

00322

48



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DE GLICOPROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA FORMACIÓN DE NEURITAS EN NEURONAS CULTIVADAS



T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A:  
ILEANA NURI FLORES ABREU



DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO FERNÁNDEZ DE MIGUEL

MÉXICO, D.F.



2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **PAGINACION DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ileana Nuri Flores

Abreu

FECHA: 27 junio 2003

FIRMA: Ileana Nuri Flores

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Papel de glicoproteínas inhibitoras de la matriz extracelular en la formación de neuritas en neuronas cultivadas."

realizado por Ileana Nuri Flores Abreu

con número de cuenta 09650418-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Francisco Fernández de Miguel

Propietario

M. en C. Julio Prieto Sagredo

Propietario

Dr. Saúl Cano Colín

Suplente

Dr. Silvestre Alavez Espidio

Suplente

Dra. Martha León Olea

*[Handwritten signatures of Dr. Francisco Fernández de Miguel, M. en C. Julio Prieto Sagredo, Dr. Saúl Cano Colín, Dr. Silvestre Alavez Espidio, and Dra. Martha León Olea]*

**Consejo Departamental de Biología**

*[Handwritten signature of Juan Manuel Rodríguez Chávez]*  
M. en C. **JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ**  
**B**

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo su cariño y apoyo durante toda mi vida.

A la UNAM por se un pequeño mundo y porque de no haber vivido en él sería una persona distinta,

A la Facultad de Ciencias por todo lo que aprendí, por los momentos inolvidables, por su gente y por todos mis amigos de ciencias.

A todos los miembros del laboratorio BL-304 por hacer posible que se realizara éste proyecto;

A Paco invitarme a formar parte de su grupo de trabajo, a Citlali, Hugo y Elizabeth por las discusiones, a Hortensia por enseñarme con paciencia las técnicas de cultivo, a Javier quien inició junto con Paco la investigación que, a Bruno por ayudarme siempre que tenía un problema con las máquinas, por nuestras conversaciones y sus explicaciones que siempre fueron útiles y divertidas, a Lino por compartir con nosotros, por ayudarnos y hacer que todo fuera más alegre, a Norma y Yuriria por su amistad y por todo lo que es imposible de poner en palabras.

A todos mis sinodales por su interés y paciencia al revisar esta tesis.

A Paco, por todo lo que aprendí en su laboratorio y por dirigir esta investigación.

A Silvestre, por el tiempo que dedicó a las correcciones y a discutir este trabajo conmigo.

A Martha, por el tiempo que compartimos en mi estancia en su laboratorio y por su apoyo emocional y ayuda para el término de la tesis.

A Saúl, por las inolvidables clases y momentos que compartimos.

A Julio, por las clases tan divertidas, por transmitirme su interés hacia la investigación científica, por seguir tan de cerca mi desarrollo académico, incluyendo mi proyecto de tesis y por incondicional apoyo.

A mis amigos,

Daniel por sus programas que hicieron más fácil la cuantificación y Hugo por su invaluable ayuda en el diseño editorial

Dedico ésta tesis a mi familia por su amor y apoyo,

A Ite por todo lo que me ha enseñado, por quererme y respetarme, por todos los momentos que hemos compartido y por los que vendrán, por todas nuestras conversaciones, por su amistad, por ser como es; así como por toda su ayuda para que se lograra esta tesis, por no perder ni la paciencia ni el sentido del humor en este largo proceso.

A Claudia por todo cariño y apoyo que me ha dado en todo, por ser una persona inteligente y sensible, por su alegría y optimismo.

A mi abuelo Rodrigo por todo lo que me transmitió y por la forma en que lo hizo, por ser una persona maravillosa, por su amor y respeto.

A mi Mamá Pera por transmitirme su amor al arte, por todos los instantes compartidos, por comprenderme, aceptarme como soy y quererme.

A mi Tita por ser una persona alegre y querer siempre lo mejor para mí.

A Paty por su aplomo, por todos los juegos y tardes de pintura, por su amistad.

A Norma y Enrique por que siempre han estado ahí y se que seguirán estando, para todo. Por todas las reuniones, por todo su cariño y amistad.

A Macarena por ser una persona increíble, por lo que hemos compartido y porque espero que cada día sea más.

A Kurt simplemente por ser un niño maravilloso

A Rodrigo por su cariño, a mis primos Rodrigo y Alejandra,

A Petra por nuestros paseos.

A Francisco por todo el amor y el apoyo, por lo que hemos compartido y aprendido, por dejarme entrar a tu mundo, entrar al mío y crear uno juntos, por los momentos mágicos, por cuestionar la realidad, por Nía.

A mis amigos,

Fernanda por los sueños y realidades compartidas,

Luis Lozano por todo lo que compartimos y Emilio por los días de teatro.

Por todos los momentos en la facultad y fuera de ésta Hugo, Agustina, Violeta, Martha, Marina, Camila, Ricardo, Enrique, Benjamín, Andrés y Luis. A Sol porque quiero que sigamos cerca, a Yuriria por todo lo que significa tu amistad, a Luis Téllez por las historias, a Elías por una etapa inolvidable, a Jérôme por los maravillosos momentos en Montreal, a Patrice por que el espacio y el tiempo se diluyen y es posible que sigamos siendo amigos, a Tere por las tardes inolvidables de pintura, a Francisco Flores por la conexión que se dio desde el principio, por nuestras conversaciones en Kingston, por Rachel y Livi,

A Arturo por todo lo que vivimos, por aquel paseo por la ciudad en la madrugada, por nuestras conversaciones, por los recaditos en el coche, por tus cartas, por el vino tinto, por tu sonrisa, por los viajes, por todo lo que hicimos y soñamos, porque me acompañas.

también a, Aurora, Claudia, Luis Pacheco, Aline, Tamara, Julia, Niza, Ramón, Alvaro, Juan Pablo, Horacio, Iván y todos los que se me olvidan.

A todas las personas que sin saberlo, con sus creaciones han enriquecido mi vida.

D

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>2.1 Diferencias entre la regeneración central y periférica en mamíferos</b> .....	2
<b>2.2 Desarrollo y Regeneración neuronal</b> .....	4
2.1.2 Cono de crecimiento.....	5
2.2.1 Mecanismos de crecimiento y guía axonal .....	9
2.2.3 Moléculas de matriz extracelular.....	11
2.2.4 Factores solubles.....	18
2.2.5 Neurotransmisores y Actividad Eléctrica.....	19
<b>2.3 La sanguijuela en estudios de regeneración neurítica</b> .....	21
2.3.1 Regeneración de neuronas aisladas en cultivo.....	23
2.3.2 Moléculas de matriz extracelular de la sanguijuela.....	27
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	30
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>5. MÉTODOS</b>	
5.1 Disección y obtención de cápsulas.....	31
5.2 Obtención de neuronas.....	31
5.3 Crecimiento en diversos sustratos y experimentos de perturbación.....	32
5.4 Monitoreo del crecimiento.....	33
5.5 Reconstrucción y cuantificación del crecimiento.....	33
5.6 Registros electrofisiológicos.....	34
5.7 Análisis del patrón de disparo.....	34
5.8 Estadística.....	34
<b>6. RESULTADOS</b>	
6.1 Patrón de regeneración neurítica de las neuronas AP.....	35
6.2 Patrón de regeneración neurítica de las neuronas de Rz .....	39
6.3 Patrón de regeneración neurítica de las neuronas AE .....	44
6.4 Comparación del potencial de Acción de neuronas AP con y sin PNA.....	48
6.5 Análisis del Potencial de Acción en neuronas AP.....	53
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	61

# PAPEL DE GLICOPROTEINAS INHIBIDORAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA FORMACION DE NEURITAS EN NEURONAS CULTIVADAS

## 1. RESUMEN:

Durante el desarrollo y la regeneración del sistema nervioso, las moléculas de matriz extracelular y la identidad neuronal interactúan en la regulación del crecimiento neurítico. En este trabajo exploramos el papel de glicoproteínas inhibidoras de la matriz extracelular en esta regulación. Nuestro estudio se realizó en neuronas adultas identificadas de sanguijuela *Hirudo medicinalis* aisladas y sembradas en cultivo, sobre en la matriz extracelular nativa del interior de las cápsulas ganglionares. Se hicieron experimentos de perturbación que consistieron en bloquear el efecto de glicoproteínas inhibidoras del crecimiento, preidentificadas con base en su unión a la lectina de cacahuate PNA (*Peanut Nivalis Agglutinin*).

Para estudiar el crecimiento utilizamos neuronas de Retzius (Rz), que crecen profusamente en el interior de la cápsula ganglionar, neuronas Pagoda Anterior (AP), que producen un patrón de crecimiento bipolar muy estereotipado y similar al del día 9 del desarrollo embrionario y motoneuronas Erectoras del Anillo (AE), que en cápsulas ganglionares tienen crecimiento restringido. Todas ellas crecen profusamente en la lectina concanavalina A o en laminina como sustratos. La longitud neurítica total de las neuronas de Rz no se afectó por la presencia de PNA en el medio de cultivo; sin embargo las neuronas AP y las motoneuronas AE la duplicaron. El número de neuritas primarias en presencia de PNA se incrementó en un 100, 70 y 56% para las neuronas AP, neuronas AE y las neuronas de Rz respectivamente. El número de puntos de ramificación se duplicó tanto para las neuronas AP como para las neuronas AE, mientras que en las neuronas de Rz no hubo diferencias significativas. La lectina PNA como sustrato no tuvo efecto en los patrones de crecimiento de ningún tipo neuronal al compararlos con los producidos sobre plástico. Estos resultados sugieren que las diferencias en los patrones de ramificación de los distintos tipos neuronales dependen de su sensibilidad intrínseca al balance entre factores inhibidores y promotores del crecimiento.

Al registrar la actividad eléctrica de las neuronas con fines de su identificación encontramos que en las neuronas AP, tanto la amplitud como la integral del potencial del acción de aumentaron en un 50 y 60% respectivamente en presencia de PNA. El cambio de voltaje a lo largo del tiempo (dV/dt) de la fase de subida se incrementó un 80% con PNA; mientras que la fase de caída no cambió. El cociente de la integral del potencial del acción y la longitud neurítica total en presencia de PNA se incrementó al triple; sugiriendo un aumento en el número de canales por unidad de área membranal. No encontramos efectos en la actividad eléctrica de las neuronas de Retzius o AE. Estos resultados sugieren que las glicoproteínas inhibidoras del crecimiento también pueden regular la síntesis o incorporación de canales iónicos por unidad de área. Este podría ser parte del mecanismo de regulación de la extensión neurítica.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 DIFERENCIAS ENTRE LA REGENERACIÓN CENTRAL Y LA PERIFÉRICA EN MAMÍFEROS

En animales adultos, las neuronas centrales maduras son postmitóticas; por lo que las que se pierden ya no se recuperan. Sin embargo, las que sobreviven después de una lesión pueden regenerar axones y dendritas capaces de reestablecer sinapsis.

La habilidad de regenerar varía entre las especies, tipo neuronal y etapa del desarrollo. Después de una lesión, el sistema nervioso periférico y central de invertebrados puede reestablecer conexiones sinápticas precisas. El sistema nervioso central (SNC) de vertebrados es capaz de regenerar únicamente en etapas embrionarias o en un periodo crítico después del nacimiento, siendo algunos peces y anfibios los únicos que mantienen esta capacidad en el estado adulto (Bastmeyer, 1991; Schwab, et al., 1993). Las neuronas centrales de fetos o neonatos de mamíferos son capaces de reestablecer sinapsis con blancos periféricos. Experimentos en ratas, hamsters y zarigüeyas (*Monodelphis domestica*) muestran que mientras la lesión postnatal sea inmediata (con una ventana temporal muy corta), si hay regeneración en el SNC en mamíferos (Bernstein y Steizner, 1983; Bregman et al., 1989; Kalil y Reh, 1982; Treheine et al., 1992).

La imposibilidad de los axones para elongarse más de unos milímetros en el SNC adulto dañado es fundamental para el fracaso en la regeneración del cerebro y de la espina dorsal de mamíferos adultos. Los axones dañados de nervios periféricos regeneran satisfactoriamente cuando se encuentran asociados a células de Schwann. Santiago Ramón y Cajal en 1928 propuso que las diferencias entre axones centrales y periféricos para la regeneración se debe tanto al ambiente como a sus propiedades intrínsecas; hipótesis robustecida por la gran evidencia proveniente de experimentos posteriores.

Mediante trasplantes se ha demostrado que neuronas del SNC pueden regenerar en un ambiente periférico, pero no en uno central. Los axones dañados de la espina dorsal y del cerebro de rata son capaces de elongarse grandes distancias cuando el ambiente del SNC es remplazado por el periférico (Tello, 1911; Ramón y Cajal, 1928; David y Aguayo, 1981; Aguayo et al., 1990). Esta limitación se debe a una fuerte actividad inhibitoria ejercida en el SNC, que no puede ser contrarrestada por factores neurotróficos en ratas adultas (Schwab y Thoenen, 1985; Caroni et al., 1988).

Se sabe que la ausencia de regeneración en tractos descendentes de la espina dorsal y la aparición de mielina en embriones de pollo están correlacionadas (Shimizu, 1990; Hasan et al., 1991).

Al término del periodo crítico postnatal, los axones de mamíferos presentan limitaciones para su regeneración debido a la inhibición del crecimiento inducida por proteínas de la mielina (N1-35 y N1-250) presentes los oligodendrocitos maduros (Schwab y Caroni, 1988). Tanto los astrocitos como los precursores de los oligodendrocitos son permisivos para el crecimiento neurítico, sin embargo al madurar, los oligodendrocitos dejan de serlo debido a que comienzan a producir mielina (Hatten et al., 1984; Fawcett et al., 1989; Schwab y Caroni, 1988). A pesar de que los axones maduros conservan su capacidad potencial de regeneración, disminuye su selectividad para conectarse con su blanco.

La capacidad regenerativa de uno de los grupos más antiguos de vertebrados como son los peces, puede explicarse por la ausencia de moléculas inhibitoras relevantes en su SNC. En éste no se han encontrado las proteínas homólogas a las de la mielina ni su actividad correspondiente, lo cual concuerda con la actividad promotora del crecimiento proveniente de oligodendrocitos maduros aislados del nervio óptico de peces (Bastmeyer, 1991).

Varios experimentos sugieren que las proteínas inhibitoras de la mielina (N1-35/250) pueden funcionar creando límites para las vías tardías en el SNC y en áreas blanco así como restringir el acceso de fibras a regiones y capas particulares. Su presencia en el SNC adulto sugiere una función posiblemente aún más importante, la estabilización del SNC contra el crecimiento neurítico en regiones no deseadas, particularmente en la materia blanca (Schwab, 1993).

La presencia de mielina en la membrana de oligodendrocitos de rata comienza a ser detectable por microscopía electrónica el día 6 postnatal (Hildebrand y Waxman, 1984). Durante el desarrollo normal de aves y mamíferos, es muy probable que los axones en crecimiento nunca se encuentren con la mielina sino que interactúen con oligodendrocitos inmaduros y sus precursores. El curso temporal, extremadamente lento de mielinización observado en cultivo, (Wood y Williams, 1984) apoya que los oligodendrocitos indiferenciados primero interactúan con los axones y posteriormente se diferencian y forman mielina (Schwab y Caroni, 1988). Si es así, los oligodendrocitos constituyen un obstáculo para el crecimiento neurítico únicamente durante la regeneración.

Aunado a los componentes no permisivos y factores inhibitorios, el SNC diferenciado de mamíferos carece de todos los constituyentes celulares o del sustrato requeridos para el crecimiento neurítico durante del desarrollo (Liesi, 1985; Carbonetto et al., 1987). Un ejemplo de esto es la ausencia de laminina en el SNC diferenciado de mamíferos en contraste con el periférico, el de vertebrados más antiguos e invertebrados, ya que es una glicoproteína que promueve tanto la adhesión como el crecimiento axonal (Schwab y Caroni, 1988).

El que el SNC de algunos vertebrados (aves y mamíferos) constituya un ambiente desfavorable para la regeneración neurítica puede deberse a una disminución en la expresión de factores neurotróficos, moléculas de adhesión y promotoras del crecimiento así como a un aumento en la producción de factores inhibidores.

## 2. 2 DESARROLLO Y REGENERACIÓN

La forma en que las células nerviosas adquieren sus características únicas y establecen conexiones sinápticas precisas durante el desarrollo depende del linaje celular, interacciones con otras células, señales independientes o producidas por el órgano blanco (moléculas de matriz extracelular y factores solubles) y de su actividad eléctrica.

Para establecer conexiones sinápticas con sus blancos, las neuronas extienden neuritas que terminan en conos de crecimiento. Estos exploran el ambiente e interactúan con varios tipos de moléculas, entre las que se encuentran; moléculas neuronales de adhesión celular (N-CAMs, por sus siglas en inglés), moléculas de matriz extracelular y factores solubles.

Las moléculas de adhesión celular (CAMs, por sus siglas en inglés) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se encuentran en la superficie celular (Kwada, 1986). Las moléculas de matriz extracelular constituyen el substrato sobre el cuál las neuronas crecen y migran (Reichardt, 1991). La matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) está constituida por moléculas secretadas por las células del tejido en que se encuentre formando un substrato activo capaz de comunicarse con las células con las que interactúa. Mientras que los factores solubles actúan creando gradientes de concentración capaces de atraer o repeler a los conos de crecimiento. Los conos de crecimiento interactúan con todas estas moléculas durante su crecimiento y migración neuronal (Letourneau, 1975), estableciendo conexiones con blancos temporales (Lander, 1989). Todas estas moléculas se comunican con el cono de crecimiento mediante receptores membranales. Las integrinas son los receptores más estudiados de las moléculas de matriz extracelular y CAMs. Estas intervienen en el ciclo celular induciendo arreglos del citoesqueleto, proliferación, diferenciación, migración o apoptosis en las células con que interactúan (Giancotti y Ruoslati, 1999).

Una característica común en el desarrollo del sistema nervioso es una superproducción neuronal seguida de retracción de neuritas específicas o de muerte neuronal (Hamburger 1939, Innocenti 1981, Luskin et al., 1985, O'Rourke y Fraser, 1990; Purves et al., 1990; Balice-Gordon et al., 1990). Ambos

fenómenos parecen estar regulados por la competencia por factores tróficos producidos por su blanco y más adelante por actividad eléctrica. El factor trófico más estudiado es el de crecimiento neurotrófico (NGF) descubierto en la década de los 40's en las glándulas salivales de roedores por Rita Levi Montalcini (Levi-Montalcini, 1982), éste es requerido por neuronas sensoriales, simpáticas y algunas colinérgicas centrales para su supervivencia y desarrollo (Menesini-Chen et al., 1978; Gundersen et al., 1980). El NGF es miembro de la familia de las neurotrofinas. La sensibilidad neuronal hacia estas moléculas varía durante el desarrollo y depende de la identidad neuronal. Su efecto está mediado por receptores que tienen un dominio extracelular que se une a ellas un pequeño dominio transmembranal y uno intracelular con actividad de cinasa de tirosina.

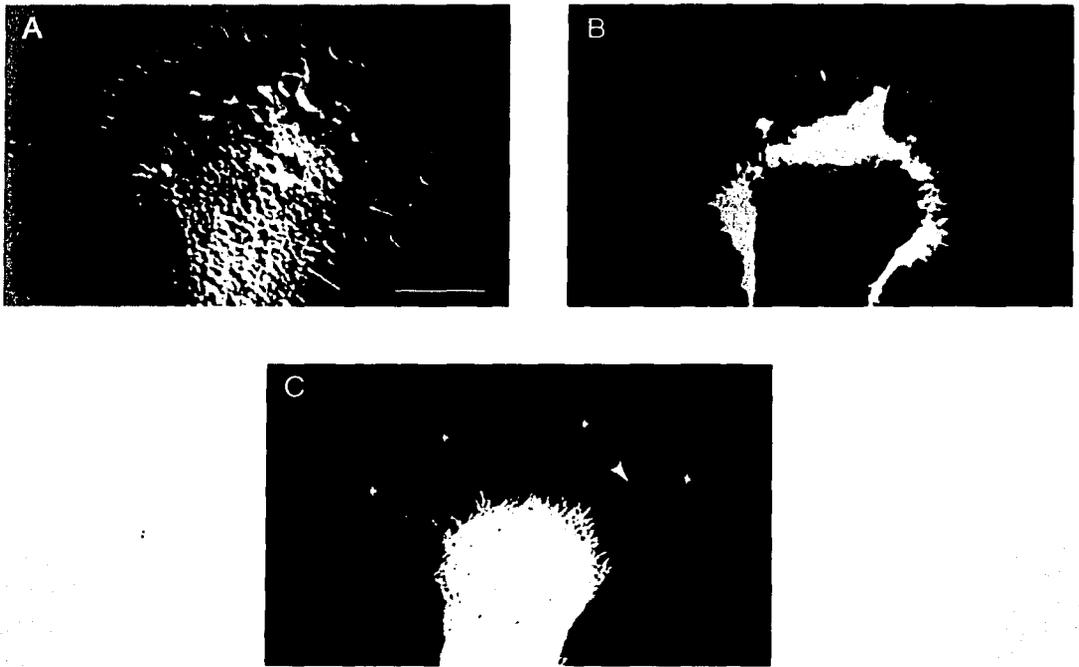
Experimentos de Hamburger y Levi Montalcini demostraron que la muerte neuronal en embriones de vertebrados puede manipularse modificando el tamaño del órgano blanco (Hamburger, 1939), si éste se reduce, la muerte neuronal aumenta. Así mismo encontraron que al tiempo en que comenzaban a formarse las sinapsis en las miofibras, entre el 40-70% de las motoneuronas que habían mandado axones a las extremidades morían, lo cual podía evitarse implantando un miembro extra (Hollyday et al., 1976). Aparentemente las motoneuronas compiten por algunas sustancias tróficas que requieren para su supervivencia y que les suministra su órgano blanco.

Por otro lado, algunas de las neuronas mueren posiblemente debido a que no establecieron conexiones con su blanco apropiado, por lo que su muerte contribuiría a una mayor especificidad en la inervación. Sin embargo, otras neuronas mueren a pesar de haberse conectado con su blanco correcto, lo que sugiere que su muerte es más bien una manera de acoplar el tamaño del blanco con la entrada nerviosa (Hollyday et al., 1976).

### **2.2.1 Conos de crecimiento**

Las puntas de los axones en crecimiento se expanden y forman conos de crecimiento. Éstos fueron reconocidos por primera vez por Santiago Ramón y Cajal en 1890 como la porción del axón responsable de la guía axonal y elongación hacia el blanco ya que poseían una alta sensibilidad química y fuerza mecánica (Figura 1).

El cono de crecimiento guía al axón transduciendo claves positivas y negativas en señales que regulan el citoesqueleto y por lo tanto determinan el curso y destino final del crecimiento axonal. Continuamente extienden y retraen amplias hojas membranosas llamadas lamelipodios y otras delgadas y afiladas llamadas filipodios, los cuales parecen ser capaces de adherirse al substrato y jalar al cono.

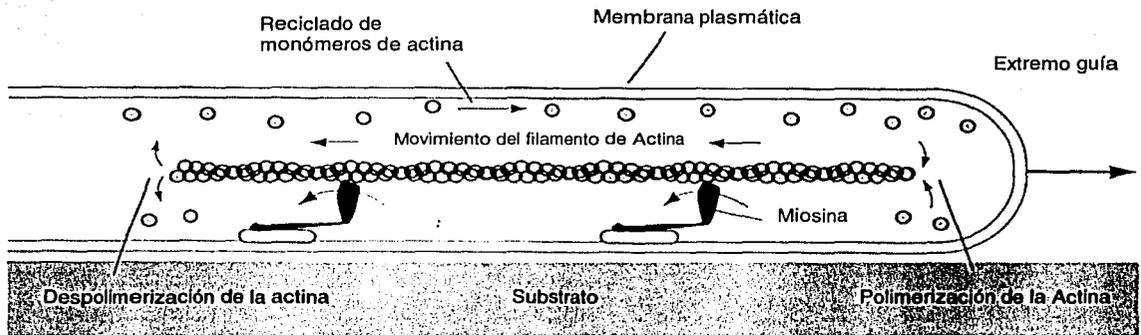


**Figura 1. Morfología de los conos de crecimiento:**

Los conos de crecimiento están constituidos por tres regiones principales: la central que es rica en microtúbulos, mitocondrias y una variedad de otros organelos y proyectándose de ésta los lamelipodios y los filopodios, ambos ricos en actina filamentosa. A) Cono de crecimiento observado por contraste de interferencia diferencial. B) Micrografía de fluorescencia mostrando la distribución de actina filamentosa visualizada con rodamina conjugada con faloidina. Los filamentos de actina se alinean con los filopodios y las microespigas en la periferia del cono mientras que los filamentos orientados al azar están concentrados generalmente en la región central (flecha). C) Distribución de microtúbulos visualizada con anticuerpos para tubulina. Los microtúbulos se encuentran concentrados en el axón la mayoría termina en la parte central del cono de crecimiento, mientras que algunos (cabeza de flecha) se extienden hacia la periferia del cono de crecimiento (asteriscos). Escala 10µm (modificado de Forscher y Smith 1988).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La capacidad sensorial de los conos depende en gran medida de sus filipodios. Éstos son ricos en actina y por lo tanto muy flexibles; en sus membranas se encuentra la mayor cantidad de receptores para las moléculas que sirven como claves direccionales. Cuando los receptores de los filipodios se encuentran con señales en el ambiente, el cono es estimulado para avanzar, retraerse o girar según sea la señal. Muchos motores moleculares que involucran actina, miosina y componentes membranales posibilitan éstas reacciones. A pesar de que los motores varían de una situación a otra, siempre implican el movimiento de microtúbulos de la parte central hacia el extremo guía recorriendo al cono hacia delante y dejando atrás una nueva porción de axon.



**Figura 2. Modelo de la motilidad del cono de crecimiento.**

Los filamentos de actina son movidos hacia atrás por interacciones con moléculas de miosina ancladas a la membrana. Los monómeros de actina se agregan a los filamentos en el extremo guía y la despolimerización del filamento se da en la región central del cono de crecimiento. La extensión del extremo guía se da mediante la polimerización de la actina o por el movimiento de moléculas de miosina en la región del extremo guía a lo largo de los filamentos de actina (modificado de Smith, 1988 y Sheetz et al., 1992).

Para lograr una guía axonal correcta se requiere un perfecto acople entre las capacidades quimiosensibles de la membrana del cono de crecimiento y motoras de microtúbulos y demás constituyentes del citoesqueleto. Esto solo puede ocurrir si la acción motriz depende del aparato sensorial. Los filipodios no pueden ser entidades meramente de unión, sino que deben fungir como receptores y transductores de señales acopladas a numerosas vías de segundos mensajeros (Gundersen et al., 1980; Kallen et al., 1990; Usowiks et al 1990; Lankford et al., 1990).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El que ciertas moléculas sean capaces de inhibir o promover el crecimiento neurítico refleja la existencia de receptores acoplados al citoesqueleto como sucede con las moléculas promotoras del crecimiento (Skaper et al., 2001). La familia de las integrinas constituye el mayor grupo de receptores a glicoproteínas de la matriz extracelular. Estas proteínas transmembranales están acopladas al citoesqueleto y a cadenas de segundos mensajeros lo cual posibilita que influyan en el crecimiento, adhesión, retracción, migración, proliferación y diferenciación celular.

Durante la guía axonal, las moléculas se unen a sus receptores en los filopodios y disparan señales por medio de segundos mensajeros en regiones específicas del cono de crecimiento (Lin y Forscher, 1995). El control de la guía axonal resulta de la modulación dinámica de la actina en el cono de crecimiento, promoviendo su crecimiento hacia o en contra de una señal específica. Las señales repulsivas provocan la pérdida de F-actina en la punta del cono (Fan et al., 1993).

Varios miembros de la familia p21 de pequeñas guanosinas trifosfatasas (GTPasas) desempeñan un papel clave en la regulación de filamentos de actina en respuesta a señales extracelulares (Luo et al., 1997; Hall, 1998; Schmitz et al., 2000). Los efectos de las GTPasas en la morfología y motilidad neuronal podrían estar mediados, al menos parcialmente por la modulación del factor despolimerizante de la actina mediado por cofilina (Kuhn et al., 2000). El colapso del cono de crecimiento podría resultar de una disminución en la actividad Cdc42 y Rac1 simultánea a un incremento en RhoA; todas ellas GTPasas. (Jalink et al., 1994).

Otros componentes del citoesqueleto que desempeñan un papel fundamental en la formación y mantenimiento neurítico, son los microtúbulos. Estas estructuras están compuestas por tubulina y una variedad de proteínas menores conocidas como proteínas asociadas a la tubulina (MAPs). El nivel de éstas (y más aún su nivel de fosforilación) parece modular la estabilidad y dinámica de los microtúbulos. Un ejemplo de esto es la retracción neurítica inducida por una excesiva fosforilación de Tau, una de las MAPs más abundantes (Sayas et al., 1999). Se ha mostrado que las neuronas en regeneración cambian sus niveles de expresión de diversas proteínas (Korneev et al., 1997; Wu et al., 2000). Dos posibles blancos para la regulación negativa podrían ser la actina y tubulina, que contribuyen en gran medida a la extensión neurítica y predominan dentro de las proteínas sintetizadas durante la formación neurítica (Fine y Bray, 1971; Hoffman y Lasek, 1975).

El calcio ( $Ca^{2+}$ ) es un segundo mensajero importante. A pesar de que la entrada de  $Ca^{2+}$  no es necesaria para el crecimiento axonal (Usovits et al., 1990), varias líneas de investigación señalan que

tiene un papel regulador en la motilidad axonal (Letourneau, 1975). Los niveles de calcio en los conos pueden alterarse por su interacción con moléculas de adhesión celular, de matriz extracelular y por neurotransmisores. La motilidad del cono depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que la activación de los receptores de los filopodios, puede originar cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en cualquier dirección, afectando así la organización del citoesqueleto y modulando su motilidad. La activación local del filipodio en un lado del cono puede generar un gradiente de concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  y producir así un cambio de dirección (Nelly, 1993 y 1994).

Los filopodios censan el ambiente encontrando gran variedad de claves extracelulares, pero se desconoce que señales mandan a los conos de crecimiento. Elevaciones transitorias de calcio en los filopodios de neuronas espinales de *Xenopus* en cultivo pueden fungir como reguladores autónomos del movimiento de los filopodios y como señales codificadas en frecuencia, que son integradas en el cono de crecimiento. Formando parte de un posible proceso de señalización común para muchas otras células móviles (Gómez et al., 2001). La frecuencia de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  es substrato dependiente y pudiera deberse en parte a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales activados por receptores de la familia de las integrinas. Estos transitorios disminuyen el crecimiento neurítico por medio de una reducción en la motilidad de los filopodios y promueven giros cuando los filopodios estimulan diferencialmente de uno u otro lado del cono de crecimiento.

### **2.2.2 Mecanismos de crecimiento y guía axonal.**

Desde principios del siglo pasado se han desarrollado dos ideas generales acerca de la extensión de axones y la formación de sinapsis específicas. Una teoría propone que las neuronas se encuentran preespecificadas y por lo tanto solo forman conexiones sinápticas específicas. La otra propone que se establecen conexiones iniciales relativamente al azar y posteriormente son refinadas de acuerdo a su blanco, terminando con una eliminación de sinapsis incorrectas y con la muerte de neuronas con conexiones inapropiadas (Hamburger, 1939). Actualmente existe mucha evidencia de que el crecimiento axonal es selectivo (Stuermer et al., 1989; Fraser et al., 1990), a pesar de que en muchos casos al inicio es mucho mayor y el patrón del adulto se alcanza por eliminación (Innocenti, 1981; O'Rourke et al., 1990). En la guía axonal durante el desarrollo embriológico, es el reconocimiento molecular el que predomina y la actividad eléctrica modifica los circuitos una que vez que han sido establecidos (Hollyday et al., 1976; O'Brien et al., 1987; Thompson, 1983; Balice-Gordon y Litchman, 1990).

Con el fin de encontrar a sus blancos, las neuronas se valen de varios mecanismos. El ambiente proporciona una serie de señales químicas al axón en crecimiento, sin embargo las opciones para éste son limitadas; puede crecer, girar o detenerse. Durante el desarrollo éstos navegan activamente hacia sus blancos percibiendo señales químicas en el ambiente. El axón puede interactuar con la matriz extracelular (ECM), con moléculas de adhesión celular (CAMs) como la N-CAM, N-caderina y la glicoproteína L1 así como con factores solubles que dirijan su trayectoria. Así mismo durante su trayectoria puede encontrarse con otro axón y fascicularse con él, dependiendo de las moléculas de superficie que éstos expresen y de las moléculas de ECM entre otros factores. En vivo, categorías como inhibidora o promotora, se desvanecen ya que una molécula que produce crecimiento neurítico en un tipo neuronal, puede inhibirlo en otro o ser inerte en un tercero dependiendo de sus receptores. Aún en el mismo tipo neuronal puede tener efectos contrarios dependiendo del estado de desarrollo neuronal así como de las glicosilaciones y el estado en que se encuentre la molécula.

El proceso de regeneración (en el sistema nervioso periférico ya que el central casi no regenera) es un tanto distinto ya que puede existir una guía pasiva, constituida por matriz extracelular que dejaron los axones originales después de la degeneración. Sin embargo en invertebrados algunas neuronas centrales adultas son capaces de regenerar conexiones específicas en ausencia de glía o guías moleculares. En ambos casos al hacer contacto con su blanco (ya sea temporal o definitivo) el axon deja de crecer y comienza a formar ramificaciones terminales para establecer sinapsis.

Roger Sperry durante los años 40's realizó experimentos cruciales que indicaron que existían las claves químicas para la guía axonal, aunque se desconocía su identidad y funcionamiento. En los anfibios, el tectum del mesencéfalo es el principal centro visual en el cerebro y su nervio óptico tiene la capacidad de regenerar después de una lesión. Cuando el nervio óptico de la rana se corta y el ojo se gira 180° los comportamientos dependientes de las vías visuales se invierten. Si se le presenta a esta rana un mosca arriba intentará atraparla abajo y viceversa (Figura 3). Esto refleja la reconexión de los axones de la retina a sus blancos originales, a pesar de que éstos transmiten al tectum un mapa invertido del mundo externo, pero idéntico al formado en la retina. Sperry sugirió y probó que los axones de la retina habían regresado a sus blancos del tectum, concluyendo que el reconocimiento axón-blanco es químico y no se vale de reforzamiento funcional de conexiones formadas un tanto al azar.

La demostración de que el reconocimiento axón-blanco era químico, sentó las bases para la primera evidencia de la existencia de señales inhibitorias del crecimiento neurítico.

Ésta surgió de los experimentos en cultivo de Bonhoeffer y Huf (1982) y Walter, et al (1987), utilizando explantes de la retina y tectum de la rana, mostrando que los axones de la parte posterior de la retina se dirigen a la anterior del tectum, corroborados posteriormente en la membrana tectal de pez y ratón (Godement y Bonhoeffer, 1989; Vielmetter y Steurmer, 1989).

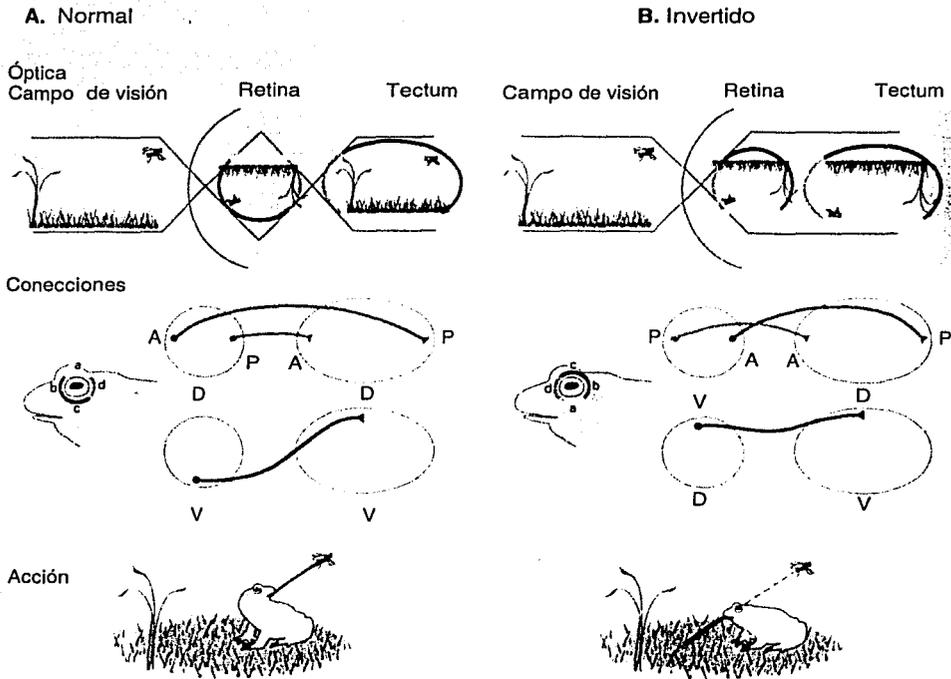
La preferencia de las fibras por la parte anterior refleja inhibición por parte de la región posterior (Figura 4). De éste bioensayo se aislaron moléculas inhibitoras y las llamaron señal repulsiva de la guía axonal (RAGS). Independientemente varios grupos de investigación identificaron un gran grupo de receptores con actividad de cinasa de tirosina, (actualmente llamados eph cinasas) y otra familia de ligandos de membrana llamados efrinas. Cuando lograron secuenciar las RAGS se dieron cuenta que ésta era un tipo de efrina, A5. Estas moléculas hacen que el cono de crecimiento cambie de dirección, inhibiendo el crecimiento axonal en dirección hacia las células que las producen.

Estudios bioquímicos revelaron que la molécula inhibitora más abundante en la parte posterior del tectum es una glicoproteína de 33 kDa que se une a la lectina PNA. Ésta desaparece aproximadamente en E15, coincidiendo con el momento en que la actividad inhibitora del tectum desaparece así como el establecimiento de los campos terminales de la retina en el tectum (Stahl et al., 1990). Actualmente se sabe que los axones alcanzan blancos lejanos en una serie de pasos, tomando decisiones en varios momentos en su camino.

### **2.2.3 Moléculas De Matriz Extracelular**

Las células de organismos multicelulares en desarrollo están rodeadas de moléculas de matriz extracelular (ECM), formada en su mayoría por diferentes colágenas, proteoglicanos y glicoproteínas. La ECM es el substrato en el que se lleva a cabo la morfogénesis de los tejidos en el desarrollo, brinda soporte y flexibilidad a los tejidos maduros y actúa como una entidad informacional que produce señales intracelulares vía distintos receptores de superficie celular. Por tanto las interacciones entre los receptores y la ECM ejercen gran influencia en la mayoría de los programas celulares incluyendo el crecimiento, la diferenciación, la migración y la supervivencia (Scheetz et al., 2000).

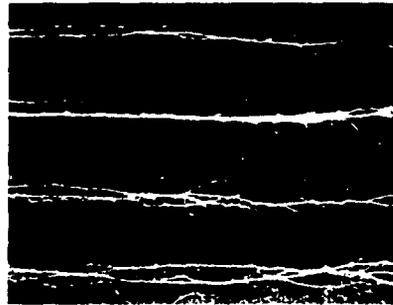
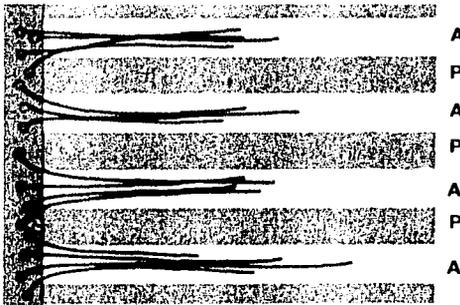
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 3. Los axones de la retina forman una representación topográfica de ésta en el tectum.**

- A. El cristalino proyecta una imagen invertida a la retina, y posteriormente el nervio óptico transfiere la imagen, con otra inversión al tectum óptico. Un arreglo ordenado de axones es responsable de transferir la imagen de la retina al tectum. Las neuronas de la retina anterior generan axones que terminan en el tectum posterior, las neuronas en la retina posterior proyectan al tectum anterior, las neuronas dorsales de la retina proyectan al tectum ventral y las neuronas ventrales de la retina al tectum dorsal. Como resultado de esto, el animal (una rana en este caso) es capaz de generar un comportamiento basado en una percepción visual fina (en éste caso atrapar una mosca).
- B. Cuando el nervio óptico regenera, posterior a una operación quirúrgica de un ojo desde su base, el comportamiento guiado con la vista es incorrecto. Cuando se le presenta una mosca sobre su cabeza, la rana la percibe abajo y viceversa. La inversión del comportamiento refleja el reconocimiento de los axones de la retina a su sitio de origen; a pesar de que estas conexiones transfieren ahora un mapa invertido del mundo en el tectum. P posterior, A anterior, D dorsal, V ventral, (modificado de Sanes y Jessel, 2000).

Posterior



Anterior



**Figura 4. Unión de efrinas a eph cinasas median señales inhibitoras que guían a los axones en desarrollo.**

Se extrajeron las membranas de las partes anterior y posterior del tectum óptico y se colocaron en franjas alternadas. Los axones de los explantes posteriores (temporales) de la retina crecen selectivamente en la membrana anterior, presentando la misma preferencia que muestran en vivo. En contraste, los axones de la retina anterior (nasal) crecen tanto en membranas anteriores como posteriores. El crecimiento preferencial de los axones en la membrana anterior resulta de la presencia de señales inhibitoras en la membrana posterior. A la izquierda se presenta el esquema simplificado de las imágenes de la derecha (modificado de Walter et al., 1987).

Las moléculas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) son secretadas localmente y ensambladas en una red organizada, asociada íntimamente con la superficie de las células que la producen.

La ECM está conformada por dos tipos de macromoléculas básicas:

- a) Los glicosaminoglicanos, que son cadenas de polisacáridos que generalmente se encuentran ligados covalentemente a proteínas en forma de proteoglicanos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

b) Proteínas fibrosas, generalmente en forma de glicoproteínas como la colágena, elastina, agrina, fibronectina, laminina, tenascina y Trombospondina (Figura 4).

Los proteoglicanos están compuestos por cadenas de glicosaminoglicanos unidas covalentemente a un corazón proteico, exceptuando el ácido hyalurónico. Estos se pueden distinguir de las glicoproteínas por la naturaleza, cantidad y arreglo de sus cadenas de azúcares. Por definición cuando menos una de las cadenas de azúcares de un proteoglicano debe ser un glicosaminoglicano. El corazón proteico de los proteoglicanos es generalmente una glicoproteína, pero puede tener hasta un 95% en peso de carbohidratos.

Las glicoproteínas están conformadas por dos o más cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Pueden contener de 1-60% de carbohidratos en peso, formando numerosas pero cortas cadenas ramificadas de oligosacáridos. Cada subunidad se caracteriza por una combinación de distintos motivos estructurales repetidos, algunos de los cuales son compartidos por varios miembros de este grupo.

Estas moléculas son expresadas tanto por neuronas como por células gliales y constituyen receptores de glicoproteínas y factores de crecimiento modulando su actividad. Entre ellos hay promotores e inhibidores del crecimiento neurítico.

### **Glicoproteínas de matriz extracelular**

La mayoría de las glicoproteínas interactúan con las células por medio de una familia de receptores conocidos como integrinas. Los receptores varían en la composición de sus subunidades y en su habilidad para unirse a las distintas moléculas de matriz extracelular, sin embargo todas las células tienen al menos una integrina y algunas expresan varios tipos. El dominio intracelular de las integrinas se une a componentes del citoesqueleto como la  $\alpha$ -actina y talina. Las interacciones que ocurren durante el acople de la membrana a la matriz (o a otras células por medio de CAMs) posibilitan los arreglos del citoesqueleto requeridos para que el cono de crecimiento avance.

Por su parte, la mayoría de las glicoproteínas son multifuncionales potencialmente. Por ejemplo la laminina no solo se une a la integrina, su receptor celular, sino que también se une a otras moléculas de laminina, heparina, proteoglicano de sulfato heparano, colágena IV, entactina, glicolípidos y a otros receptores aún no identificados. Así mismo hay redundancia en la función que ejercen estas moléculas sobre las células nerviosas. Un ejemplo de esto es la inhibición del

crecimiento en las células de Schwann, para lo cual deben aplicarse L1, N-caderina e integrinas en conjunto, ya que ninguna de éstas por separado previene el crecimiento (Bixby et al., 1988; Sellheimer et al., 1988).

- o Laminina

El grupo de moléculas promotoras del crecimiento más estudiado es el de las lamininas heterotriméricas, uno de los componentes principales de la lámina basal de vertebrados e invertebrados. La laminina es considerada como un promotor de crecimiento no selectivo (Masuda-Nakagawa et al., 1991), debido a que se localiza en muchas de las vías que los axones siguen durante la formación y regeneración del sistema nervioso. Muchas de sus isoformas se expresan diferencial y transitoriamente durante el desarrollo, sugiriendo que podría estar influyendo en la guía axonal y en la regeneración (Venstrom y Reichart, 1993).

- o Agrina

La agrina es liberada por las motoneuronas, está localizada en la placa neuromuscular y produce la concentración de receptores de acetilcolina ACh en fibras musculares; de ahí la capacidad regenerativa del músculo. La lámina basal tiene toda la información necesaria para agrupar receptores a ACh. Su expresión en muchos tipos neuronales del cerebro sugiere un papel importante en la sinaptogénesis a nivel central (Reichart y Tomaselli, 1991).

- o Fibronectina

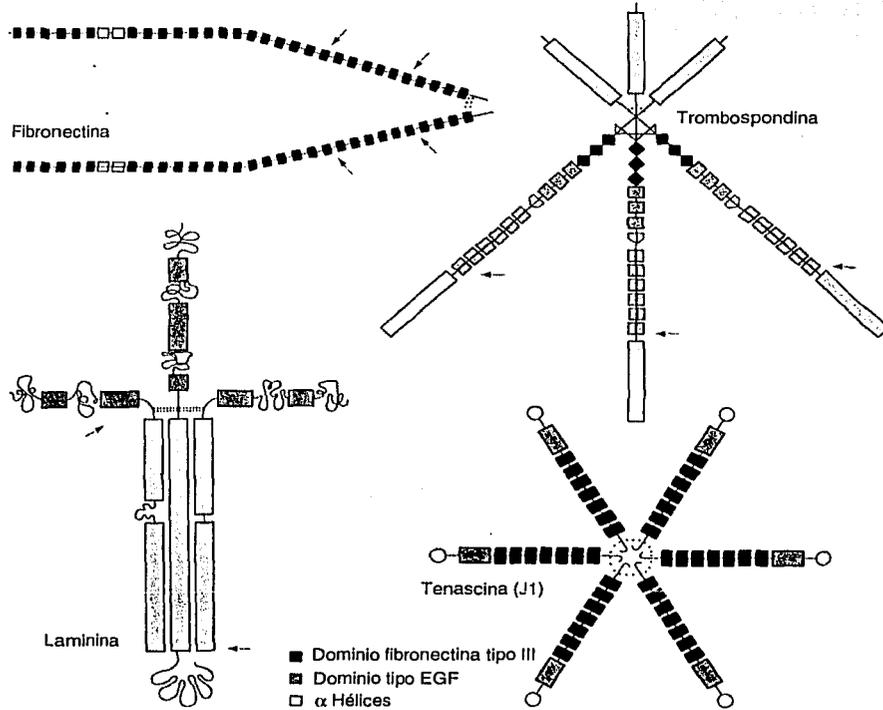
Participa en la migración, proliferación y crecimiento tanto en desarrollo como en regeneración. Su expresión temporal y espacial es muy específica. En el SNC decrece su expresión cuando comienza la diferenciación. En etapas del desarrollo en que se encuentra en bajos niveles, se incrementa considerable y específicamente después de una lesión (Humphries et al., 1988).

- o Colágenas

La gran variedad de colágenas presentes en la ECM desempeñan un papel estructural. Algunas de las cuales sirven de anclaje y otras promueven el crecimiento I y IV (Van der Rest y Garrone 1991).

o Trombospondina

Esta glicoproteína está constituida por 3 subunidades de 180 kDa, de la cual se conocen 4 tipos. Se encuentra en alto porcentaje en tejidos con alta proliferación y migración celular, mientras que su expresión está restringida en el adulto. Es capaz de unirse al factor de crecimiento transformante TGF- $\beta$  formando un complejo activo protegiéndola de las proteasas (Venstrom y Reichart, 1993).



**Figura 5. Moléculas de Matriz Extracelular**

Representación esquemática de la estructura de glicoproteínas de matriz extracelular. Tanto la fibronectina como la tenascina contienen múltiples dominios de fibronectina tipo III, la laminina, tenascina y trombospondina contienen múltiples dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) ricos en cisteína. Las líneas punteadas muestran las posiciones de puentes disulfuro entre sus subunidades y las flechas indican sitios de unión celular (modificado de Lander, 1989).

### o Tenascina

En contraste con muchas otras glicoproteínas, la familia de tenascinas (TN) tiene patrones de expresión en el embrión altamente restringidos y dinámicos, particularmente en el desarrollo del sistema nervioso, óseo y vascular. Estas moléculas se vuelven expresar en el adulto en procesos como cicatrización, regeneración nerviosa y en estados patológicos incluyendo enfermedades vasculares, tumores y metástasis.

Las tenascinas, entre otras moléculas de la ECM presentan funciones celulares contrarias dependiendo de su presentación (soluble o como sustrato) y de si se unen monómeros iguales o distintos, de la combinación con otras moléculas presentes, del tipo celular y del estado de diferenciación del tejido blanco. Su expresión está regulada por una variedad de factores de crecimiento, citosinas, péptidos vasoactivos, moléculas de matriz extracelular y factores bioquímicos.

La regulación de la expresión genética de la tenascina a través del "empalme alternativo", da como resultado diversas variantes polipeptídicas que presentan diferentes combinaciones de los dominios de las proteínas funcionales.

La tenascina-C (TN-C) fue la primera glicoproteína de esta familia en descubrirse (Chiquet et al., 1989) y por tanto sobre la que se han hecho más estudios funcionales y de regulación. Tiene subunidades de 190 y 300 kDa, formadas por diferentes dominios.

Las tenascinas presentan actividades adhesivas y contradhesivas que coexisten en la molécula nativa. Se unen con alta afinidad a varias proteínas y carbohidratos. Durante el desarrollo neural éstas tienen la capacidad de modular la unión hetero y homofílica entre familias de N-CAMs. Existen trabajos que apoyan que la tenascina promueve el crecimiento y otros proponen que impide la adhesión con el citoesqueleto de actina, induce el redondeo celular y por lo tanto puede considerarse como contra adhesiva (Spring et al., 1989; Murphy-Ullrich, et al., 1991; Prieto et al., 1992; Chung et al., 1996; Chung y Erickson, 1997; Fisher et al., 1997). Esto no debe tomarse como algo contradictorio con su efecto promotor del crecimiento *per se* ya que tanto éste como la división celular requieren desprendimiento y adhesión diferencial de las células a la matriz extracelular. Sin embargo varios estudios muestran claramente que la tenascina C inhibe la proliferación celular por medio de su efecto en el pH intracelular y del redondeo celular (Crossin, 1991; Krusehel et al., 1994). Así mismo la TN J1 (janusina) que aparece en 4 formas distintas en el desarrollo se ha identificado por su efecto inhibitor. En etapas tempranas del

desarrollo embrionario aparecen 220 y 200Kda y en las tardías 180 y 160KDa (Kruse et al., 1984; Pesheva y Probstmeier, 2000).

#### 2.2.4 Factores solubles

Los factores solubles son moléculas capaces intervenir en la supervivencia, crecimiento o inhibición y dirección del axón generalmente por medio de gradientes de concentración mediante los cuales actúan sobre los conos de crecimiento. Para que estos gradientes sean exitosos en un medio donde la concentración basal varía en varios órdenes de magnitud, los conos de crecimiento son capaces de desensibilizarse y resensibilizarse consecutivamente. Este comportamiento adaptativo posibilita al cono de crecimiento a re-ajustar su sensibilidad a un amplio intervalo de concentración de éstos factores guía, lo cual es esencial para la quimiotaxis a largo alcance (Guo-li Ming et al., 2000).

Las neurotrofinas son factores solubles, que promueven la supervivencia neuronal, así como múltiples aspectos del desarrollo del sistema nervioso en vertebrados, incluyendo diferenciación neuronal, crecimiento axonal e innervación del órgano blanco (Kristein y Farinas, 2002). Así mismo se ha visto que participa en la regulación de la liberación cuántica en el sistema nervioso central y periférico, modulando micodominios de  $Ca^{2+}$  en zonas activas, son capaces de cambiar del modo lento de endocitosis al rápido ("kiss and run") durante la transmisión sináptica de alta frecuencia, permitiendo una transferencia de información más confiable (Tyler, et al., 2002). Los descubrimientos de Rita Levi Montalcini y Victor Hamburger sobre la regulación de la muerte neuronal por el tamaño del órgano blanco produjo la hipótesis del factor neurotrófico. El factor de crecimiento neurotrófico (NGF) fue el primero en descubrirse, constituyendo la primer evidencia de ésta hipótesis (Kandel et al., 2000). Las neurotrofinas más estudiadas han sido aisladas de mamíferos y son: NGF, BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-3 (Neurotrofina 3), NT-4/5 (Neurotrofina-4/5).

Frecuentemente, las moléculas secretadas para la quimiotaxis provienen del blanco, sin embargo no siempre son secretadas por éste, como en el caso de los músculos de las extremidades del pollo (Landmesser et al., 1980) donde la extensión de los axones, la formación del plexo y nervios musculares ocurren antes de que se desarrolle el músculo. En casos como este, la vía se va formando con blancos intermedios, como células poste, que son generalmente neuronas inmaduras. Esto se ha demostrado tanto en invertebrados como en vertebrados,

removiendo las células poste con irradiaciones mediante un láser antes de que se establezca el contacto. Con ello el cambio de dirección no se lleva a cabo (Kwada, 1986).

La búsqueda directa de quimioatrayentes condujo al aislamiento de las netrinas, glicoproteínas con actividad trópica que son secretadas por diversas células durante el desarrollo, regeneración y en algunos casos a lo largo de la vida del animal.

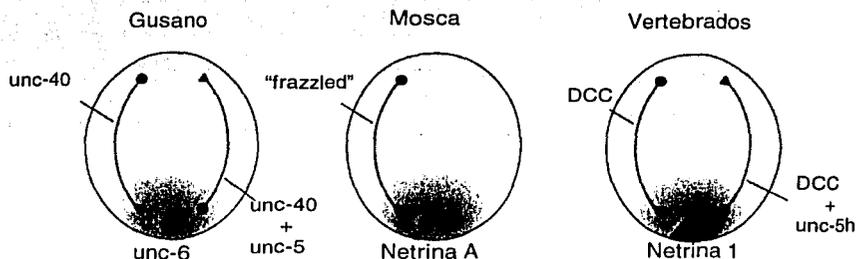
En vertebrados se conocen dos genes que codifican para netrinas, estas proteínas actúan en dos grupos de receptores, ambos inmunoglobulinas. Las netrinas son moléculas bifuncionales atrayentes o repulsivos (Figura 6), dependiendo del receptor celular así como solubles y de membrana. Se sabe que estas proteínas se encuentran altamente conservadas filogenéticamente con base en sus homólogos en invertebrados.

Actualmente se conoce otro grupo de moléculas inhibitoras conocidas como semaforinas. Estas provocan que el cono se colapse y deje de crecer en dirección al gradiente de concentración para comenzar a hacerlo en otra. Las distintas semaforinas afectan selectivamente a distintos tipos neuronales, muchas de las cuales al igual que las netrinas se han encontrado en tejidos distintos al nervioso. Estas moléculas actúan sobre dos tipos de receptores, las plexinas y las neurofilinas que pertenecen a las inmunoglobulinas. Algunas semaforinas se unen a la membrana y actúan a corto alcance, pero otras (las que son secretadas) pueden servir como quimiorepulsivas. El efecto de estas proteínas, ya sea en forma soluble o como sustrato depende en gran medida del receptor celular. Así mismo alteraciones en la concentración de mensajeros cíclicos pueden interconvertir respuestas atrayentes en repulsivas.

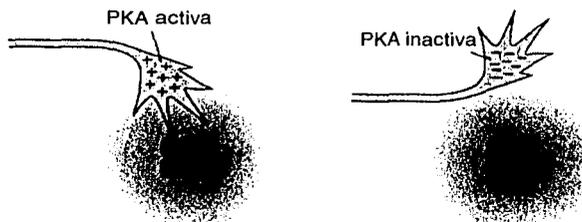
### **2.2.5 Neurotransmisores y actividad eléctrica**

Estudios en cultivos celulares han mostrado que los conos de crecimiento se retraen al entrar en contacto con ciertos neurotransmisores. En neuronas del caracol, la serotonina y dopamina causan retracción neurítica (Haydon et al., 1984 y 1987; Mc Cobb et al., 1988). Efectos similares ocurren en conos de crecimiento de dendritas de neuronas piramidales del hipocampo de ratas expuestas a glutamato, mientras que los conos de los axones no se afectan (Mattson et al., 1988). Así mismo la estimulación de los receptores embrionarios a la dopamina D1 impide la movilidad del filipodio y la extensión neurítica en neuronas de la retina de pollo (Lankford et al., 1988).

**A. Conservación evolutiva de la expresión y función de los receptores a netrina**



**B. La activación de la PKA modifica la respuesta del cono de crecimiento a las netrinás**



**Figura 6. Moléculas que dirigen el cruce de axones centrales en la línea media están altamente conservados filogenéticamente.**

**A.** En tres phyla estudiados factores específicos son secretados por células de la línea media e interactúan con los axones que crecen dorsal y ventralmente. El factor (*unc-6*) y sus receptores (*unc-5* y *unc-40*) fueron descubiertos en gusanos. El receptor *unc-5* desempeña un papel predominante en los axones que crecen lejos de la línea media, por el contrario el receptor *unc-40* es responsable del crecimiento hacia la línea media. Los factores homólogos de la línea media (*netrinás*) y sus receptores ("*feazzled*" o *DCC* en los axones dorsales y *unc-5h* en los axones ventrales) se ha encontrado en moscas y vertebrados. Los componentes clave de la maquinaria responsable de la guía axonal en circunferencia se encuentra filogenéticamente conservada, a pesar de que la arquitectura del sistema nervioso varía drásticamente entre los phyla. **B.** El estado de activación de la proteína cinasa A (*PKA*) en los conos de crecimiento puede alterar la respuesta a un gradiente de *netrinás*. Bajo condiciones de actividad de la *PKA*, como por la presencia de altas concentraciones de *AMPc*, los conos de crecimiento son atraídos; mientras que bajo condiciones donde la *PKA* está inactiva, los conos son repelidos (modificado de Ming et al., 1997).

En cultivos de células disociadas de la retina de rata se ha encontrado acetilcolina ACh, aparentemente de origen endógeno, proveniente probablemente de las células amacrinas (Lipton, 1988). Si se bloquean farmacológicamente los receptores nicotínicos se induce el crecimiento y la re-elongación de las células ganglionares de la retina, lo que sugiere que niveles tónicos de ACh presentes en el medio de cultivo inhiben el crecimiento (Lipton, 1988). El efecto inhibitorio producido por neurotransmisores excitadores puede contrarrestarse si se aplican neurotransmisores hiperpolarizantes; ACh para neuronas de caracol y GABA para neuronas piramidales de la rata (Mc Cobb, 1988; Mattson y Kater, 1989).

Por otro lado la actividad eléctrica también es una señal para detener el crecimiento del cono en algunos tipos neuronales (Cohan, 1990; Nelly, 1995). Si se estimula la sinapsis, se incrementa la eliminación de fibras en el músculo (O'Brien et al., 1978). Mientras que si se elimina la actividad eléctrica añadiendo tetrodotoxina (TTX) disminuye la eliminación sináptica. Esto también ocurre en el sistema nervioso central (Thompson, 1983), el establecimiento de la dominancia ocular es un claro ejemplo de esto. En un principio los axones del núcleo geniculado lateral se sobreponen mucho en la capa 4 de la corteza y posteriormente en columnas separadas para el ojo izquierdo y derecho. En este caso el patrón de actividad en las terminales tiene un papel decisivo en el resultado de la competencia.

### **2.3 LA SANGUIJUELA EN ESTUDIOS DE REGENERACIÓN NEURÍTICA**

El sistema nervioso central de la sanguijuela ha sido de gran utilidad para estudiar las bases celulares de la regeneración. Las sanguijuelas son animales segmentados que pertenecen al *Phylum Anellida*. Su sistema nervioso central SNC está constituido por una cadena de 21 ganglios segmentales, un cerebroide y uno caudal que corren ventralmente a lo largo del animal. Tanto el ganglio cerebroide como el caudal están formados por la fusión de varios ganglios segmentales; mientras que los otros 21 son iguales entre sí, con excepción de los que inervan al corazón y órganos sexuales (5 y 6). Todos ellos están unidos por medio de 2 nervios conectivos, formados por el conjunto de axones de las neuronas contenidas en los ganglios y envueltas por una vaina de glía y tejido conectivo (Figura 7). Cada segmento del animal está inervado por un ganglio a través tractos nerviosos que emergen por 2 raíces a cada lado de éste.

Nombre	Peso molecular (kDa)	Origen	Unen PNA	Soporta crecimiento neurítico como único sustrato	Propiedades extra a la inhibición neurítica (vía inhibición)
Nogo A B C	35 250 220	Oligodendrocitos rata bovino (postnatales) Mielina	NO	NO	Regulación tónica del crecimiento neurítico, bloqueando la expresión de genes asociados al crecimiento de células neuronales y no neuronales. Vía la familia de GTPasas pequeñas (Rho) . Produce un incremento $Ca^{2+}$
MAG (Glicoproteína asociada a la mielina)	_____	mielina	_____	NO	Por medio de unión a ácido siálico. Vía Rho cinasa, aumento en cAMP bloquea la inhibición.
Efrina A5 (derivada del tectum)	33	Membranal (pollo E5-14)	SI	poco	Colapso del cono de crecimiento
Derivada de la somita	48/55	Membranal (Pollo E3)	SI	SI	Colapso del cono de crecimiento
Derivada del cerebro	_____	De membrana (pollo)	_____	_____	Actúa sobre neuronas sensoriales y de retina
Cápsula ganglionar	_____	Sanguijuela (ECM)	SI	_____	Inhibe el crecimiento neurítico, formación de neuritas primarias y ramificaciones de neuronas identificadas. (AP y AE)
Tenascina	1000-1900	ECM (Astrocitos)	_____	si	_____
Laminina-s	_____	ECM	_____	_____	Posible señal derivada del blanco para inducir que el axón se detenga y se diferencie.
Semaforinas: Sem I (Fasciclina) Sem II Sem III (Colapsina homóloga) Sem soluble	_____	Grillos y Drosophila Pollo y Humano  varios	_____	SI	Inhibe ramificación y defasciculación. Inhibe sinaptogénesis Colapso conos de crecimiento Sem I, II, y III tiene dominios transmembranales.  Giro no colapso en c. crecimiento
Proteoglicano Heparán/condroictin sulfato	_____	Cicatriz glial en SNC vertebrados	_____	_____	_____
CD44 (molécula de superficie celular)	_____	Pollo (población neuronal en quiasma óptico)	_____	_____	Repulsiva para las células e la retina
Robo (gen)	_____	Drosophila	_____	_____	"inhibición putativa" "Knock out" hace que los axones que normalmente crecían a lo largo de la s vías longitudinales ahora lo hagan a través de éstas.

Tabla 1. MOLÉCULAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO NEURÍTICO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

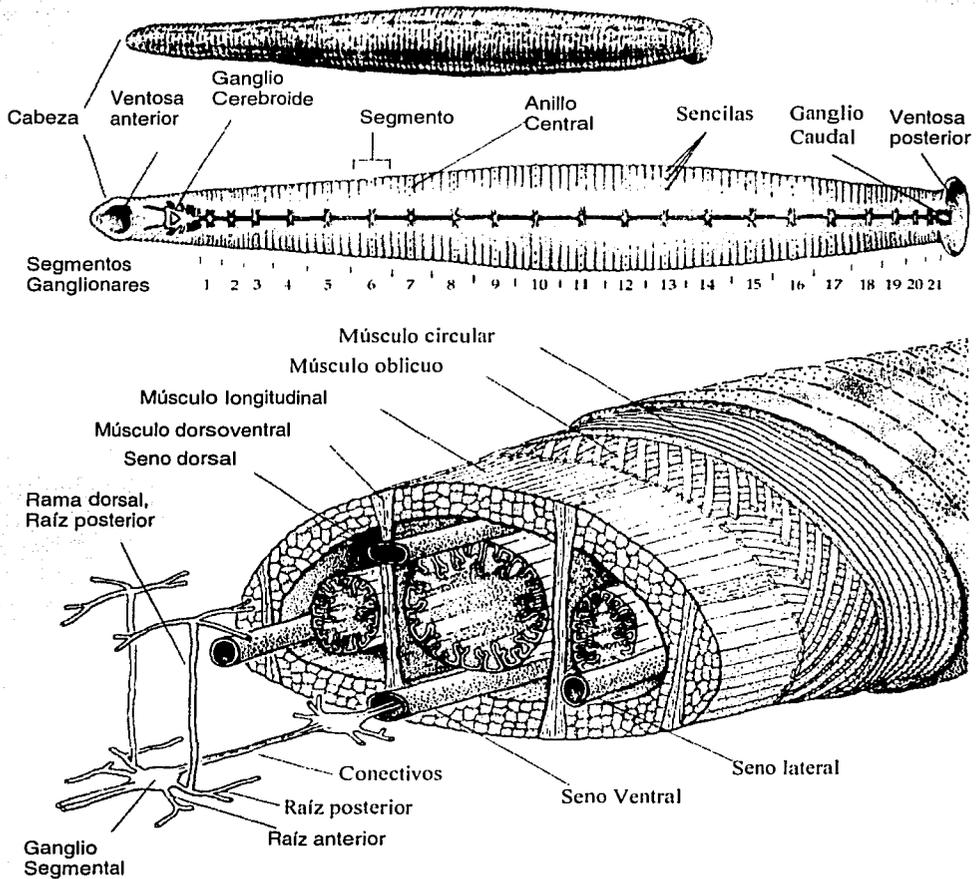
Cada ganglio segmental en la especie *Hirudo medicinalis* está constituido en la periferia por 400 somas neuronales aproximadamente recubiertos por una glía gigante y sus árboles dendríticos formando el neuropilo en el interior (Figura 8) a excepción de los ganglios 5 y 6 que contienen alrededor de 700. Todo esto está contenido por la cápsula de matriz extracelular que se continúa hacia los conectivos y raíces. Muchas de estas neuronas están identificadas además de por su localización, por su morfología, electrofisiología, neurotransmisores, conexiones sinápticas y algunas de ellas por su función.

El sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* conserva la capacidad de regeneración anatómica y funcional durante toda la vida del individuo. Es posible identificar sus grandes neuronas morfológicamente y fisiológicamente. En cultivo las neuronas adultas conservan las propiedades eléctricas, transmisores y receptores que poseen in vivo (Nicholls 1987), posibilitando el estudio de la regeneración neurítica a nivel celular paso a paso.

Después de una lesión una sanguijuela no es capaz de nadar ni desplazarse adecuadamente, sin embargo cuatro semanas después, el nado se recupera, se haya o no reparado la lesión anatómicamente; lo cual refleja un alto grado de plasticidad funcional en estos animales. Experimentos pioneros en la sanguijuela probaron que es un buen sistema para estudiar la regeneración. Siete semanas después de cortar el conectivo u ocho días después de comprimirlo, el sitio de lesión es prácticamente imposible de detectar (Baylor y Nicholls, 1971; Wallace, 1977). Esta regeneración no es solo anatómica sino que las neuronas se reconectan con precisión (Müller, 1979). Para que esto suceda se requiere, entre otros factores que las neuronas recuperen su capacidad de crecimiento dirigido y sinaptogénesis; aunado a la presencia de una combinación adecuada de moléculas de matriz extracelular promotoras o inhibitoras para producir el patrón de inervación específico de cada tipo neuronal.

### 2.3.1 Regeneración en cultivo

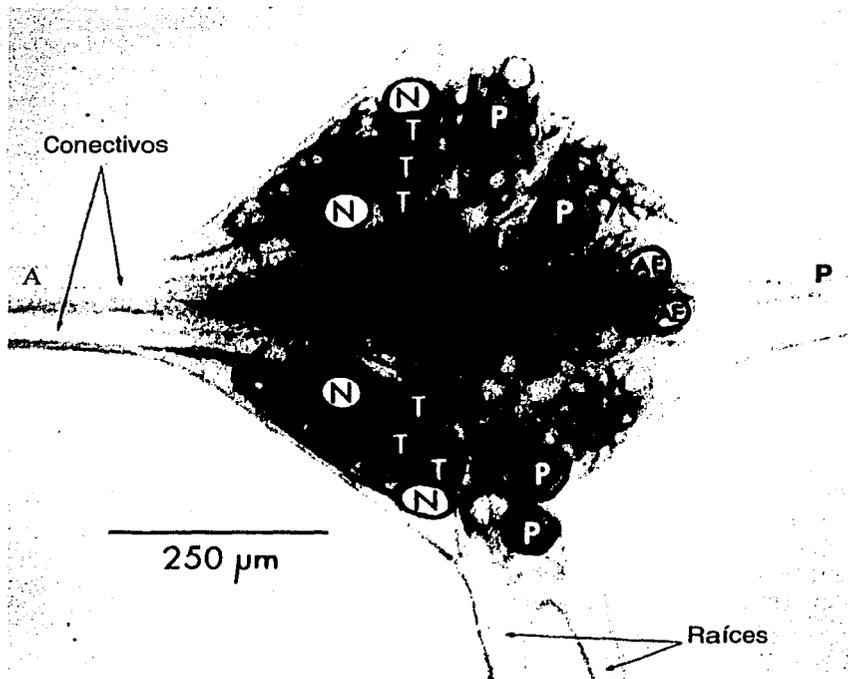
Substratos que contienen laminina o tenascina incrementan la tasa de crecimiento en neuronas de sanguijuela e influyen en su patrón de ramificación y la distribución de sus canales de  $Ca^{2+}$ . Diferentes neuronas responden a moléculas de MEC de manera individual y así con pocas moléculas se pueden obtener varios efectos (Masuda-Nakagawa et al., 1991; Fawcett, 1964). Posterior a la extracción del paquete neuronal, las cápsulas son un buen sustrato para la adhesión y crecimiento neurítico; en el que las neuronas despliegan patrones de crecimiento característicos.



**Figura 7. Sistema Nervioso Central de la Sanguijuela.**

- A.** En la parte superior, una vista dorsal de la sanguijuela. En la inferior, una vista ventral mostrando el sistema nervioso central de la sanguijuela esta formado por una cadena de 21 ganglios segmentales, un cerebroide y otro caudal, los dos últimos constituidos por la fusión de varios segmentales. El segmento metamérico está formado por 5 anillos. **B.** Corte transversal de una sanguijuela mostrando el sistema nervioso central formado por ganglios unidos entre sí por los nervios conectivos y se encuentra recubierto por el seno ventral. Cada ganglio de la cadena se encarga de inervar un segmento metamérico del animal por medio de raíces (Nicholls et al., 2001).

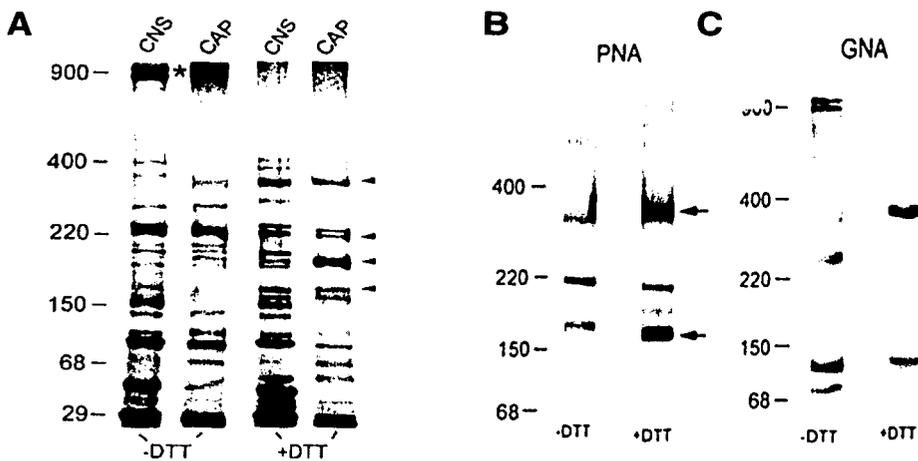
Éstos son más semejantes a los del animal y completamente distintos a los que forman en otros substratos; ya sean extractos de glicoproteínas endógenas o substratos exógenos como plástico o lectinas vegetales. Por esto pueden ser utilizados para distinguir diversos tipos neuronales de sanguijuela (Fernández de Miguel, 1997). Los patrones de crecimiento en ellas están dados por la interacción entre la compleja composición proteica (Figura 9) y los diversos receptores neuronales.



**Figura 8. Ganglio Segmental de la Sanguijuela.**

Esta es una vista ventral de un ganglio de la sanguijuela con sus conectivos y raíces. La A señala la parte anterior y la P la posterior del animal. Las neuronas más grandes son las Retzius (Rz), posteriormente las Pagoda Anterior (AP) y las más posteriores son las Erectoras del Anillo (AE). Así mismo se observan neuronas mecanosensoriales que responden a tacto (T), de presión (P) y a estímulos nociceptivos (N), (modificado de Nicholls y Baylor 1968).

Las neuronas AP adultas de sanguijuela, cultivadas en matriz extracelular del interior de la cápsula del ganglio presentan un patrón de crecimiento bipolar muy estereotipado, similar al del día 9 de su desarrollo embrionario (Gao y Macagno, 1987). Este patrón consiste en neuritas primarias creciendo en direcciones opuestas, permitiendo una cuantificación precisa y evaluar sus cambios al modificar variables. Al realizar estudios de perturbación en la cara interna de la cápsula utilizando PNA a diferentes dosis se incrementa la longitud neurítica total, el número de neuritas primarias y se pierde el patrón bipolar en forma dosis dependiente (De-Miguel et al., 2002). En otros sustratos como son la Con A, el exterior de la cápsula o extractos de laminina, éste mismo tipo neuronal presenta un crecimiento mucho mayor tanto en longitud como en área ocupada.



**Figura 9. Composición glicoprotéica de cápsulas ganglionares y su reconocimiento mediante lectinas**

**A.** Perfil electroforético de homogenados del sistema nervioso central y de cápsulas ganglionares, antes (-DTT) y después (+DTT) de su reducción con ditioneol (DTT). El asterisco señala bandas de 900kDa, correspondientes a la laminina de sanguijuela. Las cabezas de flecha señalan bandas de 220, 340 y 160- 180 kDa, presumiblemente subunidades de laminina. **B.** El patrón de reconocimiento de la lectina PNA sobre transferencias en nitrocelulosa no se modificó después de reducción con DTT, sin embargo las bandas de 340 y 180 kDa se incrementaron. **C.** Por el contrario el patrón de reconocimiento de la lectina GNA si se modifica después de la reducción (tomada de De-Miguel et al., 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **2.3.1 Moléculas de matriz Extracelular en Sanguijuela**

Tanto las moléculas de matriz extracelular como los factores solubles involucrados en procesos de formación y regeneración del sistema nervioso están muy conservadas filogenéticamente, por lo que los hallazgos en este tema representan posibles mecanismos de acción generales.

Moléculas de la matriz extracelular extraídas del sistema nervioso central de la sanguijuela inducen un extenso crecimiento de neuronas identificadas del mismo animal en cultivo. Entre ellas se han identificado específicamente tres tipos; la laminina, la tenascina y la colágena tipo IV. Subgrupos de glicoproteínas de la cápsula ganglionar han sido identificados de acuerdo a su patrón de glicosilación; por medio de su unión a dos lectinas distintas.

La lectina GNA (Galanthus Nivalis Agglutinin) que se une a manosa terminal unida a manosa reconoce laminina, 900 kDa (Figura 9 C). Mientras que la lectina PNA que reconoce galactosa terminal unida a  $\beta(1-3)$  galactosamina, se une a 4 glicoproteínas (o posibles subunidades) con un perfil electroforético muy similar antes y después de la reducción con ditioetiol DTT; 160,180, 220 y 340 kDa (Figura 9 B). A pesar de que ninguna de éstas bandas corresponde con alguna proteína identificada del sistema nervioso central de sanguijuela, se sabe que éstas inhiben el crecimiento neurítico. Debido a la semejanza entre algunos pesos moleculares de las bandas reconocidas por estas dos lectinas podríamos, pensar que hay un cierto traslape, sin embargo el PNA no reconoce ninguna banda transferida del extracto de laminina (De-Miguel et al., 2002).

#### **Moléculas que unen PNA**

A pesar de que se desconoce la identidad de las glicoproteínas del sistema nerviosos central de la sanguijuela que une PNA, se sabe que son 4 polipéptidos que inhiben el crecimiento neurítico de las neuronas Pagoda Anterior en cultivo. (De-Miguel, 2000).

#### **Laminina**

La laminina de sanguijuela purificada tiene forma de cruz, similar a la de vertebrados, pero a pesar de su similitud no tiene actividad cruzada con anticuerpos de vertebrados. Esto puede deberse a diferencias en el sitio de reconocimiento. Tiene un peso molecular de 1000 kDa con subunidades de 340, 220,180 y 160kDa, las cuales son reconocidas por la lectina GNA posteriormente al tratamiento con DTT, concordando con lo descrito por Chiquet et al 1998. Como sustrato, tanto la laminina como la tenascina inducen crecimiento extenso y rápido en neuronas de Retzius (Rz) y

Pagoda Anterior (AP) en cultivo (Masuda-Nakagawa; et al 1991, Masuda-Nakagawa; et al 1992, De-Miguel F; et al 1997 y 2000).

Ésta es producida transitoriamente durante el desarrollo embrionario por células gliales y musculares del sistema nervioso central a partir de E8 hasta E12, reapareciendo en E15. En el adulto se encuentra únicamente en el exterior tanto de los conectivos y como de la cápsula ganglionar, en la superficie basal de la membrana endotelial y en células gliales. Después de una lesión, su concentración aumenta en el sitio específico, en el interior de la cápsula y conectivos (Coggeshall y Fawcett, 1964; Luebke et al., 1995).

En caso de una lesión en el sistema nervioso central la laminina se distribuye en los sitios lesionados, incrementa su densidad hasta por un mes y se mantiene ahí al menos por dos meses, que es el mayor tiempo monitoreado, a pesar de que las fibras regeneran y establecen sinapsis en tres semanas. Dos días después de aplastar los conectivos aparece la laminina en su interior, correlacionando con la aparición de microglía en el sitio de la lesión. Mediante microscopía electrónica se mostró que la laminina se encuentra asociada a los conos de crecimiento (Masuda-Nakagawa et al., 1990). A pesar del incremento en la cantidad de laminina no se sabe por cuanto tiempo las neuritas siguen siendo sensibles a ella. En otros tipos celulares como las células ganglionares de la retina de vertebrados, la sensibilidad a la laminina se pierde rápidamente (Cohen et al., 1986).

Durante el desarrollo y la regeneración el cono de crecimiento interactúa con el medio, percibiendo señales y reaccionando de manera específica para dirigir al axón hasta sus blancos. Las señales provienen de moléculas de matriz extracelular, factores solubles, contacto con otras células, neurotransmisores y actividad eléctrica. El comportamiento de la neurona dependerá de la interacción de sus receptores con las señales ambientales. Estas pueden ser promotoras, inhibitorias, atrayentes o repulsivas y provocar que el cono de crecimiento continúe creciendo, se ramifique, se colapse o cambie de dirección.

La interacción con las moléculas de matriz extracelular es uno de los primeros pasos en la formación del sistema nervioso y es indispensable para la formación de conexiones. En éste trabajo se estudió específicamente al papel que desempeñan glicoproteínas inhibitorias que unen PNA en la formación de los patrones de regeneración neurítica. Se eligieron éstas glicoproteínas debido a que se cuenta con evidencia contundente de que proteínas glicosiladas de tal manera que unan PNA, inhiben

el crecimiento neurítico en vertebrados y en la matriz extracelular del sistema nervioso central de la sanguijuela.

Nos interesó saber hasta que punto se trataba de un mecanismo general, donde las variantes en los patrones de crecimiento se debieran a una sensibilidad diferencial a la inhibición producida por éstas moléculas. De ahí que seleccionáramos 3 tipos neuronales con patrones de regeneración en cápsula radicalmente distintos en la cápsula. La ventaja de utilizar el interior de la cápsula como preparación radica en que es un punto intermedio entre realizar experimentos in vivo (donde es imposible aislar variables) y cultivos en substratos exógenos, permitiendo un mejor acercamiento a lo que está sucediendo en el animal.

En principio se tomó como base el de las neuronas AP, debido a que su patrón bipolar facilita la interpretación de las posibles modificaciones. Las neuronas de Rz que crecen profusamente y las motoneuronas AE, en las que se reportaba una regeneración mínima en éste substrato. (De-Miguel y Vargas, 1997). El que los tres tipos neuronales crecieran profusamente tanto en substratos endógenos: laminina y tenascina como exógenos; la lectina concanavalina A (Chiquet y Acklin, 1986, Grumbacher y Reinert, 1989) fue lo que nos permitió suponer que había algo que estaba limitando su crecimiento en la cápsula y que éste no se debía únicamente a su identidad.

### 3. HIPÓTESIS

- Si el subgrupo de glicoproteínas de matriz extracelular que unen la lectina PNA inhibe del crecimiento neurítico, entonces el bloqueo de la interacción de éstas glicoproteínas con sus receptores celulares mediante PNA producirá un incremento en el crecimiento neurítico dependiente del tipo neuronal.
- Si se trata de una neurona con crecimiento limitado en el interior de la cápsula en comparación con otros substratos, como es el caso de las neuronas Pagoda Anterior (AP) y Erectoras del Anillo (AE); entonces al bloquear la inhibición ejercida por el subgrupo de glicoproteínas que unen PNA se espera obtener un aumento en la longitud neurítica total.
- Si es una neurona con crecimiento profuso en el interior de la cápsula igualmente que en otros substratos como la de Retzius (Rz), al bloquear las glicoproteínas que unen PNA se espera que su longitud neurítica total no se modifique significativamente.

### 4. OBJETIVOS.

- Cuantificar las diferencias entre los patrones de regeneración de las neuronas AE, AP y Rz creciendo en cápsulas en presencia y en ausencia de la lectina PNA. De esta manera será posible deducir el papel que desempeñan en la regeneración neurítica las glicoproteínas de matriz extracelular que unen PNA en relación con el tipo neuronal.
- Cuantificar los patrones de crecimiento por medio de la comparación de los siguientes parámetros: longitud neurítica total, número de neuritas primarias y número de puntos de ramificación.
- Comparar los registros intracelulares de las neuronas AP, AE y Rz con y sin PNA para ver si las diferencias observadas en los patrones de crecimiento también se ven reflejadas en su actividad eléctrica.

## **5. MÉTODOS:**

### **5.1 Disección de sanguijuelas y obtención cápsulas:**

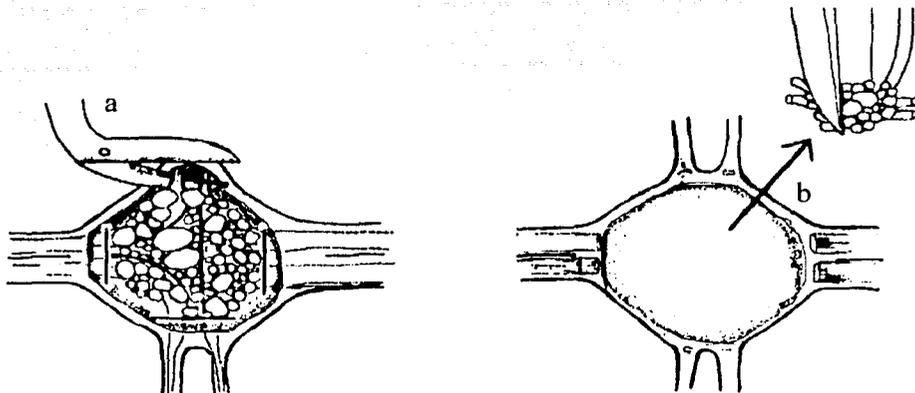
Los experimentos fueron realizados en sanguijuelas adultas de la especie *Hirudo medicinalis*. Para aislar la cadena nerviosa se fijó a la sanguijuela (con el lado ventral hacia arriba) con minutas en una caja de petri recubierta con sylgard. Se cortó la epidermis y los músculos con un bisturí hasta visualizarla cuidando de mantenerla todo el tiempo sumergida en Ringer (solución fisiológica para sanguijuela Müller et al., 1981). El sistema nervioso central de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* se encuentra recubierto por una red de tejido conectivo, la cual se abrió con una tijera de disección muy fina dejándola únicamente en los extremos de las raíces de cada ganglio para su fijación posterior. Se cortó tanto el extremo anterior como el posterior incluyendo los ganglios cerebroide y caudal respectivamente. Se fijó la cadena en una caja de petri (3.5 cm de diámetro) recubierta de sylgard con unas minutas muy finas en grupos de 3 o 4 ganglios.

Para obtener cápsulas ganglionares libres de células, se abrieron mediante pinzas muy finas y se removieron todas las neuronas cortando los axones que forman los nervios conectivos y raíces nerviosas como se muestra en la Figura 10 (Fernández De-Miguel, 1997). Mediante éste procedimiento es posible remover el neuropilo y el paquete neuronal simultáneamente (b).

Posteriormente las cápsulas fueron incubadas en por 20 minutos en una solución Ringer con 2% de Triton X-100 (Sigma). Este procedimiento mejoró la adhesión y visualización de los somas y neuritas sin afectar su crecimiento (Fernández De-Miguel, 1997). Las cápsulas se esterilizaron individualmente lavándolas varias veces en L-15 con 1mg/ml de gentamicina. Finalmente se sembraron en cajas de petri multipozos con fondo de vidrio, para el monitoreo del crecimiento con óptica Nomarski. Se cuidó de mantener la cara interior de la cápsula hacia arriba donde se sembraron las neuronas.

### **5.2 Obtención de neuronas:**

Se extrajeron del sistema nervioso central de la sanguijuela neuronas identificadas de acuerdo al procedimiento descrito por Dietzel et al., (1986). En breve, se extrajo la cadena nerviosa, y se abrió la cápsula ganglionar dejando expuestos los somas celulares. Los ganglios (exceptuando el 5 y 6) se descapsularon y se mantuvieron en medio de cultivo L-15 (Gibco, México, DF) suplementado con 6 mg/ml, de glucosa, 0.1 mg/ml de gentamicina (Sigma St. Louis, MO) y 2 % de suero fetal bovino (FSC; Gibco) y fueron incubados, en agitación por 1 hora en 2 mg/ml de



**Figura 10.** A la derecha se encuentra un ganglio con los somas neuronales expuestos. Para la obtención de cápsulas, se cortan (a) los axones que forman los nervios conectivos y raíces. Posteriormente con unas pinzas pequeñas se remueve (b) el paquete celular ( tomado de Fernández de Miguel, 1997)

colagenasa/dispasa (Boehringer-Mannheim, Darmstadt, Germany). Después de tratamiento enzimático las neuronas de Rz, AP y AE fueron identificadas visualmente de acuerdo a su tamaño y localización, extraídas por succión (Figura 10 c) y lavadas varias veces en L-15 para esterilizarlas y remover derbis. Únicamente neuronas con muñones (pequeña reminiscencia de ramas primarias) fueron usadas en éstos experimentos, ya que el muñón es la parte preferencial para el crecimiento neurítico. Las neuronas fueron sembradas con el muñón en contacto con el sustrato. Una vez sembradas las células se agregó (1 mg/ml) PNA al medio de cultivo del 50 % de las cajas de petra, dejando el otro 50 % sin PNA, como controles. A la mañana siguiente se agregó (20 ml/ ml) suero a todas las cajas.

### 5.3 Crecimiento en diversos sustratos y experimentos de perturbación:

Para los experimentos de perturbación se sembraron las neuronas de Retzius, AP y AE en la cara interna de la cápsula y se le añadió 1.0µg/ml la lectina PNA, concentración que causa la pérdida del patrón bipolar en neuronas AP (De-Miguel, 2002). Como control se utilizó la misma preparación sin PNA. Para probar que la lectina PNA no tuviera efectos promotores o inhibidores por si misma (mediante la unión a receptores celulares), se sembraron los tres tipos neuronales sobre cajas de petri recubiertas con PNA (2 µg/ml). Como controles también se sembraron sobre Con A a la misma

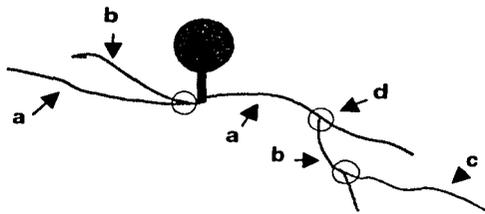
concentración. El efecto promotor del crecimiento de esta lectina en los tres tipos neuronales estudiados está reportado (Chiquet y Acklin, 1986; De-Miguel, 1997). Otras se sembraron directamente sobre plástico para comparar los patrones de crecimiento producidos con los generados en presencia de las lectinas.

#### 5.4 Monitoreo del crecimiento:

Las neuronas sembradas en cápsulas ganglionares fueron examinadas con óptica Nomarski con un objetivo de 40X y contraste de fase con un objetivo 20X para las sembradas sobre Con A, PNA y plástico. Se tomaron imágenes digitales con una cámara CCD acoplada a un microscopio invertido cada 12 horas utilizando el programa de adquisición de imágenes Metamorph. Para las neuronas sembradas en cápsulas, fue necesario adquirir varias imágenes de la misma neurona ya que las neuritas crecen en diferentes planos. Así mismo, muchas veces hubo que pegar varias ya que la longitud de ciertas neuritas rebasó el campo visual de adquisición.

#### 5.5 Reconstrucción y cuantificación de los patrones de crecimiento neurítico:

Las imágenes de cada célula a diferentes planos focales se empastaron usando el programa Adobe Photoshop. Una vez reconstruido el patrón de crecimiento completo, se cuantificaron tres parámetros: la longitud neurítico total, el número de neuritas primarias y el número de puntos de ramificación con el programa Metamorph. Utilizando una reglilla se obtuvo una equivalencia entre pixles y micras. De esta manera, se obtuvo la longitud de las líneas que se dibujaron sobre las neuritas. Así mismo, se contaron las neuritas primarias y los puntos de ramificación como se muestra en el esquema. Consideramos como neuritas primarias, las que nacían del muñón (a), las que nacen de una primaria se consideraron secundarias (b) y terciarias(c) y se contó como un punto de ramificación (d), el lugar donde se originó. Para obtener la longitud neurítica total se sumó la longitud de todas las neuritas individuales.



## 5.6 Registros electrofisiológicos:

Los registros se hicieron con el fin de ratificar la identidad neuronal y el estado de salud de las neuronas a analizar, comparándolos con los reportados. Estos fueron hechos al término del monitoreo de su patrón de crecimiento, 4 días después del comienzo de su crecimiento neurítico en cultivo. Para esto se hicieron microelectrodos con capilares de vidrio de borosilicato # 30-30-0 (FHC Bowdoinham, USA) en un estirador de micropipetas (Sutter Instrument, Co. Modelo P-97). Las resistencias obtenidas fluctuaron entre 15 y 20 M $\Omega$  al llenarlos con KCl 3M. El microelectrodo se introdujo al sujetador, conectándolo al cabezal que es controlado por el manipulador. El cabezal transluce la señal eléctrica de la célula a un impulso digital que podemos observar en el osciloscopio y/o en la computadora. La resistencia del electrodo se midió y compensó en el medio de la caja de petri. Una vez colocado el electrodo dentro del soma se midió su potencial de reposo para detectar si se encontraban en buen estado y si estaban muy despolarizadas desecharlas. Posteriormente se inyectaron pulsos cuadrados de corriente y se midió el cambio voltaje en el tiempo. Los microelectrodos se conectaron a preamplificadores (Almost Perfect Electronics, Basiles, Suiza) y los registros fueron filtrados por un filtro Bessel con una frecuencia de corte de 400 Hz. Los datos fueron adquiridos utilizando una tarjeta analógica-digital de modelo Digidata 1200 (Axon Instruments, Foster City, California, EU) y el programa Pclamp8. Los datos fueron almacenados en una computadora PC para su análisis.

## 5.7 Análisis de los registros

Se compararon cualitativamente los registros almacenados en computadora del mismo tipo celular con y sin PNA. Para los registros en que se detectaron diferencias la amplitud y las fases de subida y caída fueron mediadas manualmente (desde el umbral) utilizando Clampfit 8. Así mismo se midió la integral de su potencial de acción (igualmente desde el umbral) trasladando sus datos numéricos de Clampfit 8 a Origin.

## 5.8 Estadística

Todos los valores con los que se construyeron las gráficas referentes a los patrones de ramificación neurítica a lo largo del tiempo son promedios  $\pm$  la desviación estandar. Se analizaron mediante una t de student con 2 colas fijando el nivel de confianza en 90 %. Los datos referentes a los potenciales de acción se presentan como promedios por célula sin ninguna prueba estadística debido a una muestra demasiado pequeña.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Patrón de regeneración neurítica de las neuronas AP en cápsulas.

Cuando las neuronas AP se adhieron al interior de las cápsulas, comenzaron a crecer dentro de las 36 primeras horas de cultivo. En este lapso el 100% (n = 8) de las neuronas formó un patrón bipolar de regeneración neurítica característico y estereotipado (Fernández de Miguel 1997). A pesar de que todas las neuronas desarrollaron un patrón bipolar, después de 48 h de crecimiento, el número de neuritas primarias tuvo variaciones. En 3 de las 8 neuronas detectamos solo 2 neuritas primarias, cada una de las cuales se orientó en sentido opuesto. Otras 4 neuronas produjeron 3 neuritas y la otra neurona produjo 5 neuritas. A pesar de las variaciones en el número de neuritas primarias y de sus ramificaciones todas las neuronas mantuvieron un patrón bipolar similar al descrito para las AP el día 9 (Gao y Macagno 1987). Es posible suponer, que algunas de las consideradas neuritas primarias pudieran ser ramificaciones de acuerdo a su sitio de origen. La Figura 11 A muestra el curso temporal del crecimiento de una neurona AP cada 12 h, mientras que en B se observan otras tres a las 48 h de crecimiento.

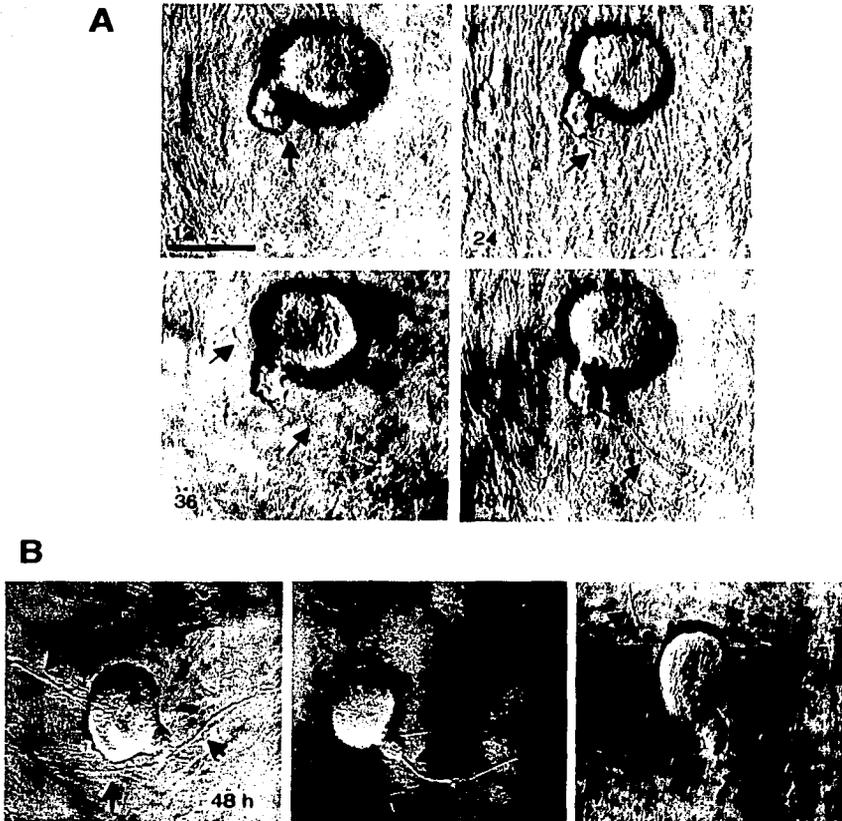
### Perturbación del patrón de regeneración neurítica de neuronas AP en cápsulas.

El patrón de regeneración de las neuronas AP se modificó al agregar la lectina PNA (1µg/ml) al medio de cultivo (De-Miguel; et al 2002). Bajo estas condiciones se observó un aumento considerable del número de neuritas primarias y el número de sus ramificaciones, lo cual ocasionó la pérdida del patrón bipolar. En 6 de 12 neuronas se duplicó el número de neuritas primarias y ninguna disminuyó en comparación con el control. El patrón bipolar se perdió por completo en 4 de 12 neuronas, otras 6 neuronas a pesar de aumentar el número de neuritas primarias y puntos de ramificación, mantuvieron un patrón bipolar. Únicamente 2 neuronas de 12 no presentaron modificaciones. En la Figura 12A se muestra el curso temporal del crecimiento neurítico de una neurona AP adicionando PNA al medio de cultivo. En B se muestra el patrón de regeneración de otras tres neuronas AP en las mismas condiciones, 48 horas de crecimiento.

### Cuantificación del patrón de regeneración neurítica de neuronas AP con y sin PNA.

El adicionar la lectina PNA al medio de cultivo ocasionó en todas las neuronas AP un aumento significativo en los tres parámetros a partir de las primeras 12 h de crecimiento. A las 48 horas, se

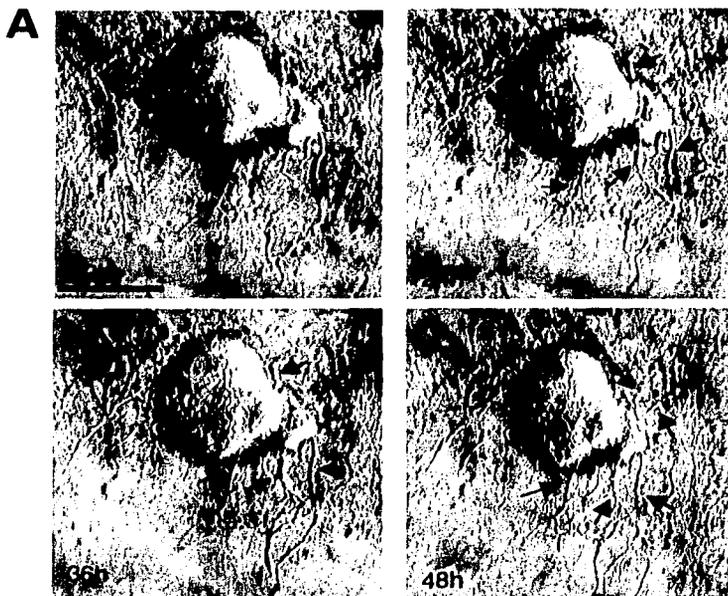
duplicó (100%) tanto su longitud neurítica total de  $290.0 \pm 63.0 \mu\text{m}$  a  $612.0 \pm 120.0 \mu\text{m}$ , como el número de sus neuritas primarias de  $3.0 \pm 0.5$  a  $6.0 \pm 1.0$ . El número de puntos de ramificación se triplicó (300%) de  $3.25 \pm 1.5$  a  $9.6 \pm 2.6$ . La Figura 13 muestra el cambio en éstos tres parámetros a lo largo del tiempo (se midió cada 12 horas), comparando entre las neuronas en presencia y ausencia de PNA en medio de cultivo.



**Figura 11. Patrón de regeneración neurítica de las neuronas AP en cápsulas.**

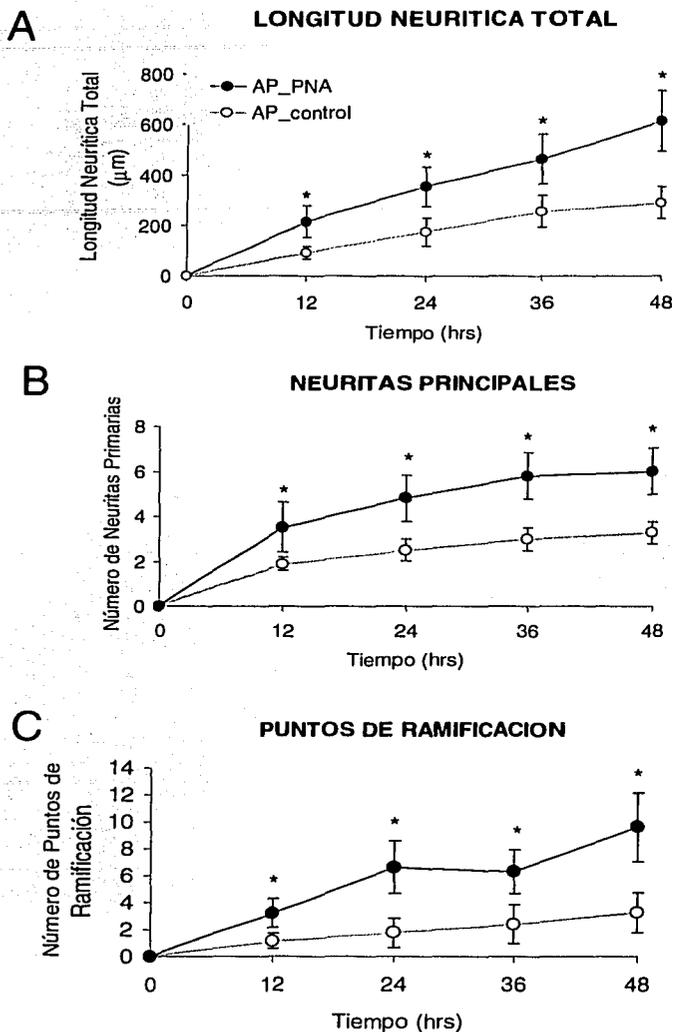
**A.** Curso temporal del crecimiento de una neurona AP sembrada en la cara interna de la Cápsula. **B.** Tres neuronas AP, 48 horas después de comenzar su regeneración neurítica en la cara interna de la cápsula. Las flechas señalan las neuritas primarias y las cabezas de flecha secundarias, escala =  $40 \mu\text{m}$ .

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



**Figura 12. Perturbación del patrón de regeneración neurítica de neuronas AP en cápsula.**

**A.** Curso temporal de una neurona AP sembrada en el interior de la cápsula adicionando el medio de cultivo con la lectina PNA. **B.** Tres neuronas AP a 48 horas de comenzar su regeneración neurítica en el interior de la cápsula, con PNA en el medio de cultivo. Las flechas señalan neuritas primarias, escala = 40  $\mu$ m



**Figura 13. Cuantificación de los patrones de regeneración neurítica de neuronas AP con y sin PNA.**

**A.** Curso temporal de la longitud neurítica total de las neuronas AP con y sin PNA. **B.** Curso temporal del número de neuritas primarias. **C.** Curso temporal del número de puntos de ramificación. AP control (n = 7) y con PNA (n = 12)

\* Diferencia significativa con T-Student 90% confianza.

### **Efecto de PNA en el patrón de regeneración en las neuronas AP.**

Algunas lectinas vegetales promueven el crecimiento neurítico; por ejemplo la Con A, sustrato en el que se conocen bien los patrones de crecimiento de neuronas AP (Chiquet y Acklin 1986). Por lo anterior y debido a que nuestro interés radicaba en el papel desempeñado por glicoproteínas de la matriz extracelular y no en el de la lectina PNA, fue necesario descartar que ésta tuviera algún efecto promotor o inhibidor del crecimiento neurítico mediante su interacción con receptores neuronales. Para esto se comparó el patrón de regeneración de neuronas sembradas sobre PNA y plástico. La Figura 14 muestra neuronas AP creciendo sobre plástico, sobre PNA y sobre Con A. Cualitativamente el patrón de crecimiento en plástico y en PNA como sustratos fue muy similar; neuritas gruesas y poco ramificadas mientras que sobre Con A las neuritas fueron curvas y ramificadas. Este resultado mostró que la lectina PNA en si misma, no tiene efectos directos sobre el patrón de regeneración neurítica de éste tipo neuronal (De-Miguel *et al* 2002).

### **6.2 Patrón de regeneración neurítica de las neuronas de Retzius en cápsulas.**

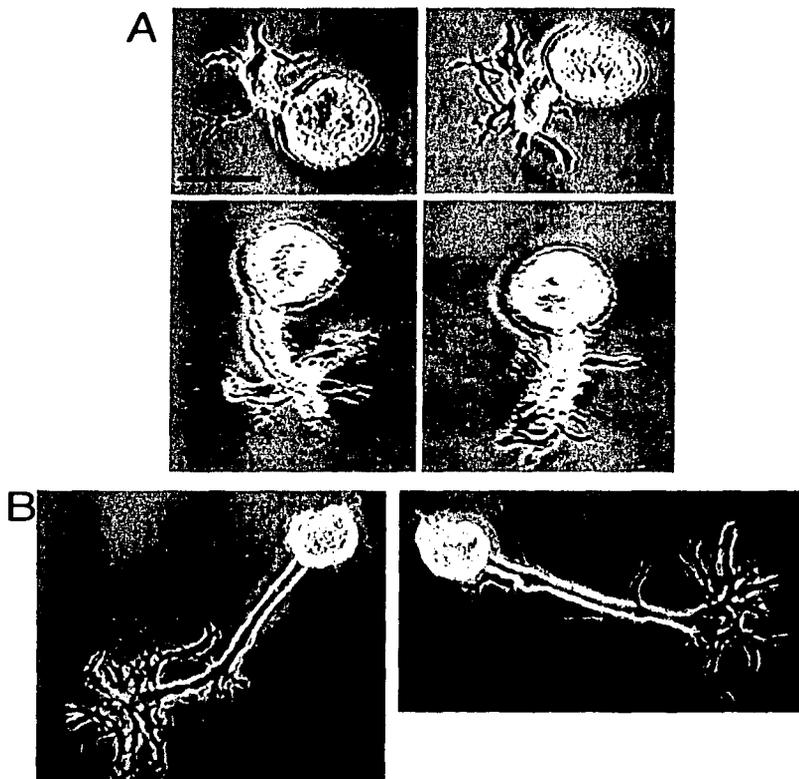
Cuando las neuronas de Retzius se adhieren al interior de las cápsulas, regeneran múltiples neuritas robustas y ramificadas con grandes conos de crecimiento en todas direcciones (Fernández De\_Miguel 1997). En el 100 % (n = 7) de las neuronas, las neuritas fueron robustas y los conos de crecimiento grandes. Sin embargo 3 de 7 neuronas crecieron mucho menos que las demás. La Figura 15 A muestra el curso temporal del crecimiento neurítico de una neurona de Retzius. En el panel B se pueden observar los patrones de regeneración neurítica a las 48 horas de crecimiento de otras dos neuronas de Retzius.

### **Perturbación del patrón de regeneración neurítica de neuronas de Retzius en cápsula.**

Al agregar PNA al medio de cultivo, el patrón de regeneración neurítica no cambió cualitativamente. Las neuritas crecieron robustas, con conos de crecimiento grandes hacia todas direcciones. Sin embargo en este grupo así como en el control, algunas neuronas presentaron un crecimiento menor ( 2 de 7 neuronas) que el de las demás. En general se observó un área menor pero más densamente ocupada por sus neuritas debido a que la mayoría de ellas fueron de menor longitud y se encontraban más juntas entre sí que las de las RZ control. La Figura 16 A muestra el curso temporal del crecimiento neurítico de una neurona de Retzius en el interior de la cápsula con PNA, mientras que en B tenemos dos ejemplos más a las 48 de crecimiento.

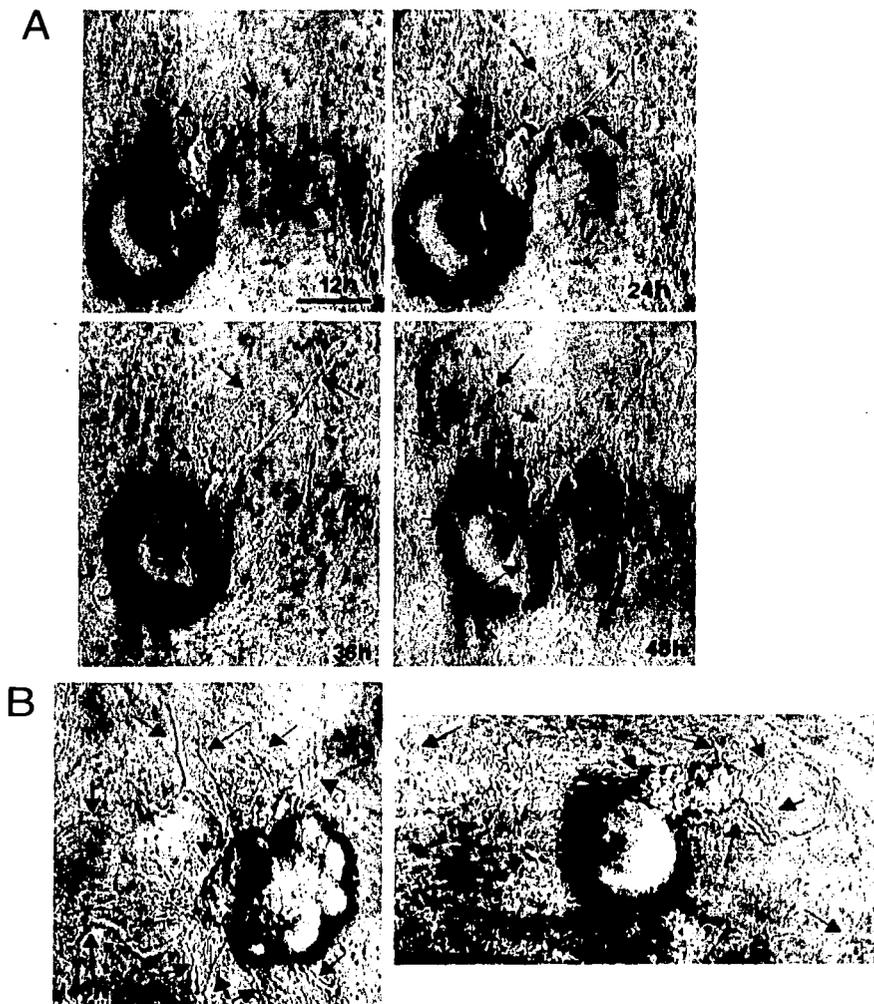
### Cuantificación de los patrones de regeneración neurítica de neuronas Rz con y sin PNA.

El adicionar PNA al medio de cultivo no causó un aumento significativo ni en la longitud neurítica total de  $1523.16 \pm 192.32 \mu\text{m}$  a  $1758.0 \pm 453.32 \mu\text{m}$  ni el número de puntos de



**Figura 14. Efecto de la lectina PNA sobre el patrón de regeneración neurítica de las neuronas AP.**

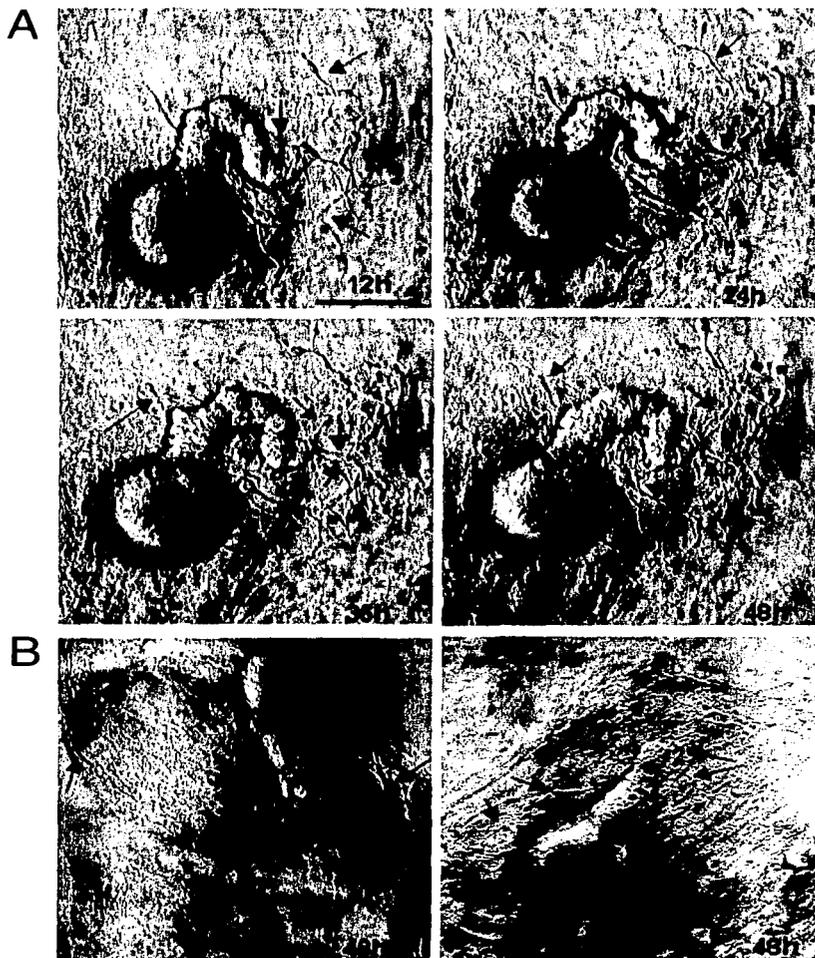
**A.** Patrón de regeneración neurítica sobre plástico de neuronas AP. **B.** sobre PNA y **C.** sobre Con A. Todas las neuronas 48 horas después de comenzar su crecimiento, escala =  $40 \mu\text{m}$ .



**Figura 15. Patrón de regeneración neurítica de las neuronas de Retzius en cápsulas.**

**A.** Curso temporal de una neurona de Rz sembrada en la cara interna de la cápsula. **B.** Dos neuronas de Rz a 48 horas de comenzar su regeneración neurítica. Las flechas señalan neuritas primarias, escala = 50  $\mu$ m

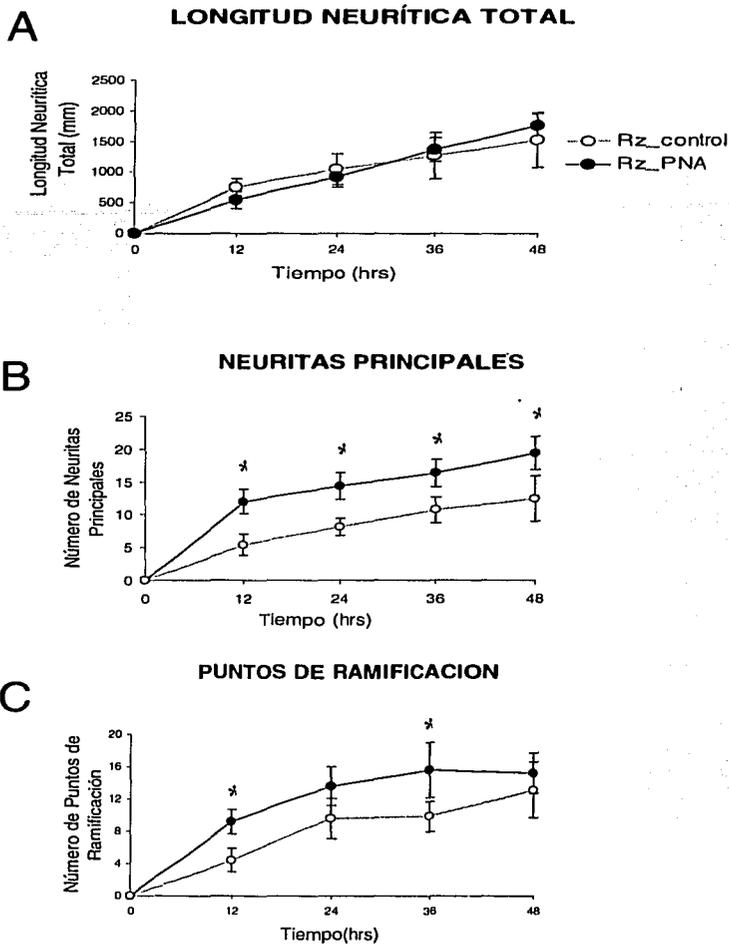
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 6. Perturbación del patrón de regeneración neurítica de neuronas de Retzius en cápsulas.**

**A.** Curso temporal de una neurona de Rz en la cara interna de la cápsula. **B.** Dos neuronas de Rz a 48 horas de comenzar su crecimiento neurítico, escala = 40µm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 17. Cuantificación de los patrones de regeneración neurítica de neuronas de Retzius con y sin PNA.**

**A.** Curso temporal de la longitud neurítica total de neuronas de Rz con y sin PNA en cápsula. **B.** Curso temporal del número de neuritas primarias **C.** Curso temporal del número de puntos de ramificación. Rz control (n = 7) con PNA (n = 6) \* Diferencia significativa con T-Student 90% confianza.

ramificación de  $13.14 \pm 3.4$  a  $14.83 \pm 2.5$ . La Figura 17 muestra la medición de estos parámetros cada 12 horas, comparando las neuronas sembradas en cápsulas con y sin PNA en medio de cultivo. Únicamente hay un aumento significativo de 56% en el número de neuritas primarias en presencia PNA (C) de  $12.4 \pm 3.49$  a  $19.3 \pm 2.5$  en cápsula.

### **Efecto de la lectina PNA en las neuronas de Retzius.**

Utilizando la lectina PNA como sustrato, se descartó al igual que con las neuronas AP, la posibilidad de que ésta pudiera tener algún efecto por sí misma en el crecimiento neurítico de las neuronas de Rz. Los patrones de regeneración neurítica son muy similares en plástico y en PNA como se muestra en la Figura 18 A y B. Sobre Con A se observa claramente un aumento en el crecimiento neurítico debido a su efecto promotor, así como un patrón muy distinto al del animal (lamelas más que neuritas) concordando con lo reportado anteriormente (Chiquet y Acklin 1986, Grumbacher-Reinert 1989, Fernández de Miguel et al., 1997).

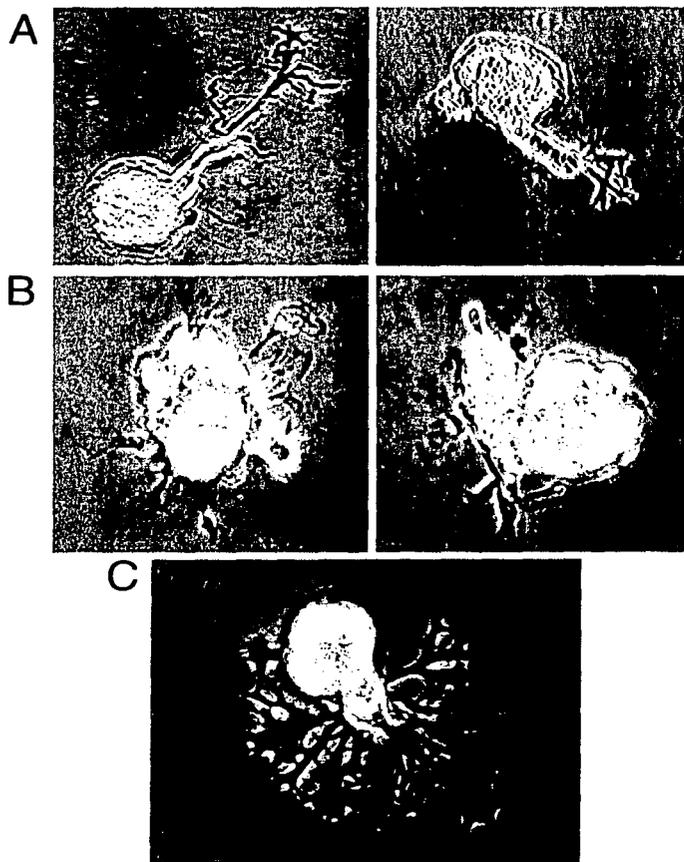
### **6.3 Patrón de regeneración neurítica de las motoneuronas AE en cápsulas.**

Cuando las motoneuronas AE se adhieren al interior de las cápsulas, regeneran un patrón neurítico bipolar, formado por grupos de neuritas ramificadas en lados opuestos. La Figura 19 A muestra el curso temporal del crecimiento neurítico de una motoneurona AE, mientras que en B se pueden observar los patrones de regeneración a las 48 horas de crecimiento de otras tres motoneuronas AE. En nuestros experimentos el crecimiento neurítico de las motoneuronas AE fue mayor que el reportado (Fernández de Miguel y Vargas 1997), sin embargo es distinto al generado tanto por las neuronas AP como por las Rz y podríamos decir que limitado en comparación con el que presentaron sobre Con A o en presencia de PNA en el medio de cultivo.

### **Perturbación del patrón de regeneración neurítica de las motoneuronas AE.**

El patrón de regeneración de las motoneuronas AE se modificó considerablemente en presencia PNA en el medio de cultivo. Aumentó tanto el área que ocupada por las neuritas como el número de ramificaciones en comparación con la ocupada en ausencia de PNA. Lo cual ocasionó una pérdida del patrón bipolar debido a un mayor número de neuritas primarias de mayor longitud individual. De 6 neuronas 4 perdieron el patrón bipolar por completo, 2 lo conservaron, pero se incrementó considerablemente la longitud neurítica total. Las 2 neuronas restantes no presentaron modificación

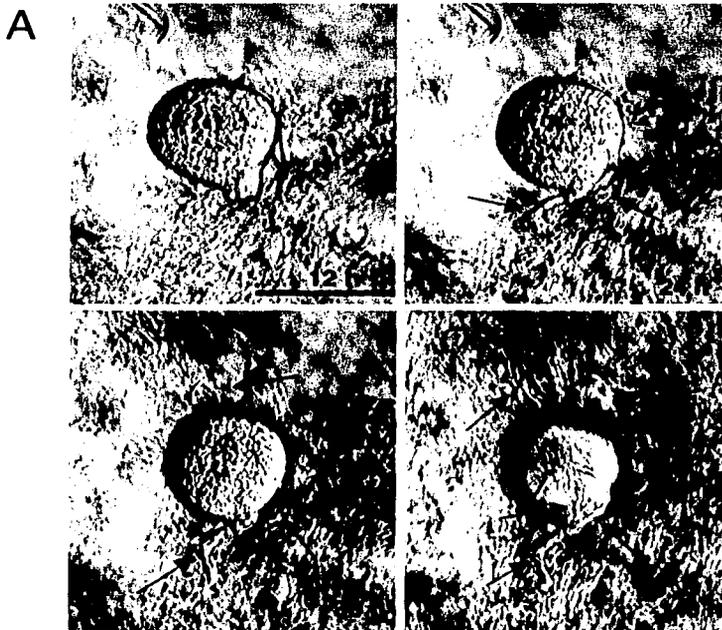
alguna. En la Figura 20 A se muestra el curso temporal del crecimiento neurítico de una motoneurona AE adicionando PNA al medio de cultivo, mientras en B tenemos otros dos ejemplos a las 48 horas de crecimiento.



**Figura 18. Efecto de la lectina PNA sobre el patrón de crecimiento neurítico de las neuronas de Retzius.**

A. Patrón de regeneración neurítica sobre plástico de neuronas de Rz. B. sobre PNA y C. sobre Con A. Todas las imágenes están en contraste de fases a 48 horas de comenzar su crecimiento, escala = 50  $\mu$ m.

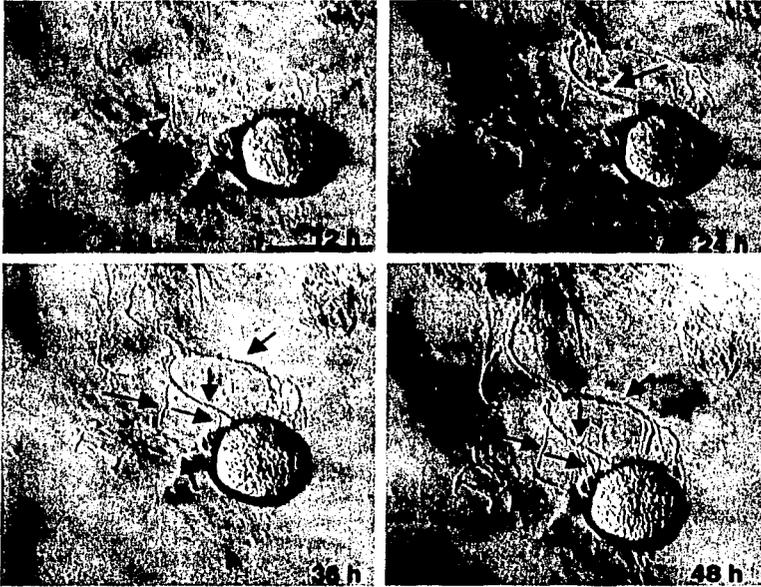
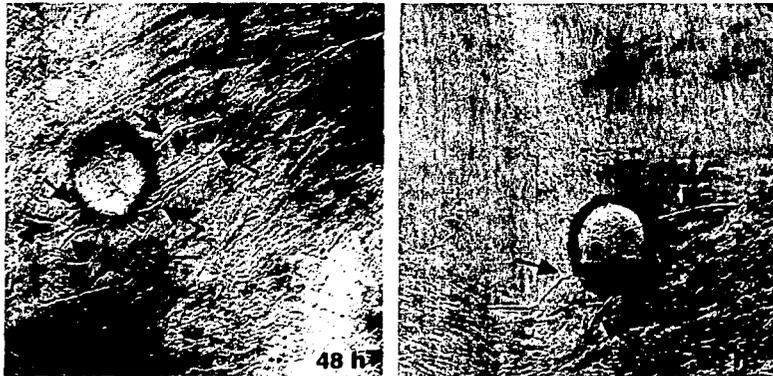
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 19. Patrón de regeneración neurítica de las motoneuronas AE en cápsulas.**

**A.** Curso temporal de la regeneración neurítica de una motoneurona AE. **B.** Dos motoneuronas AE a 48 horas de comenzar su crecimiento. Las flechas señalan neuritas primarias, escala = 50  $\mu$ m.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**A****B**

**Figura 20. Perturbación del patrón de regeneración neurítica de motoneuronas AE en cápsulas.**

**A.** Curso temporal de la regeneración neurítica de una motoneurona AE. **B.** Dos motoneuronas AE a 48 horas de comenzar su regeneración neurítica. Las flechas señalan neuritas primarias, escala = 50  $\mu$ m.

### **Cuantificación del patrón de regeneración neurítica de motoneuronas AE con y sin PNA.**

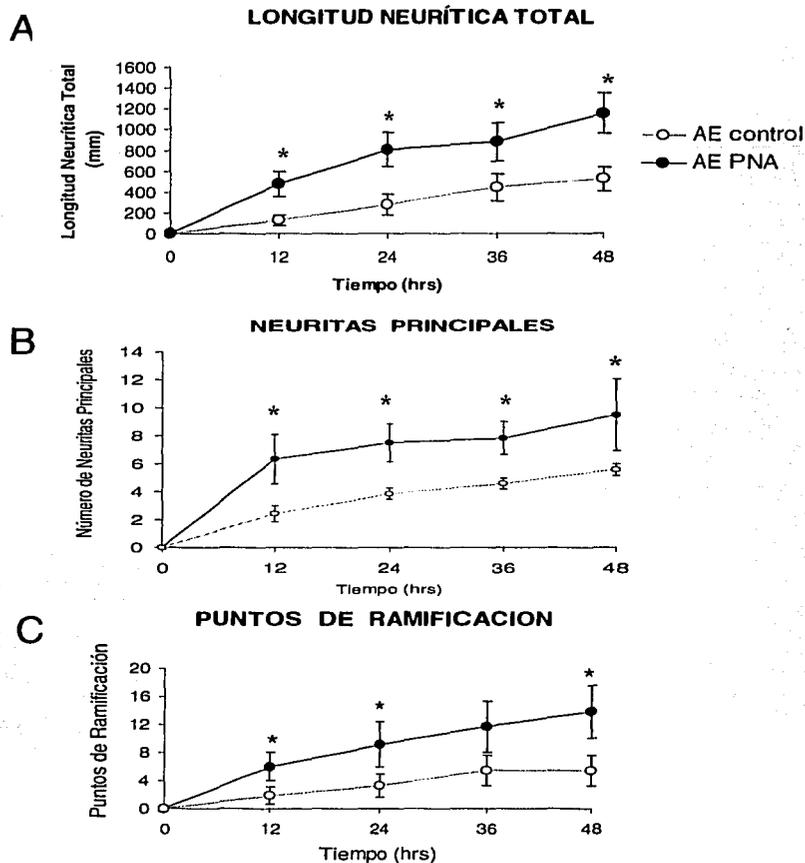
El adicionar la lectina PNA al medio de cultivo ocasionó un aumento significativo en los tres parámetros medidos para analizar los cambios inducidos por la lectina en los patrones de crecimiento. La longitud neurítica total se duplicó (100%) de  $524.0 \pm 46.0 \mu\text{m}$  a  $1158.0 \pm 198.0 \mu\text{m}$ , el número de neuritas primarias se incrementó en un 70% de  $5.6 \pm 0.4$  a  $9.5 \pm 2.6$  y el número puntos de ramificación un 155% de  $5.4 \pm 2.0$  a  $13.8 \pm 4.0$ . La Figura 21 muestra el incremento significativo en éstos 3 parámetros cada 12 horas con y sin PNA.

### **Efecto de la lectina PNA sobre las motoneuronas AE.**

Al igual que en las demás neuronas probadas, el patrón de regeneración neurítica de las AE en plástico y en PNA como sustrato es indistinguible, permitiendo descartar su posible efecto sobre el patrón de crecimiento neurítico. En la Figura 22 A y B podemos observar que no hay diferencia en el patrón presentado sobre plástico y PNA. Mientras que en C sobre Con A el crecimiento es mayor, debido al efecto promotor de esta lectina.

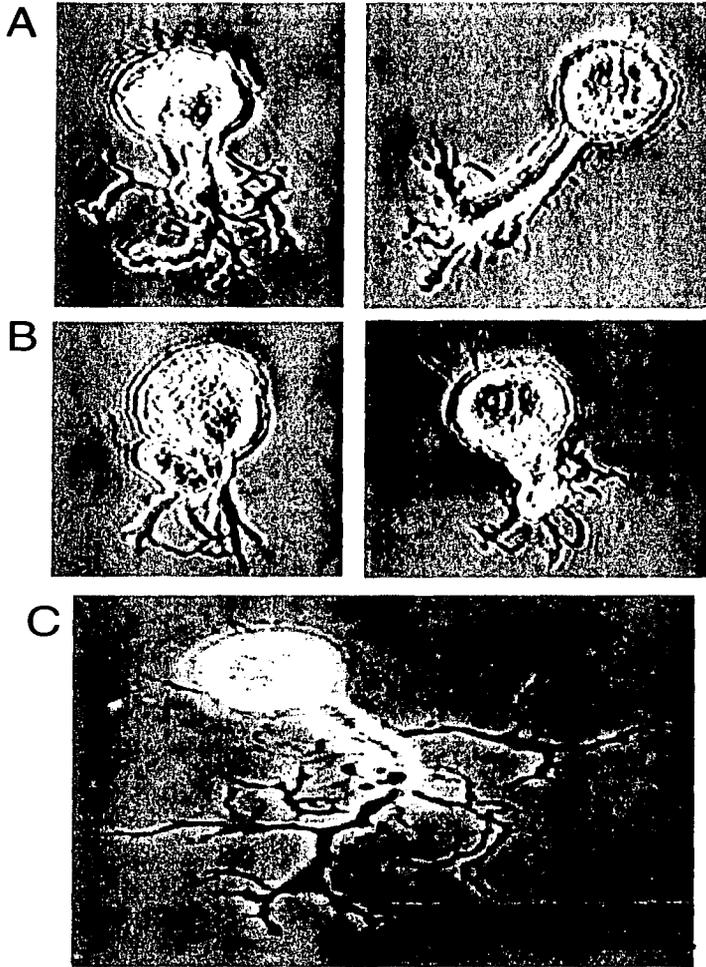
### **6.4 Comparación de los registros electrofisiológicos**

Cada tipo neuronal estudiado presentó un patrón de disparo característico, del cual hicimos uso para la identificación neuronal. La frecuencia de disparo, forma y amplitud del potencial de acción difiere entre las neuronas AP, AE y las de Retzius. Únicamente las neuronas de Retzius dispararon espontáneamente. En el panel A de la Figura 24 se aprecian las diferencias cualitativas en la forma del potencial de acción entre una neurona AP con y sin PNA. Mientras la amplitud aumenta la duración disminuye en presencia de PNA. En B se muestra el patrón de disparo de las motoneuronas AE que consiste en potenciales de acción muy pequeños (lejanos) de ahí que se requiera de pulsos de mucha corriente y larga duración (200ms) para observar respuesta. En C se muestra el potencial de acción de las neuronas de Rz; que al igual que las AE no presenta modificaciones cualitativas en presencia de PNA. El análisis de la duración del potencial de acción de las neuronas de Rz apunta hacia un incremento de 1ms (con y sin PNA  $n=8$ ) en presencia de PNA; mientras que para las motoneuronas AE no se cuentan con suficientes registros con el mismo protocolo de estimulación (con  $n=2$  pareciera que disminuye la duración en presencia de PNA al igual que en las AP). Debido a que los más significativos ocurrieron únicamente en las neuronas AP decidimos hacer un análisis más profundo de las variaciones para explicar que podía estar sucediendo al bloquear las glicoproteínas que unen PNA.



**Figura 21. Cuantificación de los patrones de regeneración neurítica de motoneuronas AE con y sin PNA de cultivo.**

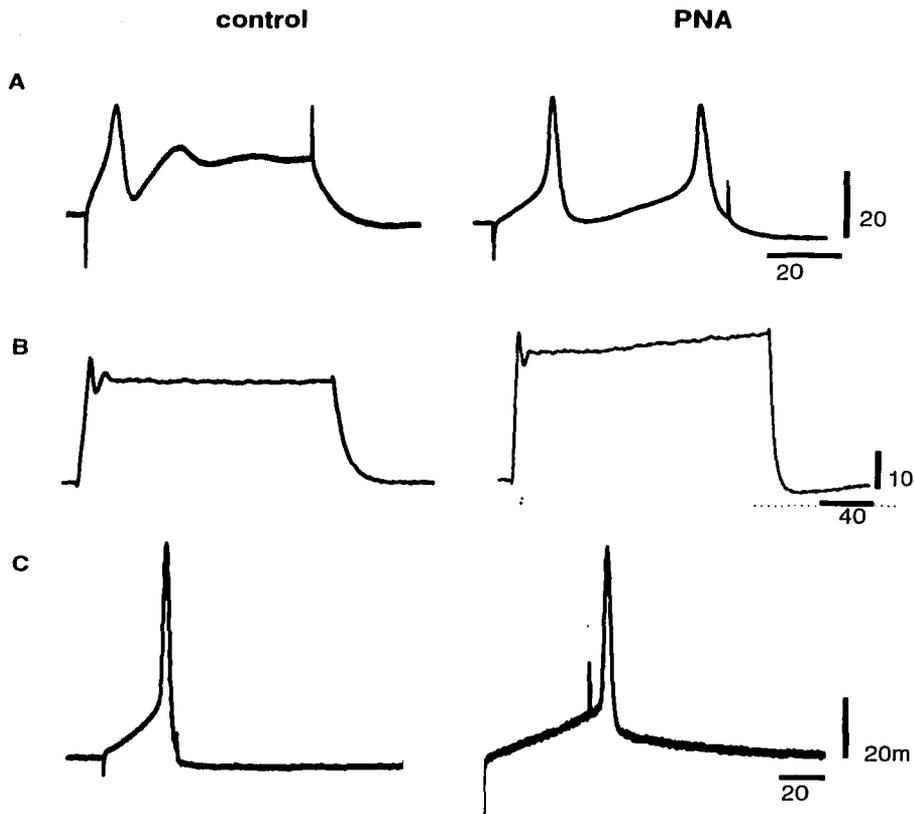
**A.** Curso temporal de la longitud neurítica total de motoneuronas AE. **B.** Curso temporal del número de neuritas primarias. **C.** Curso temporal del número de puntos de ramificación, AE control (n = 6) PNA (n = 6) \*Diferencia significativa T-Student 90% confianza.



**Figura 22. Efecto de PNA sobre el patrón de crecimiento neurítico de las motoneuronas AE.**

**A.** Patrón de regeneración neurítica de motoneuronas AE sobre plástico, **B.** sobre PNA **C.** sobre Con A., escala = 50  $\mu$ m.

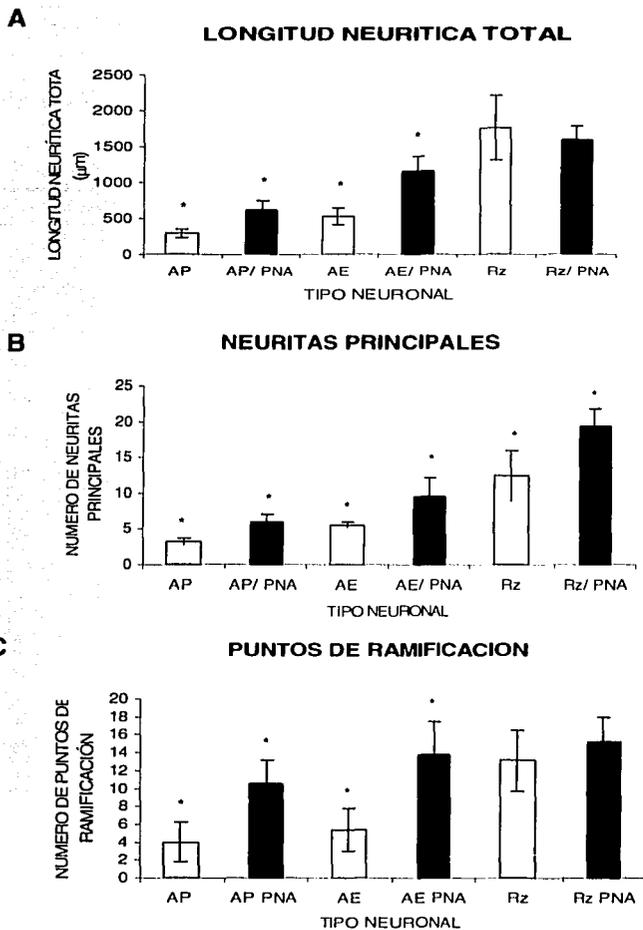
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 24. Comparación de los registros electrofisiológicos de neuronas en cultivo**

**A.** Comparación del potencial de acción de una neurona AP en cápsula con y sin PNA en el medio de cultivo. **B.** Potencial de acción propagado de una motoneurona AE control y con PNA. **C.** Potencial de acción de una neurona de Rz control y con PNA. Todos los registros fueron hechos a 48 horas de crecimiento, las neuronas AP -35mV potencial de reposo, AE -45mV y las Rz -60mV.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 23. Comparación del patrón de regeneración neurítica**

**A.** En las neuronas AP y AE la longitud neurítica total se duplicó (100% aprox.), mientras que las Rz no presentaron diferencias significativas en éste parámetro. **B.** Los tres tipos neuronales presentaron un incremento significativo 100, 70 y 56 % respectivamente en el número de neuritas principales en presencia de PNA. **C.** El número de puntos de ramificación se triplicó en neuronas AP, se incrementó 155 % en neuronas AE; mientras que las Rz no presentaron un incremento significativo. Cuantificación a 48 horas de comenzar su crecimiento, \* diferencia significativa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.5 Análisis del Potencial de Acción en neuronas AP

### Comparación de la Integral del Potencial de Acción con y sin PNA

Una vez detectada la variación entre los registros controles y en condiciones de perturbación de las neuronas AP, se cuantificó la integral de su potencial de acción (PA) ya que éste refleja indirectamente la carga que ocasiona el cambio de voltaje.

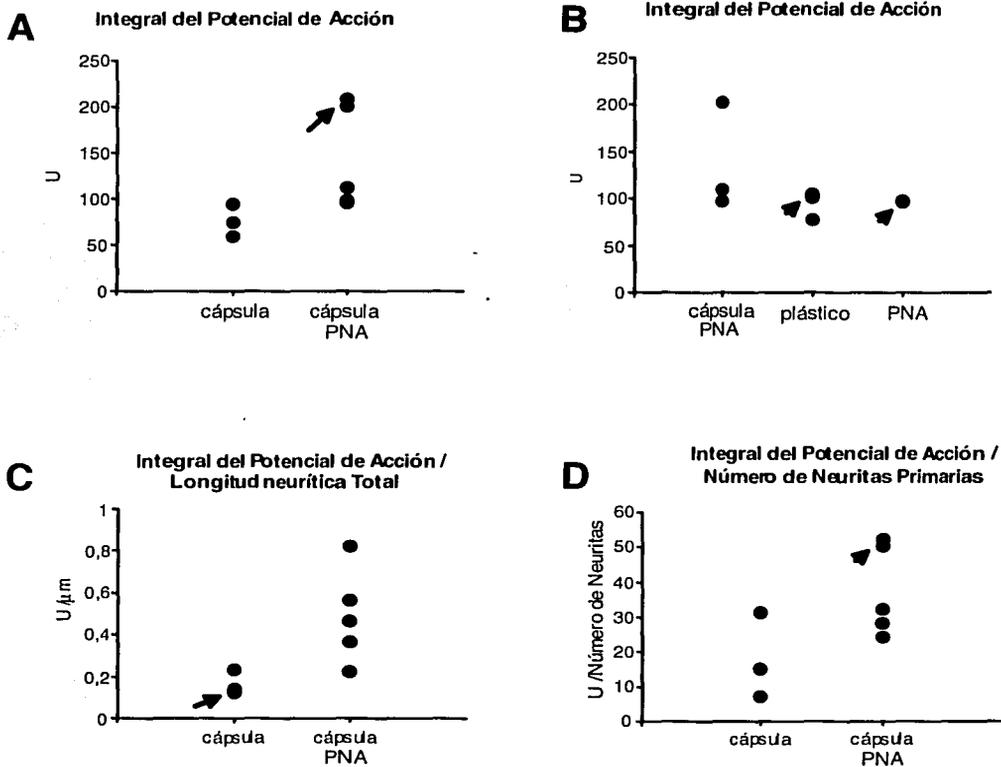
Como podemos observar en la Figura 25 A la integral del PA (-30/-35mV en reposo) se duplicó en presencia de PNA. Así mismo se hizo la comparación en plástico y PNA como sustratos contra potenciales evocados en neuronas sembradas en cápsula con PNA (-40/-45mV en reposo). Los valores están reportados en unidades arbitrarias (U). La diferencia entre registros de AP en cápsula con PNA a diferentes voltajes no es significativa de 142 a 132 U. Mientras que PNA y plástico son casi idénticos de 96 a 98U (Figura 25 A y B). Por el contrario el aumento de la integral del PA en neuronas sembradas en cápsula PNA si es significativo(A).

Para detectar si éste incremento se debía al aumento en el crecimiento neurítico se correlacionó con 2 parámetros de su patrón de regeneración neurítica: la longitud neurítica total y el número de neuritas primarias. En C se muestra que la relación de la integral del PA/longitud neurítica total se triplica 200% de 0.16 a 0.48 U en presencia de PNA y en D que la integral PA/ número de neuritas se duplica (100%) de 18 a 37 en presencia de PNA.

### Amplitud del Potencial de Acción

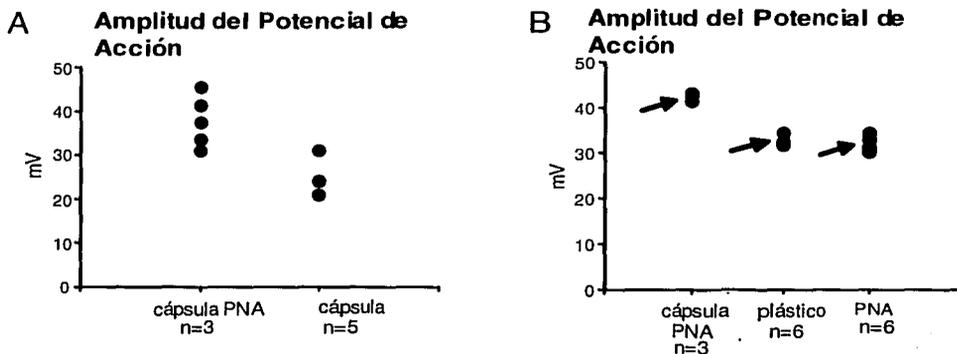
La amplitud refleja la diferencia de potencial máxima alcanzada. La Figura 26 A muestra que la amplitud promedio del potencial de acción se incrementó en un 50% (de -25 a -38mV) en presencia de PNA. En B tenemos la comparación de las amplitudes del potencial de acción de neuronas AP creciendo en el interior de la cápsula con PNA otras sembradas sobre PNA y plástico como sustratos. No hay diferencia entre las amplitudes de los potenciales de acción de neuronas sembradas sobre PNA y plástico (32mV en ambas) sin embargo, son menores (no significativamente) con respecto a las sembradas sobre cápsula con PNA al mismo potencial de reposo (42.6mV). Las neuronas AP producen potenciales de acción de mayor amplitud a potenciales más hiperpolarizados, como podemos observar al comparar la barra negra en A y B.

Un incremento en 50% en la amplitud no explica que la integral del potencial de acción se triplique (se esperaría un incremento del 50%), para lograrlo tenía que estar implicada la duración del potencial. El análisis de ésta se hizo separando la fase de subida de la caída del potencial de acción, lo cual permite obtener información sobre la identidad iónica.



**Figura 25. Integral del potencial de Acción y su relación con el crecimiento neurítico**

**A.** La integral se incrementa un 60% (de  $\bar{x} = 77.75$  a  $\bar{x} = 130.5$ ) en las neuronas AP creciendo con PNA ( $V_m = -30/-35$  mV). **B.** Sobre plástico, PNA y cápsula con PNA no parece haber diferencia significativa ( $V_m = -40/-45$  mV). **C.** La relación de la integral con la LNT se triplicó (de  $\bar{x} = 0.16$  a  $\bar{x} = 0.48$ ) en presencia de PNA. **D.** mientras que la relación con el número de neuritas primarias se duplicó, de  $\bar{x} = 18$  a  $\bar{x} = 37$ , U = unidades arbitrarias, C y D  $V_m = -30/-35$  mV.



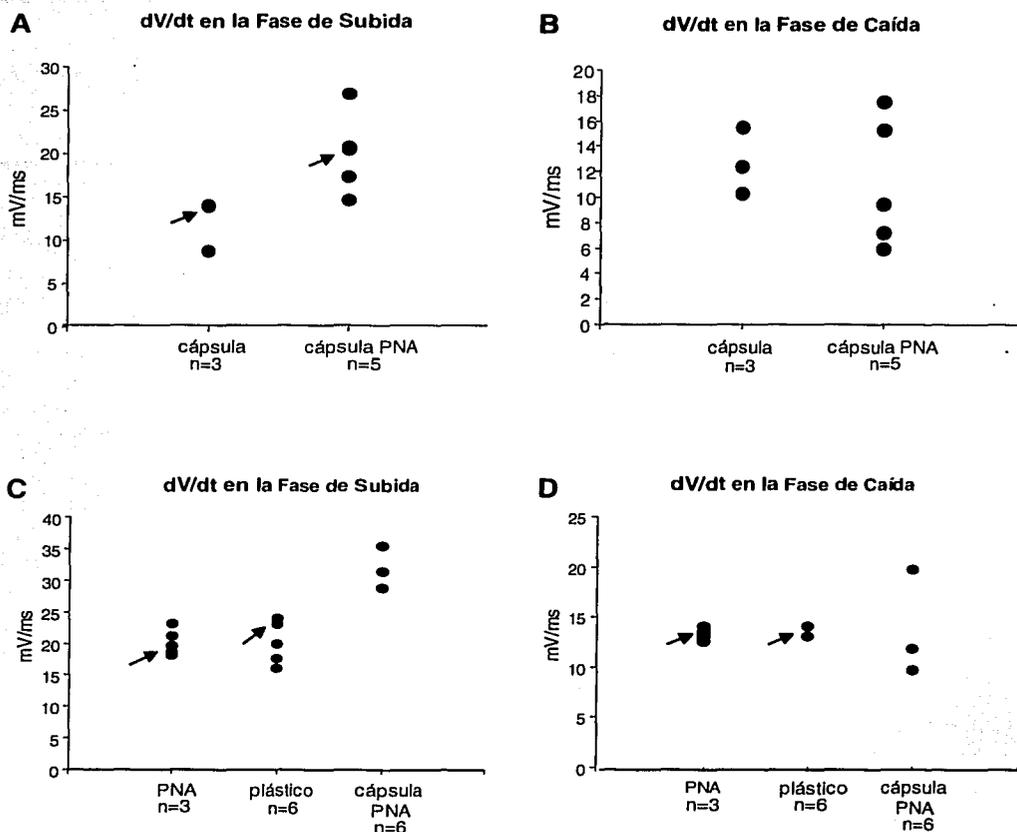
**Figura 26. Amplitud del Potencial de Acción de neuronas AP**

- A) La amplitud del potencial de acción se incrementa un 50% (de  $\bar{x} = -25$  a  $\bar{x} = -38\text{mV}$ ) en neuronas AP sembradas en el interior de la cápsula. ( $V_m = -30 / -35\text{mV}$ )
- B) La amplitud del potencial de acción de neuronas AP sembradas en el interior de la cápsula con PNA ( $\bar{x} = -42.6\text{mV}$ ) es un poco mayor a las sembradas sobre PNA ( $\bar{x} = -32.24\text{mV}$ ) y plástico ( $\bar{x} = -32.9\text{mV}$ ), sin embargo esta diferencia no parece ser significativa. ( $V_m = -40 / -45\text{mV}$ )

### Cambios en los componentes iónicos del potencial de acción.

Al analizar por separado la fases de subida y caída del potencial de acción en neuronas AP creciendo en cápsulas ganglionares, encontramos que la fase de subida se incrementa considerablemente (80%), de 11.5 a 21mV/ms en la fase de subida (Figura 27A) mientras que la de caída no presenta cambios significativos de 8 a 11mV/ms como se muestra en la (B). El mismo análisis se realizó para neuronas AP creciendo sobre PNA y plástico C y D respectivamente. En éstas condiciones no hubo diferencias significativas entre ambos grupos en la fase de subida (20mV/s) ni en la fase de caída de su potencial de acción (13mV/ms). En C podemos observar claramente que la fase de subida de las neuronas AP creciendo sobre PNA, plástico y en cápsula con PNA no presentaron diferencias entre sí.

Si comparamos la fase de subida en A (21mV/ms) con la de C (31mV/ms) en presencia de PNA, es más rápida a potenciales más hiperpolarizados, coincidiendo con una mayor amplitud.



**Figura 27. Cambios en los componentes iónicos del potencial de acción.**

Al analizar el cambio de voltaje en el tiempo durante las fases de subida y caída de los potenciales de acción de las neuronas AP con y sin PNA, observamos que la diferencia radica en la primera. **A.** La  $dV/dt$  de la fase de subida del potencial de acción casi se triplica en las neuronas AP en cápsula con PNA (de  $\bar{x} = 12$  a  $x = 32$  mV/ms); mientras que **B.** el aumento de la fase de caída no es significativo, ( $A$  y  $B$   $V_m = -30/-35$  mV). **C.** La  $dV/dt$  de la fase de subida de neuronas sembradas sobre cápsulas con PNA es mayor a la de las sembradas sobre plástico, que es prácticamente indistinguible de las sembradas sobre PNA. **D.** La fase de caída no parece presentar diferencias significativas entre neuronas AP sembradas en cápsula con PNA, sobre PNA y plástico, ( $C$  y  $D$   $V_m = -40/-45$  mV).

## 7. DISCUSIÓN

Nuestros resultados mostraron que el grupo de glicoproteínas que une PNA del interior de la cápsula ganglionar inhibe el crecimiento neurítico. Éste efecto fue dependiente del tipo neuronal. El adicionar PNA al medio de cultivo indujo un incremento en el crecimiento neurítico en las neuronas AP y AE, acompañado por la pérdida del patrón bipolar. En contraste el patrón de regeneración de las neuronas de Retzius se mantuvo parcialmente inalterado. De manera colateral encontramos que las glicoproteínas que unen PNA indujeron cambios en la actividad eléctrica en las neuronas AP.

### Identidad Molecular

Adicionando PNA al medio de cultivo, bloqueamos la interacción de un grupo glicoproteínas de matriz extracelular, con sus respectivos receptores neuríticos. De ésta manera fue posible deducir el efecto que desempeñan estas glicoproteínas. Las 4 bandas que unen PNA podrían constituir subunidades de una o varias glicoproteínas de matriz extracelular. De acuerdo con sus pesos moleculares, podríamos pensar que se trata de tenascina o fibronectina (Kruse et al 1984). La fibronectina une PNA y su patrón de expresión (espacio temporal) es variable durante el desarrollo y la regeneración, lo cual sugiere que interviene activamente en la guía áxonal (Orden 1979, Trejdosiewicz 1985). Con respecto a la tenascina, la cual podría considerarse una buena candidata debido a que presenta patrones de expresión altamente restringidos y dinámicos en el desarrollo del sistema nervioso, induce inhibición en varios sistemas biológicos (Pesheva y Probstmeier 2000, Jones y Jones 2000) y está comprobado que forma parte de la matriz extracelular del sistema nervioso de la sanguijuela (Masuda-Nakagawa y Nicholls 1991). A pesar de que los pesos moleculares de las subunidades de tenascina corresponden con los de las bandas reconocidas por PNA, está reportado que induce crecimiento neurítico en neuronas AP y Rz en ésta especie de sanguijuela (Masuda-Nakagawa y Wiedemann 1992). Por lo anterior ya que el patrón de reconocimiento de PNA con DTT (ditioetiol) no se modifica, pensamos que las bandas podrían representar 4 glicoproteínas distintas, lo cual concuerda con los resultados de este trabajo. Sin embargo para valorar la relevancia de la interacción de la matriz extracelular con el tipo neuronal en la formación de un patrón de crecimiento determinado, nos parece más importante comprender la función y posible mecanismo, que la identidad molecular de éstas glicoproteínas.

## **Efecto de Glicoproteínas que unen PNA en el Patrón de Regeneración**

El efecto inhibitor del crecimiento neurítico de las glicoproteínas que unen PNA fue valorado mediante la comparación de tres parámetros cuantificables del patrón de crecimiento. De acuerdo con la respuesta obtenida para 3 tipos neuronales podemos generar un esquema de sensibilidad a la inhibición mediado por éstas glicoproteínas, donde la neurona AP es la más sensible, la neurona AE presenta sensibilidad intermedia y la neurona de Retzius mínima. El parámetro más afectado por el bloqueo con PNA es el número de neuritas primarias, que presentó un incremento significativo en los tres tipos neuronales estudiados. Sin embargo los otros dos parámetros tuvieron un fuerte efecto sobre las neuronas AP y AE; apoyando la hipótesis de que el grupo de moléculas que unen PNA está formado por 4 glicoproteínas distintas con receptores y efectos particulares. Si éste fuera el caso podríamos pensar que cada banda tiene un efecto específico y el que se reflejara o no en determinado patrón de crecimiento dependería de la presencia o ausencia del receptor en la neurona; así como de la combinación de receptores a moléculas promotoras de crecimiento (capaces de enmascarar o filtrar la inhibición) o a distintas moléculas inhibitoras.

## **Efecto de Glicoproteínas que unen PNA en el Potencial de Acción**

Colateralmente analizamos la influencia de las glicoproteínas que unen PNA en el patrón de disparo de las neuronas AP. El incremento en la integral del potencial de acción con PNA indica que en éstas condiciones, la duración de la diferencia de potencial es mayor; reflejando indirectamente un aumento en la carga (iones) que se mueve a través de la membrana. El que la relación de la integral del potencial de acción con el crecimiento neurítico (longitud neurítica total y neuritas principales) no fuera lineal sino que se triplicara y duplicara respectivamente en presencia de PNA, apunta a que el incremento se debe a un aumento neto en la cantidad de canales iónicos por unidad de área. De estas dos mediciones la que más se aproxima al incremento neto en membrana es la longitud neurítica total ya que en el caso del número de neuritas principales, se desprecian las ramificaciones secundarias, que en presencia de PNA aumentaron significativamente.

El incremento en la amplitud del potencial de acción en presencia de PNA indica que las características eléctricas de la membrana se modifican. El análisis de la  $\delta V/\delta t$  de las fases de subida y caída del potencial de acción brinda información sobre la posible identidad iónica responsable de éstas modificaciones. En éste caso en particular el incremento en  $\delta V/\delta t$  de la fase de subida indica que el

subgrupo de glicoproteínas que unen PNA modifica la síntesis o incorporación de canales de  $\text{Na}^+$  a la membrana neurítica. Sin embargo, para que la  $\delta V/\delta t$  de la fase de caída se mantenga constante se requiere un incremento en los canales de  $\text{K}^+$ , ya que si esto no ocurriera, la fase de repolarización sería más lenta.

### **Esquema de la interacción de glicoproteínas que unen PNA con el tipo neuronal**

Pensamos que las glicoproteínas hipotéticas compartirían el sitio inicial de reconocimiento con su receptor (galactosa terminal unida a  $\beta(1-3)$ -N-acetilgalactosamina) que es también, el sitio de unión con PNA; de ahí que diversas proteínas que unen PNA en otros sistemas presenten el mismo efecto. Sin embargo, pensamos que la parte protéica se uniría a otra parte del receptor permitiendo efectos distintos por parte de cada glicoproteína, muy probablemente mediante receptores distintos.

Nombremos a cada una de las glicoproteínas hipotéticas: *A*, *B*, *C*, *D* y pensemos en los posibles efectos que éstas pudieran inducir dependiendo de los receptores neuronales presentes. De esta manera, podríamos proponer un esquema basado en la comparación de los patrones de regeneración neurítica (48 horas después de iniciar su crecimiento) de los tres tipos neuronales estudiados (Figura 23); así como en el análisis de los cambios de su actividad eléctrica.

Si *A* inhibiera la formación de neuritas primarias, *B* el crecimiento neurítico, *C* la formación de ramificaciones y *D* la incorporación de canales iónicos a la membrana, en éste caso de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ; las neuronas AP tendrían los 4 tipos de receptores, las motoneuronas AE tendrían los tres primeros, sin asegurar que carecen de *D*. Mientras que las neuronas de Rz solo presentarían receptores para la glicoproteína tipo *A*.

### **Aspectos Generales**

La interacción de las neuronas con las moléculas de matriz extracelular mediante los receptores concentrados en sus conos de crecimiento es uno de los primeros pasos en la formación del sistema nervioso y es crucial para un buen funcionamiento del sistema nervioso de todas las especies animales. Mediante ésta interacción se generan patrones de crecimiento y ramificación determinantes para que las neuronas logren encontrar y conectarse con sus blancos.

El papel desempeñado por proteínas glicosiladas con  $\beta(1-3)$ -N-acetilgalactosamina, es decir glicoproteínas que unen PNA podría ser generalizable al desarrollo del sistema nervioso de otras

especies. De hecho se encuentra ampliamente documentada su participación en el desarrollo (Davis et al., 1990; Vermeren et al., 2000). Se sabe que las moléculas que intervienen en la guía axonal, incluyendo las de matriz extracelular están altamente conservadas filogenéticamente.

De nuestro estudio se desprende que las glicoproteínas que unen PNA participan activamente en la estabilización de los patrones de ramificación neurítica en animales adultos. Nuestros experimentos no fueron realizados en embriones y sabemos la síntesis de éstas moléculas no comenzó ni se incrementó al momento de la lesión, sino que éstas mantienen una presencia consecutiva, indicando que desempeñan un papel estabilizador de la citoarquitectura del sistema nervioso central adulto. Por esto, es posible suponer que participan activamente tanto en el desarrollo embriológico como en procesos de regeneración.

## 8. CONCLUSIONES

- Las glicoproteínas que unen PNA de la matriz extracelular del SNC de la sanguijuela inhiben la formación de neuritas primarias en los tres tipos neuronales estudiados.
- De la misma manera inhiben el crecimiento neurítico, lo que se refleja tanto en la longitud neurítica total como en los puntos de ramificación en dos tipos neuronales, las neuronas AP y las motoneuronas AE.
- Por otro lado modifican la actividad eléctrica de las neuronas AP, limitando tanto la amplitud como la integral de su potencial de acción; influyendo específicamente en  $\delta V/\delta t$  de su fase de subida.
- Todas estas glicoproteínas comparten su patrón de glicosilación, que es el sitio inicial de reconocimiento con su receptor así como con la lectina PNA; de ahí que al adicionarla al medio sea posible bloquear su efecto de manera dependiente de la dosis.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo, A.J. et al (1990) Regrowth and connectivity of injured central nervous system axons in adult rodents. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 1990;50(4-5): 381-9
- Aguayo, A.J. et al., (1990) Synaptic connections made by axons regenerating in the central nervous system of adult mammals. *J Exp Biol Oct*;153:199-224
- Alberts, B. et al., (1994) *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publising, New York USA: Extracellular Matrix 971-1000.
- Balice-Gordon, R.J. and Litchman, J.W. (1990) In vivo visualization of the growth of the pre- and postsynaptic elements of the mouse neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 10: 894-908
- Bastemayer, M. et al., (1991) Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocyte-like cells and fish CNS myelin. *J Neurosci.* 11:625-50
- Berg, D.K. et al., (1975) Increased extrajunctional acetylcholine sensitivity produced by chronic acetylcholine sensitivity produced by chronic post-synaptic neuromuscular blockade. *J. Physiol.* 244 :659-676
- Bergman, B.S. et al., (1989) Extension of the critical period for developmental plasticity of the corticospinal pathway. *J Comp Neurol*: 282: 355-70
- Bernstein, D.R. y Stelzner, D.J., (1983) Plasticity of the corticospinal tract following midthoracic spinal injury in the postnatal rat. *J Comp. Neurol.* 221:382-400
- Bixby, J.L. et al., (1988) Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J. Cell Biol.* 107 : 353-361
- Bonhoeffer, F. y Huf, J., (1982) In vitro experiments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum. *EMBO J.* 1-427-31
- Bray, D. and Hollenbeck, P.K. (1988) Growth cone motility and guidance. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 43-61
- Brenner, H.R. and Johnson, E.W. (1976) Physiological and morphological effects of post-ganglionic axotomy on presynaptic nerve terminals. *J. Physiol.* 260:143-158
- Brenner, H.R. and Martin, A.R. (1976) Reduction in acetylcholine sensitivity of axotomized ciliary ganglion cells. *J. Physiol.* 260:159-175
- Brown, G.L., (1937) The actions of acetylcholine on denervated mammalian and frog's muscle. *J. Physiol.* 89:438-461
- Carbonetto, S. et al., (1987) Nerve fiber growth in culture on tissue substrata from central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 7:610-620
- Carey, D.J. and Stahl, R.C., (1990) Identification of a lipid-anchored heparan sulfate proteoglycan in Schwann cells. *J Cell Biol Nov*;111(5 Pt 1):2053-62

- Caroni P. y Schwab M.E., (1988) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* Apr;106(4):1281-8
- Caroni, P. y Schwab, M.E. (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* Mar;1(1):85-96
- Caroni, P. et al., (1988) Central nervous system regeneration : oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. *Prog. Brain Res* 78:363-69
- Cohan, C.S., (1990) Frequency-dependant and cell-specific effects of electrical activity on growth cone movements of cultured *Helisoma* neurons *J. Neurobiol.*21:400-13
- David, S. and Aguayo, A.J.(1981) Axonal Elongation Into Peripheral Nervous System "Bridges" After Central Nervous System Injury In Adult Rats. *Science* 214:931-33
- Davies, J. et al., (1990) Isolation from Chick Somites of a Glycoprotein Fraction That Causes Collapse of Dorsal Root Ganglion Growth Cones. *Neuron* 2: 11-20
- Davis, A.M. and Lumsden, A. (1990) Ontogeny of the somatosensory system: origins and early development of primary sensory neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:61-73
- De-Miguel F.F. et al., (2002) Extracellular Matrix Glycoproteins Inhibit Neurite Production by Cultured Neurons. *J Comp Neurol* 443 :401-411
- De-Miguel F.F. and Vargas J. (2001) Steps in Formation of a Bipolar Outgrowth Pattern by Cultured Neurons, and Their Substrate Dependence. *J Neurobiol.*106-117
- De-Miguel F.F. and Vargas J.(1997) Different determinants on growth and synapse formation in cultured neurons. *Neuroreport* 8, 761-765
- De-Miguel F.F. and Vargas J. (2000) Native Extracellular Matrix Induces a Well-Organized Bipolar Outgrowth Pattern With Neurite Extension and Retraction in Cultured Neurons. *J Comp Neurol.* 417.387-398
- Fawcett, J. W. and Keynes R.J. (1990) Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:43-60
- Fawcett, J.W. et al., (1988) Oligodendrocytes repel axons and cause axonal growth cone collapse. *J. Cell Biol*92: 93-100
- 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
- Fernández De-Miguel F., and Drapeau P. (1995). Synapse Formation and Function: insights from identified leech neurons in culture. *J. Neurobiol* 27:367-369
- Fine, R.E. and Bray, D. (1971) Actin in growing nerve cells. *Nature* 234:115-18
- Fischer, W. et al., (1989) Degenerative Changes in Forebrain Cholinergic Nuclei Correlate with Cognitive Impairments in Aged Rats. *Eur. J. Neurosci.* 1:34-45
- Fischer, W. et al., (1991) NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J. of Neuroscience* 11 :1889-1906

- Fraser, S; et al., (1990) Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature*.29;344(6265):431-5
- Gan, W.B. y Macagno, E. (1997) Competition among the axonal projections of an identified neuron contributes to the retraction of some of those projections. *J. neurosci.* 17: 4293-4301
- Gao, W.Q. y Macagno E. (1987) Extension and retraction of axonal projections by some developing neurons in the leech depends upon the existance of neighboring homologues. II. AP and AE cells. *J. neurobiol.* 18:295-313
- Godement, P. y Bonhoeffer, F. (1989) Cross-species recognition of tectal cues by retinal fibers in vitro. *Development* 106:313-321
- Gómez M.T. et al., (2001) Filopodial calcium transients promote substrate dependant growth cone turning. *Science* V.291: 1983-1987
- Gundersen, R.W. and Barrett, J. N. (1980) Characterization of the turning response of dorsal root neurites toward nerve growth factor *J. Cell Biol.* 87:546-554
- Hamburger, V. (1939) Motor and sensory hyperplasia following limb-bud transplantations in chick embryos. *Physiol. Zool.*12.268-284
- Hatten, M.E. et al., (1984) Two forms of cerebellar glial cells interact differentially with neurons in vitro. *J Cell Biol.* 98:193-204
- Haydon P.G. et al., (1984) Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* Nov 2;226(4674):561-4
- Haydon P.G. et al., (1987) The regulation of neurite outgrowth, growth cone motility, and electrical synaptogenesis by serotonin. *J. Neurobiol.* Mar;18(2):197-215
- Haydon P.G. et al., (1984) Serotonin selectively inhibits growth cone motility and the connection of the identified neurons. *Science* 226:561-64
- Heumann, R. et al., (1987) Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J. Cell Biol.* 104 : 1623-1631
- Hoffmann, P.N. y Lasek, R.J., (1975) The slow component of axonal transport. Identification of major structural polipetides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J. Cell Biol.* 66: 351-66
- Hollyday, M. and Hamburger V. (1976) Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.* 170: 311-320
- Humphries, M. et al., (1988) Neurite extension of chicken peripheral nervous system on fibronectin: relative importance of specific adhesion aites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment. *J. Cell Biology* 106: 1289-1297
- Innocenti, G.M. (1981) Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connection. *Science* 212:824-827

- Jhonson, E.M. et al., (1988) Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends in Neurosci.* 11 :299-304
- Jessel Th. and Sanes J. (2000) in *Principles of neural Science.* (Kandel, E. et al.) Fourth Edition. McGraw-Hill. "The generation and survival of nerve cells" and "The guidance of Axons to their targets" pp.1041-1069
- Kalil K. and Reh T. (1982) A light and electron microscopic study of regrowing pyramidal tract fibers. *J Comp Neurol* Nov 1;211(3):265-75
- Kallen, R. G. et al., (1990) Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *J.Physiol.* 426 : 95-116
- Katz, B. and Miledi, R. (1964) The development of acetylcholine sensitivity in nerve-free segments of skeletal muscle. *J. Physiol.*170: 389-396
- Korneev, S. et al., (1997) A subtractive cDNA library from an identified regeneration of the leech CNS. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B* 331 :323-335
- Kuffler S.W. (1943) Specific excitability of the endplate region in normal and denervated muscle *J. Neurophysiol.*6:99-110
- Kwada, J.Y. (1986) Cell recognition by neuronal growth cones in a simple vertebrate embryo. *Science* 233 : 740-746
- Lander, A. D., (1989) Understanding the molecules of neural cell contacts: Emerging patterns of structure and function. *Trends in Neuroscience* 12: 189-195
- Lander, A.D. (1989) Understanding the molecules of neural cell contacts: emerging patterns of structure and function. *Trends Neurosci.* 12:189-195
- Langley, J.N. (1895) Note on regeneration of pre-ganglionic fibers of the sympathetic. *J.Physiol.*22:215-230
- Lankford, K., Cypher, C. and Letourneau, P. (1990) Nerve growth cone motility. *Curr Opin Cell Biol.* 2:80-85
- Lankford, K.L. et al., (1988) D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jun;85(12):4567-71
- Lankford, K.L. et al., (1988) D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr;85(8):2839-43
- Letourneau, P.C. (1975) Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev. Biol.* 44 :92-101
- Levi-Montalcini, R. (1982) Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Annu. Rev. Neurosci.* 5 :341-362
- Lipton, S.A. et al., (1988) Nicotinic antagonists enhance process of growth by rat retinal ganglion cells in culture. *Science*239:1293-96

- Lomo, T. and Rosenthal J. (1972) Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J. Physiol.* 221:493-513
- Lumsden, A.G.S. and Davis, A.M. (1986) Fasciculation in the early mouse trigeminal nerve is not ordered in relation to the emerging pattern of whisker follicles. *Nature* 323 : 538-539
- Luskin MB, Shatz CJ. (1985) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J. Neurosci.* 5 :1062-1075
- Masuda-Nakagawa, L.M and Nicholl, J. G. (1991) Extracellular matrix molecules in development and regeneration of the leech CNS. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 331: 323-335
- Masuda-Nakagawa, L.M. et al., (1990) Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. *Proc. R. Soc. Lond.* 241 :201-206
- Masuda-Nakagawa, L.M. and Weidemann, C. (1992) The role of ECM in regeneration of the leech CNS
- Mattson, M.P. y Kater, S.B. (1989) Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *Brain Res* Jan 30;478(2):337-48
- Mattson, M.P. et al., (1988) Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: a role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron* 1(9):865-76
- McCobb, D.P. et al., (1988) Interactive effects of serotonin and acetylcholine on neurite elongation. *Neuron* Jul;1(5):377-85
- McCobb, D.P. et al., (1988) Dopamine and serotonin inhibition of neurite elongation of different identified neurons. *J. Neuroscience Research* 19(1):19-26
- Menesini-Chen, M.G. et al., (1978) Sympathetic nerve fibers ingrowth in the central nervous system of neonatal rodent upon intracerebral NGF injections. *Arch. Itat. Biol.* 116-53-84
- Ming, G. et al., (2000) Adaptation in the Chemoattractive guidance of the nerve growth cone. *Nature.* 411-418
- Müller B. et al., (1990) In vitro experiments on axonal guidance and growth-cone collapse. *J Exp Biol* Oct;153:29-46
- Nathan, Sh. And Halina, L., (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246:227-234
- Nicholls, J. y Baylor, (1968) Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in the CNS of the leech. *J. Neurophysiology.* 31: 740-756
- Nicholls, J. et al., (1992) *From Neuron to Brain.* Sinauer Associates, Inc Publishers. USA. Third Edition. Part Three. Development and Regeneration of the Nervous System. p.p.339-421. Leech and Aplysia Two simple nervous systems. 422-66
- Nicholls, J. et al., (2001) *From Neuron to Brain.* Sinauer Associates, Inc Publishers. USA. Fourth Edition. Chapter 15 pp.291-314 y Chapter 23. pp 479-523
- Nja, A. and Purves, D. (1978) The effects of nerve growth factor and its antiserum on synapses in the superior cervical ganglion of the guinea-pig. *J. Physiol.* 277:53-75

- O'Brien, R.A.D. et al. (1978) Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 282 :571-582
- O'Rourke, N.A. and Fraser, S.E. (1990) Dynamic changes in optic fiber terminal arbors lead to retinotopic map formation: an in vivo confocal microscopic study. *Neuron* 5: 159\_171
- Pesheva, P. and Probstmeier, R. (2000) The ying and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog. Neurobil.* 62: 465-93.
- Purves, D. (1975) Functional and structural changes in mammalian sympathetic neurones following interruption of their axons. *J. Physiol.* 252:429-463
- Purves, D. and Sackmann, B. (1974) Membrane properties underlying spontaneous activity of denervated muscle fibres. *J. Physiol.* 239:125-153
- Reh, T. and Kalil, K. (1982) Development of the pyramidal tract in the hamster. II. An electron microscopic study. *J Comp Neurol* Feb 10;205(1):77-88
- Reh, T. and Kalil, K. (1982) Functional role of regrowing pyramidal tract fibers. *J Comp Neurol* Nov 1;211(3):276-83
- Reichardt, L.F. and Tomaselli, K.J. (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:531-570
- Rotshenker, S. (1988) Multiple modes and sites for the induction of axonal growth. *Trends Neurosci.* 11:363-366
- Schcher, S. (1985) Differential synapse formation and neurite outgrowth at two branches of the metacerebral cell of *Aplysia* in dissociated cell culture. *J. Neurosci.* 5: 2028-2034
- Scheetz J.F. and Lloyd, J.P. (2000) "The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function and regulation during embryogenic development and tissue remodeling" *Developmental Dynamics* 218:235-257
- Schwab ME and Thoenen H. (1985) Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci* Sep;5(9):2415-23
- Schwab, M. and Caroni, P. (1988) Oligodendrocytes and CNS Myelin are Nonpermissive Substrates for Neurite Growth and Fibroblast Spreading in vitro. *The Journal of Neuroscience.* 8(7): 2381-2393.
- Schwab, M.E. and Schnell, L. (1989) Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. *J. Neurocytol.* 18: 161-69
- Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1985) Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective to neurotrophic factors. *Neurosci.* 5:2415-23
- Schwab, M.E., Kapfhammer, J.P., Bandtlow, C.E. (1993) Inhibitors of Neurite Growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16 :565-95.
- Schwab, M.E. et al., (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:565-95

- Selheimer, B. and Schaner, M. (1988) Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J. Cell Biol.* 107: 341-351
- Smallheiser, NR and Crain, M (1984) The possible role of "sibling neurite bias" in the coordination of neurite extension, branching and survival. *J. neurobiol.* 15: 517-529
- Smith, S. J., (1989) Neuronal cytomotility: The actin based motility of growth cones. *Science* 242:708-715
- Spring, J. (1989) Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell* 59:325-334
- Stahl B. et al., (1990) Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* Nov;5(5):735-43
- Stern, C.D. et al., (1986) Interactions between neurites and somite cells: inhibition and stimulation of nerve growth in chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 91 209-226
- Stern, C.D. et al., (1989) J1/tenascin-related molecules are not responsible for the segmented pattern of neural crest cells or motor axons in the chick embryo. *Development* 107,309-319
- Sthal, B. et al., (1990) Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* 5: 735-743
- Stuermer C.A.O. and Raymond P.A. (1989) Developing retinotectal projection in larval goldfish. *J. Comp. Neurol* 281:630-640
- Thompson, W. (1983) Synapse elimination in neonatal rat muscle is sensitive to pattern of muscle use. *Nature* 302 :614-616
- Treherne, J.M. et al., (1992) Restoration of conduction and growth of axons through injured spinal cord of neonatal opossum in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 431-34
- Truman, J.W. (1984) Cell death in invertebrate nervous systems. *Annu. Rev. Neuroscience* 7 : 171-188
- Venstrom, K.A. and Reichart, L.F. (1993) Extracellular matrix 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the neurons system. *FASEBJ.* Vol7:996-1002.
- Vswicz, M.M. et al., (1990) Differential expression by nerve growth factor of two types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat phaeochromocytoma cell lines. *Neuron* 4: 233-242
- Walter et al., (1987) Avoidance of Posterior tectal membrana by temporal retinal axons. *Development* 101: 909-913
- Wood, P.M., Schaner, M. et al (1990) Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J. Neurosci.* 10:3635-3645
- Wu X. et al., (2000) Protein expression patterns of identified neurons and sprouting cells from the leech central nervous system. *J. Neurobiol.* 44:320-32