se hizo a 18° C y después de 12 h el medio se reemplazó por medio de cultivo con suero bovino fetal.

Preparación de las cápsulas ganglionares

Se rompió la cubierta de los ganglios y se removió el paquete neuronal completo con el objeto de obtener la cápsula libre de células (Fernández-de-Miguel, 1997). Las cápsulas se incubaron durante 30 minutos en solución fisiológica para sanguijuela, que contenía 0.2% de tritón X-100 (Sigma), luego se lavaron varias veces en medio de cultivo con 1 mg/ml de gentamicina y se transfirieron a un caja con fondo de vidrio, asegurándose de que la cara interior del tejido estuviera hacia arriba. Para adherir el tejido al fondo de los pozos, se retiró el líquido y el tejido se secó con aire por exposición al flujo laminar unos minutos. Las neuronas se sembraron en la cara interna de las cápsulas ganglionares.

Homogenado enriquecido en laminina de sanguijuela y concanavalina A

Para la preparación de la laminina se utilizó el método descrito por Chiquet y Acklin (1986). Se transfirió la cadena ganglionar de una sanguijuela a 100 μ l de una solución de tritón al 0.2%, tris-HCl 100 mM, pH 7.4 con los inhibidores de proteasas: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM y de N-etilmaleimida (NEM) 5 mM (todos de Sigma) a 4° C. Se trituraron los ganglios con pinzas y se homogeneizó la muestra con 70 golpes en un homogeneizador Potter-Elvehem. La muestra se transfirió a un vial de vidrio, se le agregaron 400 μ l de la solución anterior y se mantuvo 24 h a 4° C con agitación constante. Al siguiente día se transfirió la muestra a un tubo eppendorf y se centrifugó durante 3 minutos a 11,000 rpm a 4° C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado tres veces con 0.5 ml de una solución fría de tris-HCl 10 mM a pH 7.4. Entre cada lavado se centrifugó la muestra

durante 3 minutos a 11,000 rpm a 4° C. Después del último lavado se resuspendió el precipitado en 50 µl de solución recién preparada de tris-HCl 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M y ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) 10 mM, a 4° C. La muestra se transfirió a un frasco de vidrio y se dejó 24 h a 4° C en agitación constante. Al día siguiente se transfirió a un tubo eppendorf de 500 µl y se centrifugó 3 minutos a 11,000 rpm, a 4° C. El sobrenadante se separó y se utilizó como sustrato para sembrar neuronas o se almacenó a -70° C. La cantidad de proteína en estos homogenados fue de 0.61 µg/µl, determinada por el método de Bradford (1976). Los platos de cultivo se incubaron con 5 µl del sobrenadante (laminina de sanguijuela). La Con A (Sigma) se preparó en solución con 2 µg/µl (Chiquet y Acklin, 1986). Para la siembra de las neuronas se usaron 20 µl.

Homogenado crudo del SNC

Para su preparación, se transfirió la cadena ganglionar de una sanguijuela a 100 µl de la solución con inhibidores de proteasas descrita anteriormente. La muestra se homogeneizó en cristal y se mantuvo 24 h a 4° C con agitación constante. Al día siguiente se centrifugó por 3 minutos a 11,000 rpm a 4° C y se desechó el sobrenadante. El botón se lavó con tris-HCl 10 mM a pH 7.4 y se resuspendió en 50 µl de tris-HCl 10 mM, pH 7.4. La cantidad de proteína en estos homogenados fue de 2.37 µg/µl, determinada por el método de Bradford. Para la siembra, los platos de cultivo se incubaron con 5 µl del homogenado.

Homogenado de cápsulas

Para la preparación de los homogenados de cápsulas, se fijó la cadena ganglionar sobre un plato de silicón con medio de cultivo. Se abrieron los ganglios, se extrajo el paquete de neuronas completo y se cortaron los nervios conectivos y las raíces. La cadena con las cápsulas vacías se lavó con una solución, de tritón 0.2% por 1 h. Las cápsulas se separaron de los conectivos y se transfirieron a 50 μ l de la solución con los inhibidores de proteasas antes descrita, en la que se homogeneizaron. El resto del procedimiento fue igual que para el homogenado crudo. La cantidad de proteína en estos homogenados fue de 0.17 μ g/ μ l, determinada por el método de Bradford. Como sustrato se utilizaron 5 μ l del homogenado de cápsulas.

Cuantificación del patrón de crecimiento

El patrón de crecimiento de las células AP se analizó cuantitativamente midiendo la longitud total de sus neuritas cada 12 h, el número de puntos de ramificación y el número y la distribución de las neuritas principales. Para ello se tomaron imágenes digitales mediante un analizador de imágenes y se almacenaron en disco para su procesamiento. Para el análisis de la longitud total de crecimiento, los puntos de ramificación y el número de neuritas principales, se midieron estas variables, cada doce horas, y se graficaron en función del tiempo. Para el análisis de la distribución neurítica, se midió el ángulo en que crecieron las neuritas principales y se graficó la densidad de las neuritas en función de estos ángulos. Para esto se tomó una de las neuritas como referencia y su orientación se definió como cero grados (Fig. 3A). La orientación de la siguiente neurita se midió siguiendo el sentido contrario de

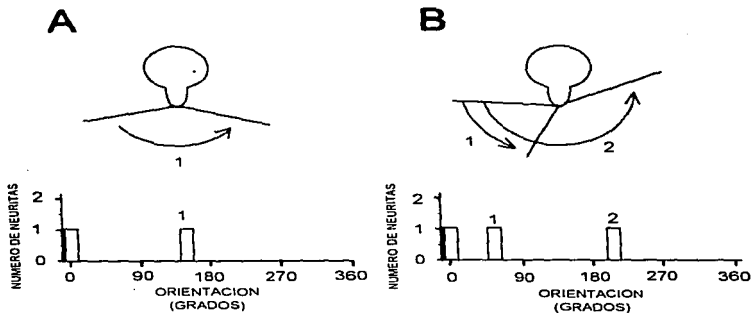


Figura 3 - Método de medición de la distribución de las neuritas primarias.
 A) Una neurita se tomó como referencia y a partir de ella se midió el ángulo más pequeño a la siguiente, en el sentido opuesto a las manecillas del reloj.
 B) En caso de haber más de dos neuritas, se tomó el ángulo más pequeño para definir la referencia, que fue común para todas las mediciones.

las manecillas del reloj. Cuando se generaron tres o más neuritas se tomó como referencia la neurita que creció con el menor ángulo con respecto a cualquier otra; a dicha neurita se le asignó un valor de cero grados y la orientación de las siguientes neuritas se midió siguiendo el sentido contrario de las manecillas del reloj (Fig. 3B). Los datos se expresaron como histogramas de distribución a intervalos de 20 grados. A partir de éstos se hicieron los ajustes binomiales a las distribuciones mediante el programa PSTAT (Axon Instruments, INC.).

Dinámica de neuronas en crecimiento

Para analizar los patrones de crecimiento de manera detallada, varias neuronas se sometieron a un sistema de grabación periódica, diseñado a partir de un analizador digital de imágenes. Este sistema se instrumentó generando una función macro en el analizador de imágenes. El macro activa una serie de comandos para grabar en la computadora la imagen digital de una preparación del microscopio. Primero, un comando genera una señal de 5 voltios en uno de los puertos de la tarjeta del programa, esta señal activa un relevador que enciende la lámpara del microscopio por cinco segundos (tiempo en el que se estabiliza la intensidad de la luz). Posteriormente se activa otro comando que adquiere y graba digitalmente la imagen. Al final de este periodo se apaga la lámpara del microscopio. Otro comando mantiene en espera a la computadora el tiempo necesario para reiniciar cada dos minutos o a intervalos programables. De esta manera, cada dos minutos y durante 12 h se registraron imágenes de las neuronas en crecimiento (Fig. 4). Estas imágenes se procesaron digitalmente para mejorar su calidad.

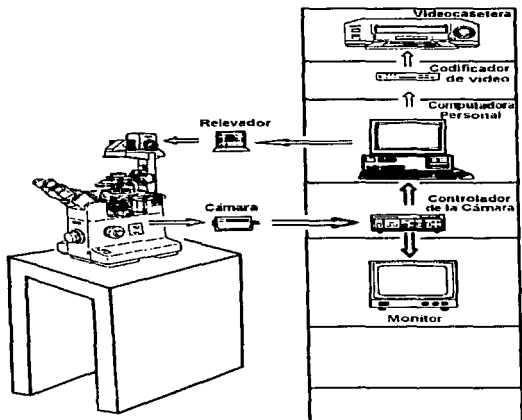


Figura 4 - Sistema analizador de imágenes. Las imágenes obtenidas al microscopio fueron captadas por una cámara CCD, digitalizadas y almacenadas en disco. Para registros periódicos, la computadora controló el encendido de la luz mediante la activación de un relevador. Las secuencias de imágenes fueron compactadas y gravadas en video mediante un codificador.

Para su procesado, otra función macro restauró secuencialmente cada imagen, la contrastó y resaltó digitalmente algunos detalles. Las imágenes procesadas se editaron en un video en el que pasan secuencialmente a una frecuencia de dos por segundo. En la película se observó el crecimiento de la neurona en un tiempo que permitió percibir los cambios más importantes. Con este sistema de grabación periódica se registraron paso a paso las etapas del crecimiento, lo que fue fundamental para su estudio detallado.

Determinación de los componentes de la matriz extracelular

Los perfiles protéicos de los homogenados crudos del SNC y de las cápsulas ganglionares, fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS; Laemmli, 1970). Se utilizó un gel en gradiente del 3% al 10%, en el que se resolvieron bandas de 100 a 1,000 kDa. Los homogenados también se trataron con ditioneitol (DTT) 0.066 M, para separar las subunidades polipeptídicas. Se usaron marcadores de peso molecular de 14.3 a 200 kDa (Gibco), laminina de ratón (Boehringer-Mannheim) que tiene un peso molecular de 900 kDa y sus polipéptidos que después de la reducción con DTT pesan 220, 230 y 400 kDa. La electroforesis se realizó en una cámara para geles verticales (Hoefer). Los geles se tiñeron con un compuesto fluorescente con capacidad de detección de 7 a 2 ng de proteínas por banda (SYPRO, Molecular Probes). El gel se iluminó con una lámpara de luz ultravioleta y se fotografió con una cámara polaroid con película blanco y negro. Posteriormente, la imagen se digitalizó y se procesó con el editor de imágenes photofinish (Zshoft, Co.).

Registros electrofisiológicos

Con el objeto de asegurar la identidad y las condiciones de salud de muchas de las células se realizaron registros intracelulares. La formación de las sinapsis entre los pares N-AE se estudió mediante registro intracelular simultáneo de ambas células. Antes del registro, la concentración extracelular de calcio se aumentó a 10 mM para incrementar la transmisión en las posibles sinapsis químicas en los pares de células. Los microelectrodos se formaron estirando tubos capilares de 1mm de diámetro con un estirador de micropipetas (Sutter Instrument, Co. Modelo P-97), con los parámetros necesarios para tener puntas con resistencias de 20 M Ω al llenarlos con KCl 3 M.

Los registros se hicieron mediante un preamplificador marca Almost Perfect Electronics (Basilea, Suiza). Los protocolos de estimulación consistieron en la inyección de corriente a las células N o AE y el registro de actividad eléctrica en su pareja. Los registros se almacenaron y se analizaron con el programa PCLAMP5 (Axon Instruments, Inc.) para adquisición de datos y una tarjeta Lab Master DMA (Scientific Solutions, Inc.) integrada a una computadora personal.

VI - RESULTADOS

PARTE I. INFLUENCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LOS PATRONES DE CRECIMIENTO DE NEURONAS AP

Para llevar a cabo la caracterización cuantitativa de los patrones de crecimiento neurítico de células AP en cápsula ganglionar, laminina y homogenado crudo del SNC, se midió la longitud total de crecimiento neurítico, la cantidad de puntos de ramificación y el número y distribución de las neuritas principales. También se analizó la formación del patrón de crecimiento mediante un sistema de registro periódico.

Crecimiento de las células AP sobre la cápsula ganglionar

El patrón de crecimiento de las células AP en cápsulas ganglionares fue como el reportado por Fernández de Miguel (1997). El patrón para las células AP consistió en dos neuritas principales, orientadas en sentidos opuestos, mientras que las células de Retzius, regeneraron múltiples neuritas en varias direcciones, con puntos de ramificación. La figura 5 muestra una célula AP (A) y una célula de Retzius (B) que crecieron en la cara interna de una cápsula ganglionar. Ambas células regeneraron patrones de crecimiento dependientes de su identidad neuronal. Estos patrones también fueron diferentes de los que presentaron sobre laminina o Con A (Fernández de Miguel, 1997). El efecto de las cápsulas ganglionares en el patrón de crecimiento de las células AP fue específico de la matriz extracelular de la cara interna de la cápsula, o sea la que queda en contacto directo con el sistema nervioso. Esto se demostró al comparar los patrones de crecimiento

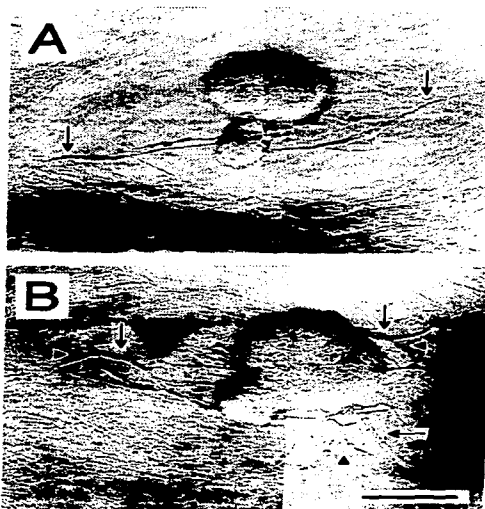


Figura 5 - Patrón de crecimiento de células AP (A) y de Retzius (B) en cápsula ganglionar. El patrón de las células AP consistió en neuritas (por lo general dos) dirigidas a extremos opuestos (señaladas por las flechas). El patrón de las células de Retzius consistió en múltiples neuritas en distintas direcciones (señaladas por las flechas) con puntos de ramificación (señaladas por las puntas de flecha). Escala = 50 micrómetros.

de células AP sembradas en ambas caras de las cápsulas ganglionares. Mientras que las células sembradas en la cara interna de la cápsula mostraron el patrón ya descrito ($n=7$), consistente en neuritas en sentidos opuestos (Fig. 6A), las células AP sembradas en la cara externa se adhirieron pero extendieron múltiples proyecciones, algunas de las cuales fueron gruesas y planas, aunque sin ramificaciones (Fig. 6B). Las células en las figuras 6A y 6B fueron inyectadas con amarillo Lucifer para comparar sus patrones de crecimiento con el de neuronas en el organismo, en el día 9 de desarrollo embrionario (Fig. 6C).

Las neuronas identificadas después de ser aisladas y cultivadas en Con A, regeneraron proyecciones neuríticas (Chiquet y Acklin, 1986; Grumbacher-Reinert, 1989). Para las neuronas AP cultivadas en Con A, esta regeneración consistió en muchas neuritas cortas, curvas y muy ramificadas. La figura 7 muestra un ejemplo de la regeneración de una de estas neuronas minutos después de que se sembró en Con A. El crecimiento de esta neurona alcanzó superficies considerables antes de tres horas. Como se puede ver en la figura, las neuritas crecieron preferencialmente del tallo neurítico. Primero se generaron neuritas, en cuyas puntas se extendieron y retrajeron continuamente finos filopodios. En algún momento la neurita se bifurcó y aparecieron filopodios nuevos en las puntas. Después de un tiempo la neurita fue invadida por citoplasma neuronal, que la engrosó. Aparecieron nuevas neuritas en los bordes, y continuaron creciendo y bifurcándose. Eventualmente el crecimiento se dio en forma de lamelas con conos de crecimiento y filopodios en sus puntas.

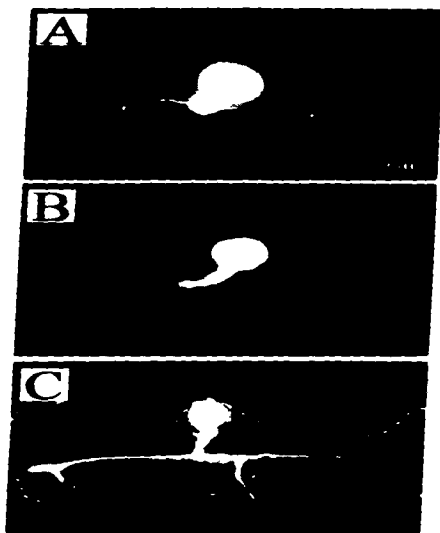


Figura 6 - Patrones de crecimiento de las células AP en distintas condiciones. Las células fueron inyectadas con amarillo Lucifer y observadas bajo fluorescencia. A) La célula sembrada en el interior de la cápsula, muestra ramas en extremos opuestos (señaladas por flechas); B) La célula fue sembrada en la cara externa de la cápsula y muestra un patrón distinto al de la célula en A, con múltiples procesos lamelares; C) Célula embrionaria en el día 9 (tomada de Gao y Macagno, 1987), esta célula muestra un patrón similar a la célula en A. A y B fueron procesadas digitalmente.

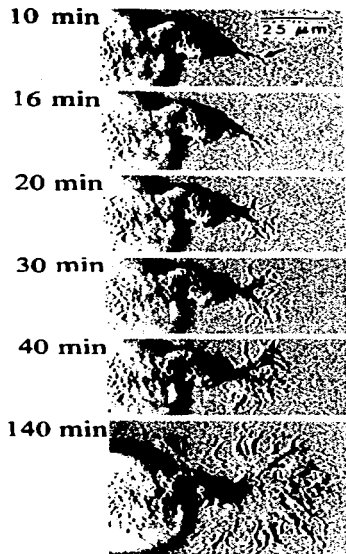


Figura 7 - Fotos en diferentes tiempos de una neurona Pagoda Anterior (AP) sembrada en Con A. A los diez minutos en cultivo fue posible detectar algunas neuritas (señaladas por la flecha). A lo largo del tiempo se observó la formación de puntos de ramificación y el crecimiento de conos lamelares con filopodios en los bordes.

La figura 8 muestra los patrones de crecimiento de las células AP y de Retzius sobre diferentes sustratos. Las imágenes se tomaron después de 36 h de crecimiento. El patrón de crecimiento varió de un sustrato a otro y de un tipo celular a otro. Las células AP en Con A regeneraron muchas neuritas muy ramificadas, cortas y curvas (Fig. 8A), mientras que las células de Retzius regeneraron una gran lamela a partir del tallo neurítico (Fig. 8B). En laminina, ambas neuronas generaron neuritas menos ramificadas, largas, y más rectas (Fig. 8C y 8D). Estos patrones son similares a los descritos previamente (Chiquet y Acklin, 1986; Grumbacher-Reinert, 1989).

Crecimiento de las células AP en homogenados de SNC

Como primera etapa para explorar qué componentes de la matriz extracelular producen el patrón de crecimiento característico de las neuronas AP en cápsulas ganglionares, intentamos reproducir este patrón de crecimiento en homogenados sometidos a tritón de SNC. Las figuras 9 y 10 muestran series de imágenes de células AP, tomadas a diferentes intervalos de tiempo. En el curso de su crecimiento, estas neuronas generaron dos ramas principales orientadas en sentidos opuestos. El patrón de crecimiento en estas condiciones se reprodujo en 3 neuronas y fue similar al de las neuronas AP en cápsulas ganglionares. Otras neuronas en este sustrato presentaron algunas variantes en su patrón de crecimiento. La célula que se muestra en la serie de imágenes de la figura 11A, presentó dos neuritas principales orientadas en sentidos opuestos (señaladas por flechas), pero estas se ramificaron. Estas variantes pudieran ser también el producto de la interacción de las células con el plástico o vidrio en el que fueron sembradas. Por esa

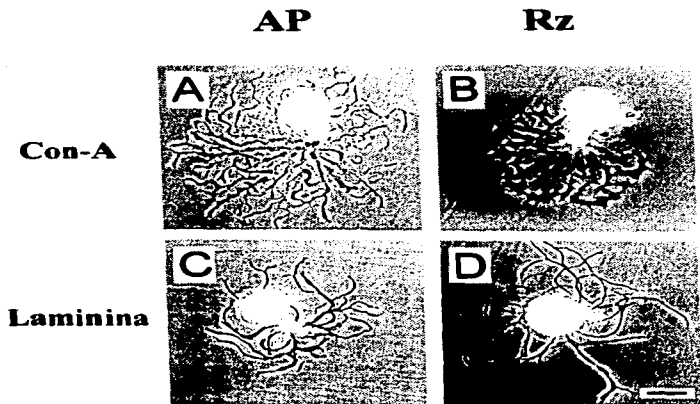


Figura 8 - Patrones de crecimiento de células de AP y Retzius en Con A y laminina de sanguijuela. Estos patrones son similares a los ya descritos (Grumbacher-Reinert, 1989). Los patrones son dependientes tanto de la identidad celular como del sustrato. Escala = 50 micrómetros.

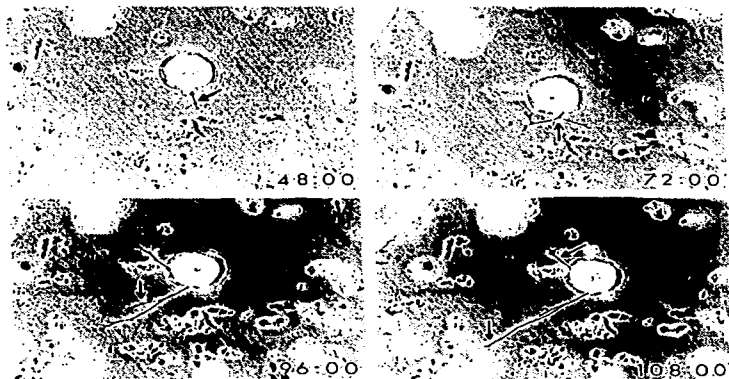


Figura 9 - Célula AP que creció en homogenado total. El patrón de crecimiento muestra dos neuritas principales. El tiempo en cultivo se muestra en la parte inferior derecha de cada imagen. A Las 48 horas, la célula muestra una sola rama que a las 72 horas se bifurcó. La misma célula a las 96 horas desarrolló dos ramas. La bifurcación que se observaba a las 72 horas aparentemente ha desaparecido y han surgido nuevas ramas (una de ellas está señalada por una flecha). A las 108 horas hubo absorción de ramificaciones y prevalecen dos ramas principales (señaladas por flechas).

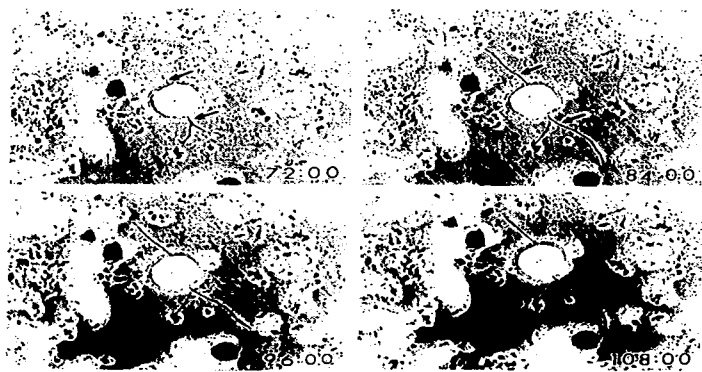


Figura 10 - Célula AP que creció en el homogenado total con dos neuritas principales orientadas en sentidos opuestos (señaladas con flechas a las 72 y 84h). El patrón muestra similitudes con el de la célula en la figura 9.

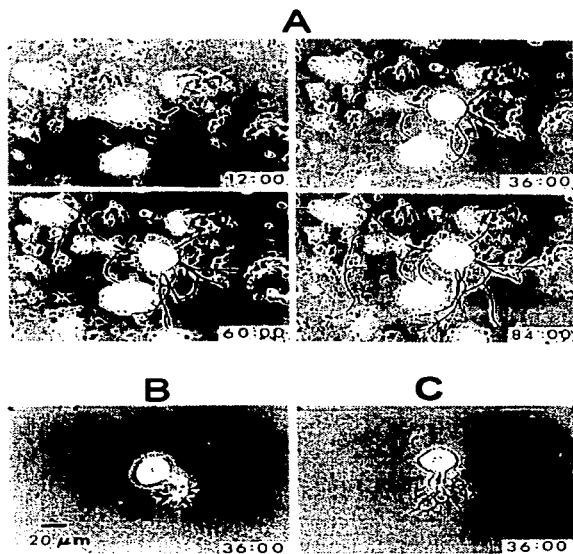


Figura 11 - A) Célula AP que creció en el homogenado total con dos neuritas ramificadas. Imágenes tomadas a 12, 36, 60 y 84 h. Las flechas muestran las neuritas principales; B y C) células AP en plástico y en vidrio respectivamente. Los patrones de crecimiento fueron distintos a los descritos en homogenados o cápsula.

razón, se sembraron células AP en plástico y en vidrio y se registraron sus patrones de crecimiento. Las figuras 11B y 11C muestran el crecimiento de dos células AP colocadas directamente sobre el plato de cultivo. Aquí el crecimiento se dio en las primeras doce horas y después las células ya no crecieron más, aunque se mantuvieron en buenas condiciones por varios días. El patrón de crecimiento de las células tanto en vidrio como en plástico fue diametralmente distinto al de las células en cápsulas o en homogenados y más bien se pareció al de las células sembradas en Con A.

Curso temporal de crecimiento

La latencia del inicio del crecimiento neurítico de neuronas sembradas sobre cápsulas ganglionares o sobre homogenados crudos del SNC fue de uno a días, lo que contrasta con el crecimiento en laminina, en donde por lo general, el crecimiento se inició entre 0 y 24 h. Al considerar la importancia de este hecho para poder agrupar las células y cuantificar el patrón de crecimiento, la tasa de crecimiento $\Delta L/\Delta t$ (donde L es la longitud neurítica) en periodos de 12 horas, se graficó en función del tiempo para neuronas AP sembradas en homogenados crudos de SNC. Como se puede ver en la figura 12, para latencias entre 0 y 36 horas, las tasas de crecimiento fueron muy similares. Una célula (Fig. 12D) que empezó a crecer a las 60 horas, mostró una tasa inicial muy rápida seguida de una tasa negativa, que indica retracción neurítica. Por esta razón se eliminó esta célula de los análisis posteriores.

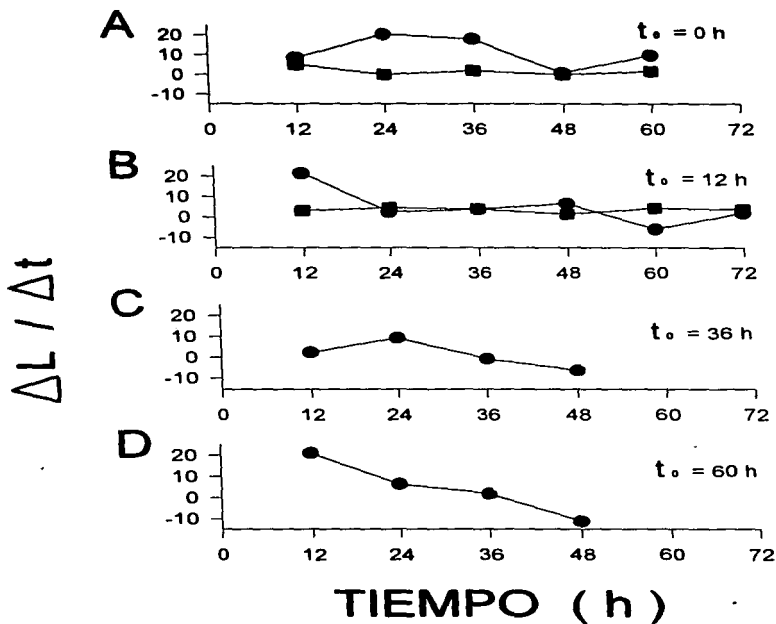


Figura 12 - Tasa de crecimiento de neuronas AP que se sembraron en la cápsula ganglionar. ● = célula uno; ■ = célula dos. A) la latencia fue entre 0 y 12 horas; B) la latencia fue entre 12 y 24 horas; C) la latencia fue entre 36 y 48 horas; D) latencia de 60 horas.

Análisis cuantitativo del patrón de crecimiento

Con el objeto de probar si el patrón de crecimiento de las células AP en homogenados reproduce al de las cápsulas, se llevó a cabo un análisis cuantitativo del patrón de crecimiento de estas células en cápsulas, homogenados y extractos de laminina. Se consideraron como parámetros la longitud neurítica total, el número de puntos de ramificación, el número de neuritas y su distribución. La figura 13 muestra la longitud total de las neuritas de las células AP en los diferentes sustratos. En laminina (n=8) el crecimiento fue hasta cinco veces mayor que sobre la cápsula, mientras que en el homogenado crudo (n=8) y en las cápsulas (n=7), las tasa de crecimiento fueron semejantes entre sí. Por ejemplo, la longitud media a las 36 h en cultivo en laminina fue de $1,585.07 \pm 299.68 \mu\text{m}$ (error típico), en cápsula ganglionar fue de $279.42 \pm 64.69 \mu\text{m}$ y en el homogenado crudo fue de $301.01 \pm 105.87 \mu\text{m}$.

El número de ramificaciones también fue mucho mayor en laminina que en cápsulas o sobre el homogenado crudo del SNC (Fig. 14). A las 36 h de crecimiento se generaron 66 ± 15.56 puntos de ramificación sobre laminina, 3.57 ± 1.07 puntos de ramificación en la cápsula ganglionar y 6.75 ± 2.13 puntos de ramificación en el homogenado crudo del SNC.

Como tercer parámetro se cuantificó el número de neuritas en los tres sustratos (Fig. 15). De nuevo el número de neuritas principales en la laminina es mayor que en la cápsula ganglionar y en el homogenado crudo del SNC. A las 36 h de crecimiento en laminina hubo 6.12 ± 0.69 neuritas; en

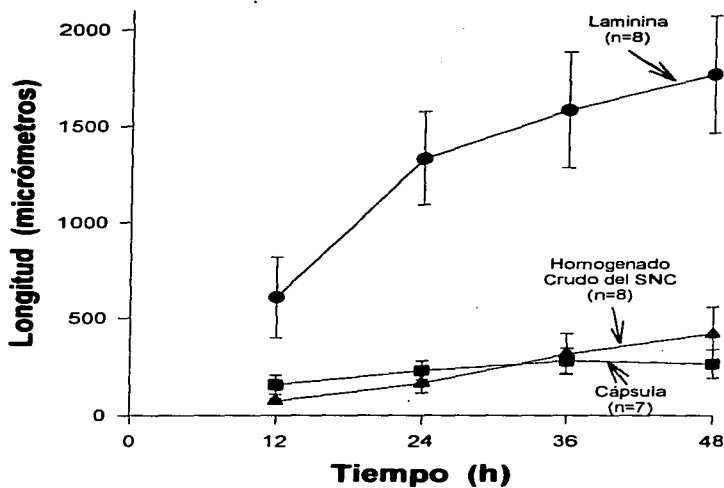


Figura 13 - Longitud total de crecimiento en función del tiempo de células AP sembradas en diferentes sustratos. En laminina (círculos) fue hasta cinco veces mayor que en la cápsula, mientras que en el homogenado crudo (triángulos) y las cápsulas (cuadrados) fue semejante.

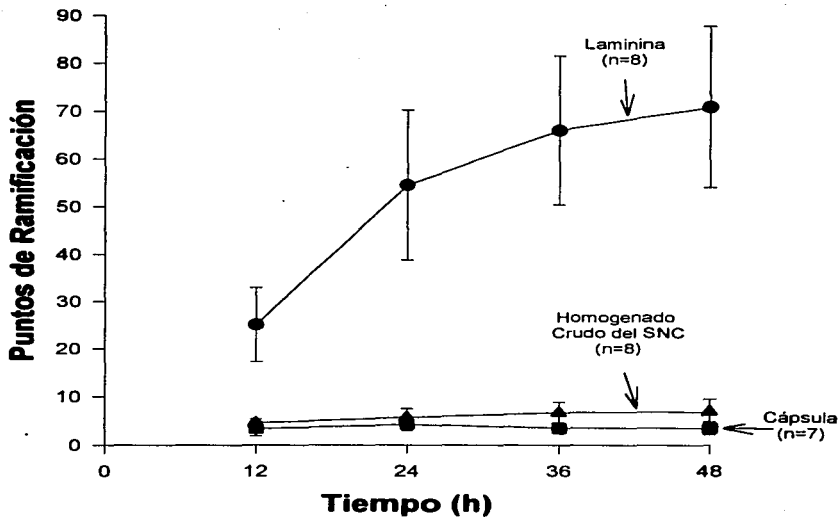


Figura 14 - Número total de puntos de ramificación en función del tiempo de células AP sembradas en diferentes sustratos. En laminina (círculos) fue mucho mayor que cuando se sembraron en las cápsulas (cuadrados) o en el homogenado crudo (triángulos).

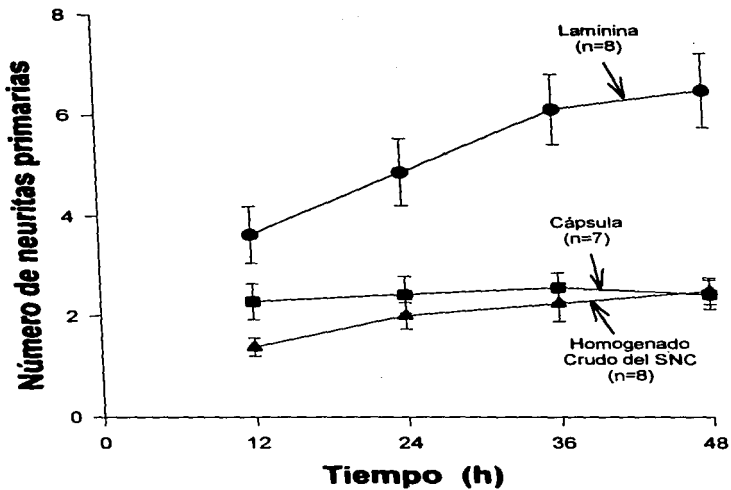


Figura 15 - Número de neuritas principales en función del tiempo de células AP sembradas en diferentes sustratos. En laminina (círculos) el número de neuritas primarias fue mayor que en las cápsulas (cuadrados) y en los homogenados crudos (triángulos).

cápsula ganglionar hubo 2.57 ± 0.29 neuritas y en el homogenado crudo del SNC hubo 2.25 ± 0.36 neuritas.

Las similitudes entre los patrones de crecimiento de células AP en cápsulas y homogenados sugieren que los homogenados contienen los factores responsables de este patrón. Para documentar estas similitudes con mayor exactitud, hicimos un análisis de la distribución de las neuritas en la periferia de la neurona. A las 36 h de crecimiento en laminina, las neuritas principales se distribuyeron en todo el entorno de la neurona (Fig. 16A), mientras que en la cápsula ganglionar las neuritas se distribuyeron en dos poblaciones orientadas en sentidos opuestos con un ángulo de separación de 158.4 grados y una desviación típica de 28.78 (Fig. 16B). En el homogenado crudo, las neuritas se distribuyeron con una separación de 113.45 grados con una desviación típica de 40.43 (Fig. 16C).

Etapas en la formación del patrón de crecimiento

Las observaciones iniciales del crecimiento de neuronas AP en cápsulas ganglionares mostraron una proliferación neurítica extensa, durante las primeras horas, que dio lugar a dos neuritas. Para explorar si esta dinámica se debe a la eliminación o a la fusión neurítica, se hicieron estudios del crecimiento mediante la toma periódica de imágenes.

La formación del patrón morfológico de crecimiento de las células AP, en los substratos nativos, mostró varias etapas: en la primera, hubo producción de múltiples neuritas en varias direcciones. Más adelante, se retrajeron o se fusionaron dando lugar a las dos o tres neuritas finales que

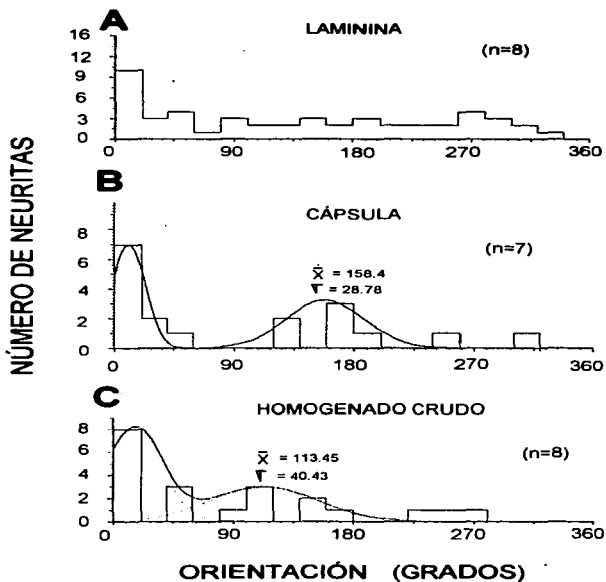


Figura 16 - Distribución de las neuritas principales de células AP. A) A las 36 horas de crecimiento, en laminina las neuritas se distribuyeron en todo el entorno de la neurona, mientras que en la cápsula (B) y el homogenado crudo (C) se presentaron dos poblaciones de neuritas.

extendieron hacia los polos opuestos. La figura 17 muestra una serie de imágenes a intervalos de 19 minutos, de una célula AP que creció en homogenado crudo del SNC. En las etapas tempranas se formaron ramas colaterales. Las flechas muestran la reabsorción de dos neuritas aparentemente por la bifurcación de la punta de la neurita principal. Estas ramas mostraron una tasa de crecimiento similar que la rama madre. Más adelante ocurrió la reabsorción de algunas de estas ramificaciones, pero otras continuaron creciendo y explorando el sustrato. En la figura se observa la reabsorción de dos de las ramas, marcadas por flechas. A las 72:45 comenzó la reabsorción de la rama señalada con una punta de flecha. La flecha horizontal señala un objeto de referencia estático en el plato de cultivo. En el curso de 3.5 h esta rama se reabsorbió completamente. La flecha curva señala otra rama que inició su reabsorción a las 73:04 h. Como se observa en la figura, la absorción de ramas colaterales dio lugar a una neurita que creció en línea recta.

Determinantes del patrón morfológico de crecimiento

Los elementos de la matriz extracelular en las cápsulas ganglionares, determinaron un patrón de crecimiento bien definido para las células AP. Este patrón fue diferente al que se generó en laminina, pero similar al generado en el SNC en el organismo. Para analizar la posible naturaleza proteica de los componentes de la matriz que inducen este patrón, se trataron las cápsulas ganglionares con diferentes proteasas y se obtuvo el perfil electroforético de los homogenados de las cápsulas ganglionares y de los homogenados crudos. En primer lugar la tripsina, que corta enlaces peptídicos a un lado de los

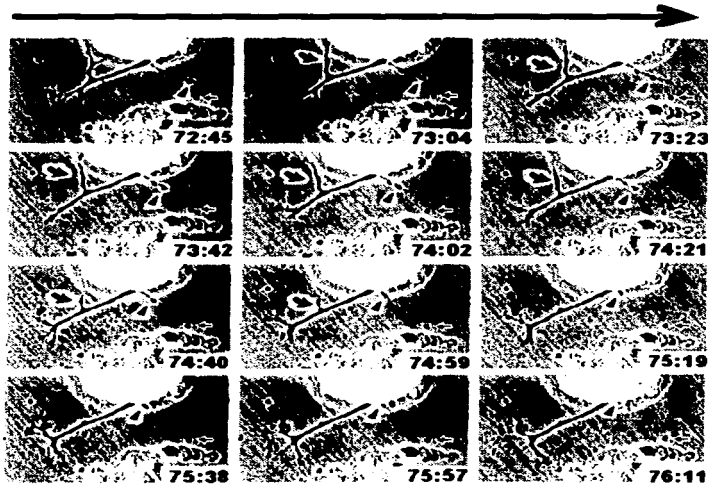


Figura 17 - Dinámica de crecimiento y retracción neuríticas en una célula AP. En una etapa de la formación del patrón morfológico se producen múltiples neuritas en varias direcciones (72:45 h). Posteriormente varias de estas neuritas se reabsorrieron pero otras continuaron creciendo y explorando el sustrato. La punta de flecha y la flecha curva señalan la reabsorción de dos neuritas y la flecha horizontal, un punto de referencia estático.

aminoácidos lisina o arginina, previno la adhesión y el crecimiento de las células AP en las cápsulas ganglionares (n=7). Y la colagenasa-dispasa, que es una mezcla de proteasas que degradan colágena y de proteasas inespecíficas, permitió la adhesión de cinco neuronas y el crecimiento de tres (n=5). La adhesión de estas neuronas fue característica, ya que ésta se presentó únicamente en las puntas de las neuritas (tabla 2 y figura 18; Comunicación personal de Fernández-de-Miguel, F. y C. Salvador).

En segundo lugar, se obtuvo el perfil electroforético del homogenado de las cápsulas ganglionares y del homogenado crudo del SNC en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). En geles en gradiente del 3% al 10% quedaron incluidas proteínas en el intervalo de 100 a 1,000 kDa. La figura 19 muestra un gel representativo. Los carriles de los homogenados de las cápsulas mostraron 22 bandas. Cuando los homogenados se trataron con ditiotreitól (DTT) para desensamblar las subunidades de las proteínas, aparecieron 16 bandas por carril. La disminución en el número de bandas posiblemente se debió a que algunas subunidades resultaron muy pequeñas y salieron del gel o a la sobreposición de bandas. De las proteínas reveladas en la electroforesis resulta evidente la laminina de la sanguijuela con unos 1,000 kDa (carriles 1 y 3) y en los carriles tratados con DTT (carriles 2 y 4) sus subunidades de 340 y 220 kDa, señaladas con flechas en la figura. El interés del homogenado crudo consistió en que las células AP crecen igual que en los homogenados de cápsulas y ambos patrones de crecimiento son similares a los de las cápsulas ganglionares. Además en el homogenado crudo del SNC se obtuvo

Tabla 2 - Efecto del tratamiento enzimático de las cápsulas ganglionares sobre la adhesión y el crecimiento de células de Retzius y AP.

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	ADHESIÓN		CRECIMIENTO	
	AP	Rz	AP	Rz
TRIPSINA	0 (n=7)	0 (n=18)	0 (n=7)	0 (n=18)
COLAGENASA-DISPASA	5 (n=5)	4 (n=4)	3 (n=5)	1 (n=4)



Figura 18 - Crecimiento de una célula AP en una cápsula ganglionar que fue tratada con colagenasa dispasa. Las neuronas permanecieron adheridas de las puntas de las neuritas y a partir de ellas crecieron. El resto de la neurita y el soma no se adhirió a la cápsula.

más proteína (2.37 mg/ml) que en los homogenados de las cápsulas ganglionares (0.17 mg/ml).

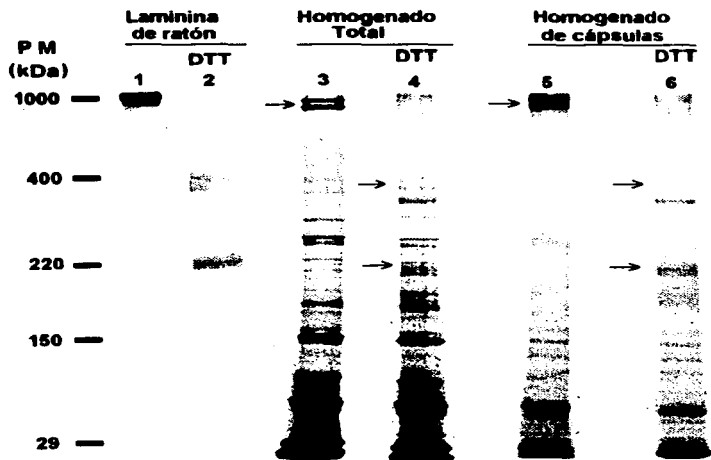


Figura 19 - Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente del 3% al 10% de homogenados del sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*. En los carriles 1 y 2, la laminina de ratón con y sin ditiotreitolo (DTT), sirve como marcador de peso molecular. El homogenado total del SNC se corrió en los carriles 3 y 4. Los homogenados de las cápsulas en los carriles 5 y 6. En los carriles 4 y 6 los homogenados se han tratado con DTT. Las flechas señalan a la laminina de la sanguijuela y a sus subunidades.

PARTE II. INFLUENCIA DEL SUBSTRATO EN EL CRECIMIENTO Y FORMACIÓN DE SINAPSIS EN NEURONAS CULTIVADAS

Los efectos múltiples de la matriz extracelular en la proliferación neurítica y el crecimiento dirigido, sugirieron la posibilidad de que el substrato pudiera también influir en el tipo de sinapsis formada entre neuronas cultivadas. Las neuronas sensoriales N y las motoneuronas AE, que en el animal formaron una *sinapsis química*, mediadora de un reflejo monosináptico, resultaron atractivas para este estudio, ya que al ser sembradas en cultivo sobre Con A, forman una *sinapsis eléctrica rectificante*. Por esas razón, resultó interesante explorar si la causa del "error" sería la ausencia del substrato adecuado. Para este estudio, se sembraron neuronas individuales y pares de neuronas N y AE en Con A y cápsulas y se compararon los patrones de crecimiento. Los atributos sinápticos se estudiaron mediante registro intracelular.

Patrón de crecimiento de neuronas solas N y AE sobre cápsula ganglionar y Concanavalina A

Como primer paso, se analizaron los patrones de crecimiento de ambos tipos celulares. La figura 20 muestra como las células N y las motoneuronas AE al ser sembradas sobre Con A o en la cara interna de la cápsula, presentaron patrones de crecimiento dependientes de su identidad celular y del sustrato. Estos patrones de crecimiento fueron distintos y contrastantes en los dos substratos. Para las células N el patrón de crecimiento en las cápsulas ganglionares ya fue descrito (Fernández de Miguel, 1997) y consistió en

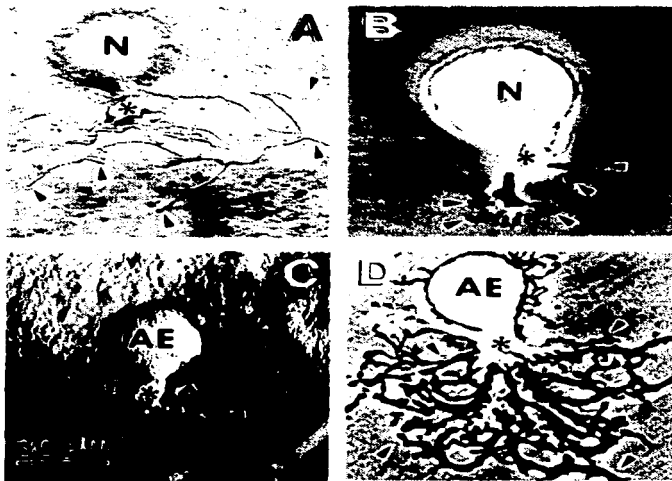


Figura 20 - Patrón de crecimiento de células N y AE. A y C) Crecimiento sobre la cápsula ganglionar de las células N y AE. B y D) Crecimiento sobre Con A de las células N y AE. El asterisco señala la ubicación del tallo neurítico y las flechas señalan algunas de las neuritas y conos de crecimiento.

neuritas finas con pocos puntos de ramificación (Fig. 20A). Algunas neuritas presentaron conos de crecimiento esféricos. En estas células, las neuritas crecieron a partir del proceso primario. Las células N en Con A no crecieron, aunque se mantuvieron saludables, como lo mostraron los registros intracelulares. Sólo algunas neuritas cortas con forma lamelar crecieron en dos de veinte células después de 24 h en cultivo (Fig. 20B). Las células AE sembradas en la cápsula ganglionar no crecieron o crecieron muy poco (Fig. 20C). Sin embargo, células AE sembradas sobre Con A crecieron profusamente (Fig. 20D) y generaron una lamela extensa en las primeras horas en cultivo. Posteriormente se generaron neuritas finas, cortas y muy ramificadas. Las neuritas se extendieron en forma de abanico con una cobertura de 217.74 ± 36.14 grados de un extremo al otro. Gran parte del crecimiento de estas neuronas ocurrió durante las primeras 12 h en cultivo.

Crecimiento de pares de neuronas N y AE

La ausencia de crecimiento de las células AE se revirtió cuando se colocaron pares de células N y AE sobre la misma cápsula. En estos casos las neuronas N y AE crecieron con múltiples neuritas en las primeras 12 h. Las neuritas de las células AE se extendieron en varias direcciones y muchas de ellas hicieron contactos con neuritas de las células N. La figura 21A muestra un par de neuronas N y AE en el cual las neuritas emergieron de ambas células. El efecto inductivo del crecimiento se presentó en cada par de células probado ($n=12$). Para conocer la especificidad de este fenómeno, se colocaron pares homólogos de neuronas AE en la misma cápsula. En cinco pares, ninguna neurona creció. Cuando se colocaron pares de neuronas N y



Figura 21 - Efecto inductivo del crecimiento de la matriz extracelular en las cápsulas ganglionares. A) Las células AE crecieron en la cápsula ganglionar inducidas por la vecindad de las células N. Las flechas señalan neuritas de la célula AE. B) La inducción fue específica sobre las células AE en la cápsula ganglionar, ya que no se presentó sobre las células N en Con A. El asterisco señala la posición del tallo neurítico de la célula N.

AE sobre Con A, ambas neuronas presentaron el patrón de crecimiento descrito para las neuronas solas. Como se muestra en la figura 21B, sólo las neuronas AE crecieron.

Formación de sinapsis entre neuronas N y AE

Todos los pares neuronales sembrados sobre la cápsula ganglionar formaron sinapsis eléctricas rectificantes. La corriente despolarizante o hiperpolarizante en la célula N se propagó a la célula AE. La figura 22 muestra que la corriente despolarizante inyectada en la célula N, fue seguida por una despolarización en la célula AE. El cambio de voltaje en la célula AE mostró un curso temporal similar al de la célula N. Asimismo, la corriente hiperpolarizante inyectada en la célula N fue seguida por una hiperpolarización en la célula AE. En contraste, sólo la inyección de corriente hiperpolarizante a la célula AE originó una respuesta en la célula N. Estas respuestas fueron similares en seis pares de células N-AE, aún cuando la concentración extracelular de magnesio se incrementó a 10 mM o el calcio se sustituyó por magnesio. Las características de esta sinapsis fueron similares a las de la sinapsis establecida en Con A (Vickickly y Nicholls, 1988).

Para probar si la sinapsis química se desarrolla a tiempos más largos, se hicieron registros intracelulares entre dos y nueve días en cultivo. En este período las características de la sinapsis permanecieron inalteradas y tampoco se afectaron cuando nuevamente el calcio se sustituyó por magnesio en el medio de cultivo.

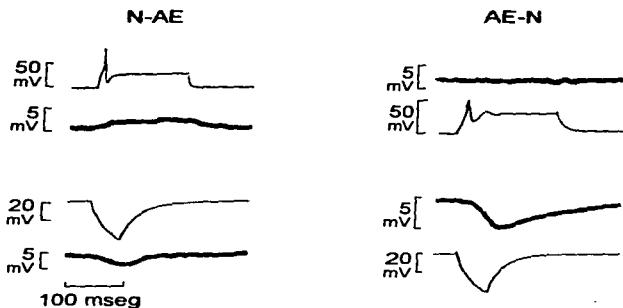


Figura 22 - Sinapsis eléctrica rectificante formada por las células N y AE en cultivo sobre la cápsula ganglionar. En los registros N-AE, tanto la corriente despolarizante como la hiperpolarizante inyectada en la célula N, generan un cambio de potencial en la célula AE. En los registros AE-N, solo la corriente hiperpolarizante inyectada en la célula AE, genera un cambio de potencial en la célula N.

VII - DISCUSIÓN

Los patrones de crecimiento desarrollados en cápsulas ganglionares, homogenados crudos de SNC, laminina de sanguijuela y Con A, fueron característicos y reproducibles para cada tipo neuronal. Algunos de estos patrones ya habían sido descritos, sin embargo, este trabajo aporta información novedosa acerca de los mecanismos que dan lugar a estos patrones así como de las características bioquímicas de los componentes de la matriz extracelular que los promueven. Los parámetros definidos para cuantificar los patrones de crecimiento probaron ser convenientes para esta caracterización y mostraron que el patrón de crecimiento de las células AP en homogenados crudos reproduce al de las cápsulas ganglionares. La distribución angular de las neuritas resultó ser definitiva para demostrar las similitudes entre estos patrones. Otras variables como la fasciculación cambiaron de manera evidente por las condiciones experimentales impuestas, no obstante, su cuantificación requiere la instrumentación de técnicas distintas a las utilizadas en el presente estudio.

Como parte de este estudio desarrollamos un sistema de registro periódico. Este sistema permite tener un método adecuado para el estudio de los patrones de crecimiento. Con él hicimos un análisis detallado del crecimiento al registrar a la neurona, paso a paso, durante periodos prolongados. La captura de imágenes mediante la computadora tiene las ventajas de la precisión y el ahorro de tiempo. Además las imágenes digitalizadas se pueden procesar para mejorar la calidad y apreciar los

detalles de interés. Uno de estos detalles es la dinámica del cono de crecimiento. El cono de crecimiento, que es la punta de una neurita en crecimiento (Fig. 7), se compone de una lamela con múltiples filopodios en sus bordes que se extienden y se retraen continuamente. La fineza y rapidez con que ocurren estos movimientos no podría estudiarse con observaciones a intervalos de tiempo largos. El sistema de registro periódico permitirá profundizar el estudio de estos detalles y cómo se generan los patrones de crecimiento en los sustratos probados.

Efecto del sustrato en el patrón de crecimiento

En cápsulas ganglionares y homogenados crudos, el patrón de crecimiento de las células AP fue semejante al que se desarrolla en el embrión (Gao y Macagno, 1987). La dinámica de la formación del patrón de crecimiento en cultivo incluye el alargamiento y la reabsorción de neuritas presumiblemente supernumerarias. Lo anterior sugiere que son varios los elementos de la matriz extracelular que participan de manera concertada en la determinación de la morfología neuronal en el SNC.

La similitud entre los patrones de crecimiento de las células AP, en cápsulas ganglionares y homogenados crudos del SNC, permite suponer que los homogenados contienen los factores responsables de inducir y modular este patrón. En cápsulas y en el homogenado crudo la longitud de crecimiento resultó ser hasta cinco veces menor que en la laminina. Aunque en cápsulas logramos detectar cierta fasciculación, esta no sería suficiente para explicar las diferencias. La ramificación sobre la laminina fue hasta diez veces mayor que en las cápsulas o los homogenados. Lo anterior sugiere que la modulación del crecimiento pudiera incluir una inhibición de la extensión y

ramificación de las neuritas. Además la matriz extracelular parece inducir la síntesis de moléculas de adhesión celular en la superficie de las neuritas, lo que llevaría a su fasciculación (Fernández de Miguel, 1997).

La distribución neurítica de las células AP que crecieron en cápsulas y homogenados crudos sugiere que la interacción de la células con la matriz extracelular modula la toma de decisiones acerca de la direccionalidad de las neuritas. Este mecanismo pudiera incluir la organización del citoesqueleto en la zona donde se origina el crecimiento. Las diferencias encontradas entre los grupos de células sembradas en cápsulas y en homogenados pudiera deberse a la influencia del plástico o del vidrio en el patrón de las células sembradas en los homogenados. Los patrones de crecimiento de las células AP en plástico y vidrio, mostrados en la figura 11, apoyarían esta suposición.

El que en el homogenado crudo se reproduzca el patrón de crecimiento de las cápsulas y del SNC, da la posibilidad de estudiar cuáles son los elementos del sustrato que participan en este fenómeno. Los resultados del tratamiento de las cápsulas ganglionares con tripsina, sugiere que los elementos de la matriz extracelular que median la adhesión y el crecimiento de las células AP son moléculas de naturaleza protéica. La colágena parece no intervenir en estos procesos. El efecto característico de la mezcla de proteasas colagenasa y dispasa sugiere que la adhesión, en la punta de las neuritas y el resto de la neurita y el soma, puede estar mediado por moléculas proteicas diferentes y de nuevo, aporta evidencia de la participación de varias o múltiples moléculas en la regulación del crecimiento neurítico.

El perfil electroforético de los homogenados de las cápsulas mostró un número limitado de bandas en el intervalo de 100 a 1,000 kDa. Entre estas bandas, la correspondiente a la laminina es evidente. El siguiente paso será tratar de identificar el efecto individual de algunas de estas proteínas y su combinación en el patrón de crecimiento neurítico en neuronas cultivadas y en el embrión.

Este trabajo se enmarca en un esquema general en el que se analiza cómo una neurona crece y se conecta correctamente con sus blancos. Los resultados presentados aquí contribuyen al esquema con la caracterización cuantitativa de los patrones de crecimiento desarrollados en sustratos nativos y al presentar evidencia que muestra la posibilidad de conocer los elementos de la matriz extracelular que determinan el patrón de crecimiento en el SNC. Estas evidencias son la reproducibilidad del patrón de crecimiento en las cápsulas ganglionares y en los homogenados crudos y de cápsulas, y la posibilidad de aislar y conocer los elementos de la matriz extracelular que intervienen en este proceso.

Efecto del sustrato en la formación de sinapsis

Las células N y AE presentaron patrones de crecimiento dependientes de su identidad y del sustrato en que fueron colocadas. Estos patrones fueron contrastantes para cada tipo neuronal, ya que las células N crecieron sólo en la cápsula, mientras que las células .AE lo hicieron sólo en Con A. Para muchas neuronas de la sanguijuela en cultivo, el crecimiento en Con A está mediado por el azúcar manosa en glucoproteínas de membrana (Chiquet y Acklin, 1986). La falta de crecimiento de neuronas AE en cápsulas ganglionares sugiere la ausencia de moléculas promotoras del crecimiento que

unen manosa. En contraste, las células N no crecen en Con A pero sí en la matriz extracelular de las cápsulas, lo que sugiere que puede ser otro azúcar el mediador de su crecimiento.

Al sembrar una célula AE en la vecindad de una célula N, sobre la cápsula, ambas células crecieron. Esto indica un efecto aditivo de la matriz extracelular y el blanco en el crecimiento de las células AE, que por sí mismas no crecen sobre las cápsulas. La hipótesis planteada para la inducción del crecimiento entre estas células es que los componentes de la matriz extracelular pueden inducir a la célula N a la liberación de factores atrectores que activan el crecimiento de las células AE (Fernández de Miguel, 1997).

El papel de los sustratos nativos es determinante en la morfología neuronal y en otros procesos tales como la inducción del crecimiento de las células AE y el crecimiento dirigido de las células de Retzius y AP. En este trabajo se probó si la matriz extracelular en las cápsulas, también podría determinar la formación de la sinapsis química, semejante a aquella que forman las células N y AE en el organismo. Sin embargo, la sinapsis formada tanto en cápsulas como en Con A fue eléctrica rectificante (De-Miguel y Vargas, 1997), igual que en la Con A descrita por Vickickly y Nicholls (1988). Lo anterior sugiere que los mecanismos que regulan el crecimiento y la formación de las sinapsis son diferentes, al menos en este caso.

Las causas de que estas neuronas forman una sinapsis distinta a la del animal, al ser sembradas en cultivo, aún se desconocen. En muchas neuronas de la sanguijuela en cultivo, los atributos sinápticos dependen de la región de la membrana que establece contacto (Liu y Nicholls, 1989). En este caso, la

región de contacto, no afectó el tipo de sinapsis formada. En el organismo, las células N forman sinapsis químicas con diferentes tipos de motoneuronas (Nicholls y Purves, 1970), pero en cultivo forman sinapsis eléctricas, mientras que las células AE forman sinapsis eléctricas con neuronas sensoriales al tacto y a la presión, tanto en el organismo como en cultivo. Por esta razón, parece más factible que las células AE estén dirigiendo la formación de la sinapsis eléctrica en cultivo.

Permanece aún sin resolver si la formación de la sinapsis eléctrica es un paso preliminar durante el desarrollo embrionario y qué determina la formación de la sinapsis químicas. Una hipótesis sobre este proceso es que la formación de la sinapsis química es dependiente de la actividad eléctrica. En este caso la estimulación de la piel, ya innervada por la neurona sensorial N, podría activar la síntesis del aparato de transmisión de la terminal química. Otra posibilidad atractiva pudiera ser que las señales anterógradas, producto de interacciones celulares previas, pudieran definir la sinapsis correcta. Se ha mostrado que la actividad eléctrica es necesaria para la formación de los patrones correctos de conectividad en el SNC (Hubel et al., 1977; Shatz y Striker, 1978) y que las señales anterógradas pueden alterar el crecimiento neurítico y la distribución de canales de calcio (Fernández de Miguel et al., 1992).

VIII - CONCLUSIONES

1) El sustrato, en combinación con la identidad neuronal, determinan el patrón morfológico de crecimiento neurítico de las células estudiadas AP, N y AE.

2) Los elementos de la matriz extracelular en las cápsulas ganglionares determinan un patrón bien definido de crecimiento de las células AP. La similitud de este patrón con el que se presenta en el SNC, sugiere que los elementos de la matriz extracelular en las cápsulas ganglionares pueden ser los mismos que esta célula encuentra durante su desarrollo en el SNC.

3) Los elementos de la matriz extracelular que median la adhesión y el crecimiento de las células AP son de naturaleza proteica y parecen actuar de manera concertada.

4) Aunque el sustrato promueve y regula el crecimiento neurítico de neuronas cultivadas de la sanguijuela, su efecto es independiente del mecanismo que regula la formación de las sinapsis en cultivo.

IX - BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1989) *Molecular Biology of the Cell* G. P. New York. 1218 p.

Bixby JL, Lilien J, Reichart LF (1988) Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol* 107:353-361.

Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1992). Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature (London)* 360:361-364.

Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Chiquet M, Acklin SE (1986) Attachment to Con A or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6188-6192.

Chiquet M, Masuda-Nakagawa L, Beck K (1988) Attachment to an Endogenous Laminin-like Protein Initiates Sprouting by Leech Neurons. J Cell Biol 107:1189-1198.

David S, Aguayo A (1981) Axonal Elongation into Peripheral Nervous System "Bridges" After Central Nervous System Injury in Adult Rats. Science 214:(931-933).

De-Miguel FF, Vargas J (1997) Different determinants on growth and synapse formation in cultured neurons. Neuroreport 8(3):1-5.

Diamond J, Holmes M, Coughlin M (1992) Endogenous NGF and Nerve Impulses Regulate the Collateral Sprouting of Sensory Axons in the Skin of the Adult Rat. J Neurosci 12(4):1454-1466.

Dietzel ID, Drapeau P, Nicholls JG (1986) Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurones in culture. J Physiol 372:191-205.

Ernfors P, Lee K, Jaenisch R (1994) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. Nature 368:147-150.

Fernández-de-Miguel F, Cooper RL, Adams WB (1992) Synaptogenesis and calcium current distribution in cultured leech neurons. Proc R Soc Lond 247:215-221.

Fernández-de-Miguel F, Drapeau P (1995) Synapse formation and function: insights from identified leech neurons in culture. J Neurobiol 27(3):367-379.

Fernández-de-Miguel F (1997) Outgrowth patterns and directed growth of identified neurons induced by native substrates in culture. J Comp Neurol 380:1-15.

Fuchs PA, Nicholls JG, Ready DF (1981) Membrane properties and selective connexions of identified leech neurones in culture. J Physiol 316:203-223.

Furshpan EJ, Potter DD (1959) J Physiol 145:289-325.

Gao W, Macagno ER (1987) Extension and Retraction of Axonal Projections by Some Developing Neurons in the Leech Depends upon the Existence of Neighboring Homologues. II. The AP and AE Neurons. J Neurobiol 18(3):295-313.

Grumbacher-Reinert S (1989) Local influence of substrate molecules in determining distinctive growth patterns of identified neurons in culture. Proc Natl Acad Sci USA 86:7270-7274.

Guth L (1956) Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. Physiol Rev 36:441-478.

Hantaz-Ambroise D, Vigny M, Koenig J (1987) Heparan sulfate proteoglycan and laminin mediate two different types of neurite outgrowth. J Neurosci 7:2293-2304.

Hoyle GW, Mercer EH, Palmite RD, Brinster RL (1993) Expression of NBF in Sympathetic Neurons Leads to Excessive Axon Outgrowth from Ganglia but Decreased Terminal Innervation within Tissues. Neuron 10:1019-1034.

Hubel DH, Wiesel TN, LeVay S (1977) Plasticity of ocular dominance columns in the monkey striate cortex. Phil Trans R Soc Lond (B)278,377-409.

Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25.

Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. Cell 78:425-435.

Kuhn TB, Schmidt MF, Kater SB (1995) Laminin and Fibronectin Guideposts Signal Sustained But Opposite Effects to Passing Growth Cones. Neuron 14:275-285.

Laemmli U (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature (Lond.) 227:680-685.

Liu Y, Nicholls JG (1989) Steps in the development of chemical and electrical synapses by pairs of identified leech neurons in culture. *Proc R Soc Lond B* 236:253-268.

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

Macagno ER (1980) Number and distribution of neurons in the leech segmental ganglion. *J Comp Neurol* 190:283-302.

Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S (1983) Laminin Promotes Neuritic Regeneration from Cultured Peripheral and Central Neurons. *J Cell Biol* 97:1882-1890.

Masuda-Nakagawa L, Wiedemann C (1992) The Role of Matrix Molecules in Regeneration of Leech CNS. *J Neurobiol* 23(5):551-567.

Murphy-Ullrich J, Schultz-Cherry S, Hook M (1992) Transforming growth factor β complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell* 3:181-188.

Neugebauer KN, Emmett CJ, Venstrom KA, Reichardt LF (1991) Vitronectin and thrombospondin promote neurite outgrowth: development regulation and role of integrins. *Neuron* 6:345-358.

Nicholls JG 1987. *The Search for connections: Studies of regeneration in the nervous system of the leech*. S. A. Massachusetts. 86 p.

Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG 1992. *From neuron to brain*. Sinauer Associates. Massachusetts. 807 pag.

Nicholls JG, Purves D (1970) Monosynaptic chemical and electrical connexions between sensory and motor cells in the central nervous system of the leech. *J Physiol* 209:647-667.

Payton B 1981. Structure of the Leech Nervous System. *Neurobiology of de Leech*. Editado por Muller K, Nicholls J, Stent G. CSH. New York. 320p.

Ramón y Cajal S 1893. La retine des vertebres. *La Cellule* 9:119-258.

Rauch U, Karthikeyan C, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK (1992) Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated aggregating chondroitin sulfate proteoglycans of Brain. *J Biol Chem* 267:19536-19547.

Ready DF, Nicholls JG (1979) Identified neurons from leech CNS make selective connections in culture. *Nature (London)* 281:67-69.

Reichardt LF, Tomaselli KJ (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14:531-570.

Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci* 16:565-595.

Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.

Schatz CJ, Stryker MP (1978) Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol* 281:267-283.

Sperry RW (1963) Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 50:703-710

Stryker MP, Harris WA (1986) Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J Neurosci* 6:2117-2133.

Stuart AE (1970) Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech. *J Physiol* 209:627-646.

Sunderland AJ (1980) A hitherto undocumented pair of neurons in the segmental ganglion of the leech which receive synaptic input from mechanosensory cells. *Comp Biochem Physiol* 67A:299-302.

Venstrom KA y Reichard LF (1993) Extracellular Matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. J FASEB 7:996-1003.

Vyclicky L, Nicholls J (1988) Specificity of connections formed by nociceptive cells of the leech in tissue culture. J Exp Biol 134:17-26.

Zhang R y Nicholls JG (1983) Identified neurons implanted into leech ganglia sprout and form synaptic connections. Dev Brain Res 8:131-135

Zheng LQ, Felder M, Connor JA, Mu-ming P (1994) Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. Nature 368:140-144.