



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)

EVALUACIÓN DE HIDROGELES DE METILCELULOSA Y MICROESFERAS DE
ÁCIDO LÁCTICO Y GLICÓLICO COMO VEHÍCULOS PARA LA LIBERACIÓN DE
SEMAFORINA 3A RECOMBINANTE EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
ANDREA ARIADNA RIOS RAMIREZ

TUTORES PRINCIPALES:
DRA. ELISA TAMARIZ DOMÍNGUEZ, Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)
DRA. MARÍA MAGDALENA GIORDANO NOYOLA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. JORGE LARRIVA SAHD, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA.
DR. VICTOR MANUEL CASTAÑO MENESES, CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y
TECNOLOGÍA AVANZADA.

MÉXICO, D.F, ABRIL 2014



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Andrea Ariadna Rios Ramírez, cuyo título es: Evaluación de hidrogeles de metilcelulosa y microesferas de ácido láctico y glicólico como vehículos para la liberación de semaforina 3A recombinante en el sistema nervioso central, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Isabel Miranda Saucedo

Secretario (Tutor)

Dra. Maria Magdalena Giordano Noyola

Vocal

Dra. Luz María López Marín

Suplente

Dr. Jorge Larriva Sahd

Suplente

Dra. Isabel C. Méndez Hernández

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

EVALUACIÓN DE HIDROGELES DE METILCELULOSA Y MICROESFERAS DE ÁCIDO LÁCTICO Y GLICÓLICO COMO VEHÍCULOS PARA LA LIBERACIÓN DE SEMAFORINA 3A RECOMBINANTE EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La liberación de proteínas en el sistema nervioso central es restringida por la barrera hematoencefálica, por este motivo la liberación local de sustancias en el Sistema Nervioso Central requiere el empleo de vehículos que sean biocompatibles y biodegradables. En este estudio se evaluaron los hidrogeles de metilcelulosa (HMC) y microesferas de un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (Microesferas de PLGA) como vehículos biocompatibles en los que se encapsuló la semaforina 3A recombinante (sema 3A-FC); esta proteína tiene un efecto atrayente en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral (MV) y repelente en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) durante el desarrollo embrionario. Los ensayos *in vitro* mostraron que la encapsulación y liberación de proteínas en las microesferas de PLGA es de baja eficiencia en comparación con los HMC. Los HMC liberan y mantiene la funcionalidad de la sema 3A-FC, ya que en cultivos de MV se observó mayor crecimiento de los axones dopaminérgicos, y en cultivos de GRD se observó la retracción de axones cercanos a la fuente de sema 3A-FC. Por otra parte pruebas conductuales en ratas implantadas unilateralmente con HMC en el estriado a una semana, dos semanas, cuatro semanas y ocho semanas post-transplante no mostraron cambios a nivel locomotor o conductual. También se observó que en la primera semana hay aumento transitorio de la microglía activada y los macrófagos, el cual disminuye a lo largo del tiempo. Además, se observó que el número de astrocitos incrementa a las cuatro semanas y a las ocho semanas tiende a disminuir. Los resultados indican que los HMC conservan las propiedades de la proteína, se libera adecuadamente y en el encéfalo produce un proceso inflamatorio transitorio y localizado, por lo que no produce efectos deletéreos ni a nivel histológico ni conductual. Todo esto indica que los HMC son un vehículo adecuado para liberar proteínas en el cerebro.

SUMMARY

EVALUATION OF METHYLCELLULOSE HYDROGELS AND POLY-LACTIC CO-GLYCOLIC ACID MICROSPHERES AS VECTORS FOR THE RELEASE OF RECOMBINANT SEMAPHORIN 3A IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Protein release into the central nervous system is restricted by the presence of the blood brain barrier. One potential strategy is the release of substances of interest into the central nervous system by the use biomaterials that should be biocompatible, and biodegradable. In the present study two biomaterials were evaluated, methylcellulose hydrogels and microspheres of a copolymer of lactic acid-glycolic acid (ME-PLGA) wherein was encapsulated recombinant semaphorin 3A (sema 3A-FC). This protein has an attractive effect on dopaminergic ventral midbrain neurons (VM) during the formation of the nigro-striatal pathway and repellent in dorsal root ganglion neurons (DRG) during embryonic development. *In vitro* tests showed that the encapsulation and release of proteins in ME-PLGA is of low efficiency and no concentration gradient is formed, as compared with methylcellulose hydrogels (HMC). Evaluation of the biological effect of released sema 3A-FC in primary cultures of VM and DRG showed that the chemotropic protein is efficiently released from HMC and retains its functionality. Furthermore behavioral tests in rats unilaterally implanted with HMC in the striatum at one week, two weeks, four weeks and eight weeks post-transplantation showed no alterations in locomotor activity and other behavioral tests. We observed that one week after transplantation there was an increase in activated microglía and macrophages, which decreased over time. Furthermore, astrocyte number increased at 4 weeks, but by 8 weeks levels decreased as well. The results indicate that HMC maintains the properties of the protein of interest, the protein is adequately released, and no inflammation is produced after transplantation into the brain. This indicates that this is a suitable vehicle to deliver proteins into the brain.

AGRADECIMIENTOS

A María Soledad Mendoza Trejo, Técnico del laboratorio de Plasticidad cerebral del INB, UNAM.

A Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de microscopia del INB, UNAM.

A Andrés Falcón Alcántara del laboratorio de Farmacología marina del INB, UNAM.

A la M. en C. Adriana González Gallardo de la Unidad de proteogenómica del INB, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No: 372072

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM
Becario No. 51100662-9

A los proyectos de PAPIIT: IN-211709-22 y CONACYT: 82482 y 103907.

ÍNDICE

Resumen español

Resumen inglés

I- Introducción	1
II- Antecedentes	2
1- Semaforinas	3
2- Sistema inmunológico en el SNC	6
2.1-Reacción inflamatoria ante una lesión en el SNC	7
2.2-Reacción ante biomateriales	8
3- Biomateriales	9
3.1-Hidrogeles	10
3.1.1-Metilcelulosa (MC)	11
3.2-Microesferas	12
3.2.1-Microesferas de PLGA	12
III- Justificación	14
IV- Hipótesis	14
V- Objetivos	15
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
VI- Material y métodos	15
1- Liberación de proteínas incluidas en HMC y microesferas de PLGA	15
1.1- Liberación de proteínas en un medio acuoso	15
1.2- Liberación de proteínas en una matriz tridimensional	17
2- Evaluación <i>in vitro</i> de la liberación y actividad de la sema 3A-FC incluida en hidrogeles o microesferas.	19
2.1- Obtención de ganglios de la raíz dorsal (GRD)	19
2.2- Obtención de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo (MV)	20
2.3- Liberación <i>in vitro</i> y actividad quimiotrópica de la Sema	20

3A-FC incluida en hidrogeles termorreversibles	
2.3.1- Inmunotinción de neuronas dopaminérgicas	21
2.3.2-Detección de neuritas mediante faloidina rodaminada	21
3- Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad de las microesferas de PLGA	22
4- Evaluación <i>in vivo</i> de la biocompatibilidad	22
4.1- Implante de HMC en el estriado	22
4.2- Evaluación de consumo de alimento	23
4.3- Coordinación motora	23
4.4- Evaluación neurológica	24
4.4.1- Evaluación general	24
4.4.2- Evaluación Sensorial	24
4.5- Evaluación motora	25
4.6- Actividad locomotora espontánea	26
4.7- Evaluación histológica	28
4.8- Análisis estadístico	31
VII- Resultados	31
1- Elaboración y caracterización de los hidrogeles de metilcelulosa	31
2- Elaboración y caracterización de las microesferas de PLGA	31
3- Liberación en PBS de albúmina bovina incluida en HMC o en microesferas de PLGA	32
4- Formación de gradientes de concentración de inmunoglobulina fluorescente incluida en HMC o en microesferas de PLGA en una matriz tridimensional de colágena	34
5- Efecto de la sema 3A-FC, liberada a partir HMC sobre neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral	36
6- Efecto de la sema 3A-FC liberada a partir de hidrogeles de metilcelulosa en neuronas de ganglios de la raíz dorsal	39
7- Evaluación <i>in vitro</i> del empleo de microesferas de PLGA	41
7.1- Efecto de los productos de degradación de las microesferas de PLGA, en cultivos de neuronas	41

dopaminérgicas de mesencéfalo ventral	
7.2- Efecto de diferentes concentraciones de sema 3A-FC sobre neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral	42
8- Evaluación de biocompatibilidad de los HMC <i>in vivo</i>	43
8.1- Evaluación neurológica	43
8.2- Evaluación del consumo de alimento	44
8.3- Coordinación motora	47
8.4- Actividad locomotora	47
8.5- Evaluación histológica	50
8.5.1- Tinción con violeta de cresilo	50
8.5.2- Identificación de la presencia del HMC en el estriado	50
8.5.3- Análisis de la respuesta inflamatoria	52
8.5.3.1- Análisis cualitativo y cuantitativo de la respuesta inflamatoria	53
VIII-Discusiones	60
IX-Conclusiones	67
X- Referencias	68
Lista de figuras	75
Anexos	77

I- INTRODUCCIÓN

La liberación de proteínas en el sistema nervioso central está restringida por la presencia de la barrera hematoencefálica, ya que ésta presenta permeabilidad selectiva, por lo tanto limita el paso a cualquier tipo de proteína no esencial; por este motivo se requiere el empleo de vehículos de liberación local que sean biocompatibles, biodegradables y que sus productos de biodegradación no produzcan neurotoxicidad. Entre los mecanismos de liberación se encuentra el uso de biomateriales poliméricos, los cuales pueden ser diseñados para liberar de manera controlada en el lugar y a la velocidad deseada la proteína de interés sin modificarla. Entre estos polímeros se encuentran los hidrogeles termorreversibles y microesferas, los cuales han mostrado su biocompatibilidad y biodegradación, propiedades ideales para liberar proteínas *in situ* en diferentes tejidos.

En el presente trabajo se usaron hidrogeles termorreversibles de metilcelulosa (HMC) y microesferas del copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (microesferas de PLGA), para liberar proteínas quimiotrópicas recombinantes y generar un gradiente de concentración mediante difusión pasiva. Particularmente se libero semaforina 3A recombinante (sema 3A-FC) ya que se ha visto que esta molécula quimiotrópica está implicada en la formación de la vía nigro-estriada en el desarrollo embrionario, a través de su efecto atrayente en neuronas dopaminérgicas; y se ha mostrado que facilita la recuperación de animales hemiparkinsonicos implantados con neuronas dopaminérgicas provenientes de la diferenciación de células troncales embrionarias; estos resultados sugieren su uso para complementar terapias de sustitución neuronal donde uno de los retos es la correcta proyección de las neuronas implantadas.

En este trabajo se evaluó la eficiencia de liberación y funcionalidad de la sema 3A-FC incluida en biomateriales, así como la biocompatibilidad de estos al ser implantados en el cerebro de ratas Wistar adultas.

II- ANTECEDENTES

La formación de la arquitectura cerebral durante el desarrollo embrionario es gradual e incluye una variedad de ajustes entre los que se encuentran la orientación del crecimiento axonal y su destino. Para que el sistema nervioso sea funcional las neuronas extienden sus axones a menudo largas distancias hasta alcanzar sus dianas, en este proceso se ven implicadas señales moleculares específicas que guían los axones hacia sus objetivos, las cuales son reconocidas por el cono de crecimiento (Dickson , 2002).

En función de las señales moleculares la parte más distal de la proyección neuronal, o cono de crecimiento, elabora una respuesta dentro de un determinado contexto celular, es decir el ambiente que rodea las células proporciona un juego complejo de órdenes para el axón en vías de crecimiento. Los conos de crecimiento tienen tres regiones principales: 1) El núcleo central que es rico en microtúbulos, mitocondrias y otros organelos; 2) Los filopodios que son delgadas extensiones en la parte más distal del cono de crecimiento y 3) Los lamelopodios que se encuentran entre los filopodios, y al igual que los filopodios son móviles y dan al cono de crecimiento su característico aspecto erizado (Dickson, 2002).

La capacidad sensitiva del cono de crecimiento depende en gran parte de sus filopodios. Estas estructuras en forma de cilindro, ricas en actina, son muy móviles; sus membranas poseen receptores para las moléculas que sirven como señales de dirección para el axón. La longitud de los filopodios les permite tantear el terreno mucho antes que el núcleo central, sus rápidos movimientos les permiten hacer un inventario detallado del ambiente y su flexibilidad les permite navegar a través de células y de otros obstáculos. Cuando los receptores de los filopodios encuentran señales en el medio ambiente, el cono es estimulado para avanzar, retraerse o girar. Para la guía de filopodios es particularmente importante el acoplamiento entre las capacidades sensitiva y motora del cono de crecimiento, es decir, que los receptores en los filopodios no intervengan simplemente en la adherencia sino que sean receptores y transmisores de señales acoplados a vías de segundos mensajeros. Los segundos mensajeros afectan a su vez

la organización del citoesqueleto, y regulan de esa manera la dirección y la velocidad con la que se mueve el cono de crecimiento (Dickson, 2002).

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

Las señales que recibe el axón son proporcionadas por la presencia de moléculas quimiotrópicas que favorecen el avance o retroceso del cono de crecimiento (Dickson, 2002). Estas desempeñan un papel fundamental ya que intervienen en la adherencia y también favorecen el crecimiento o retracción del axón (Dickson, 2002). Las moléculas quimiotrópicas actúan a través de la formación de gradientes de concentración y de acuerdo con su capacidad de difusión se pueden considerar como de corto o largo alcance. Las proteínas quimiotrópicas de corto alcance pueden estar ancladas a la membrana de otras células o a componentes de la matriz extracelular, las proteínas de largo alcance son secretadas al medio extracelular y pueden llegar a grandes distancias (Song y Poo, 2001).

1- Semaforinas

Las semaforinas son moléculas quimiotrópicas que se definen por la presencia de un dominio amino-terminal denominado “sema”, altamente conservado y clave para la señalización, un dominio conservado rico en cisteína (CDR) de aproximadamente 500 aminoácidos que, como su nombre lo indica, contiene una secuencia rica en cisteínas denominada “Met Related” (MRS) que es la que confiere la especificidad biológica (Artigiani et al., 1999 y Raper, 2000). Además del dominio sema existen otros como el

plexina semaforina e integrina (PSI) y el dominio carboxi-terminal que contiene aminoácidos básicos con un dominio de inmunoglobulina adyacente que ayuda a reafirmar la unión de las semaforinas de clase III a sus receptores (Kruger et al., 2005; Raper, 2000).

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

Los receptores de alta afinidad de las semaforinas son las plexinas, que pertenecen a una gran familia de moléculas transmembranales que se conservan de invertebrados a humanos, y las neuropilinas (Npn 1 y Npn 2) que se encuentran solamente en vertebrados. Las semaforinas ancladas a la membrana se unen directamente a las plexinas, mientras que las semaforinas secretadas requieren además neuropilinas como correceptores obligatorios. La evidencia experimental indica que el dominio citoplásmico de las plexinas es requerido en la señalización por semaforinas, mientras que se puede prescindir del lado citosólico de las neuropilinas (Tamagnone y Comoglio, 2004). Sin embargo, recientemente se ha comenzado a describir la interacción de neuropilina con proteínas de adhesión célula-célula como L1-CAM, o de adhesión al sustrato tales como integrinas, o proteínas de adhesión focal (Castellani et al., 2002; Tamagnone y Comoglio, 2004 y Valdembrì et al., 2009;), lo que sugiere que su papel en la regulación de la respuesta a semaforinas podría estar ligada a la regulación de la adhesión al sustrato.

La semaforina 3A es una glicoproteína de 100 kDa que ha demostrado ser un factor de regulación durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico (SNC, SNP) en los vertebrados (Steffensky et al., 2006), con efectos tanto atrayentes como repelentes. Inicialmente se describió por su capacidad de colapsar el cono de crecimiento axonal de los ganglios de la raíz dorsal (GRD), particularmente en el estadio de desarrollo embrionario (E) de 14.5 días de la rata. Este efecto tiene relación con el patrón de expresión de la semaforina 3A en la médula espinal ventral en el mismo estadio de desarrollo; ya que actúa como un quimiorrepelente para neuronas GRD dependientes de NGF. Esto se correlaciona bien con el patrón de expresión de sema 3A en el cordón ventral durante el tiempo de la inervación sensorial aferente, etapa en la que las proyecciones están llegando a su blanco (Kolodkin et al., 1997).

Por otra parte Hernández-Montiel y cols. en el 2008, encontraron mediante hibridación *in situ* la expresión de sema 3A en el estriado y sema 3C y sema 3F en el área pretectal de embriones de rata. Estos autores demostraron que sema 3C y 3A tienen efectos atrayentes sobre los axones de neuronas dopaminérgicas provenientes del mesencéfalo ventral embrionario mientras que Sema 3F ejerce un efecto repulsivo. Tamariz et al. en el 2010 demostraron que las neuronas dopaminérgicas diferenciadas de células troncales (ES-TH) expresan los correceptores de semaforina Npn1 y Npn2 en proporciones similares a las observadas en neuronas embrionarias dopaminérgicas del mesencéfalo (VM-TH). Por otra parte demostraron que las neuronas ES-TH, al igual que las neuronas VM-TH, muestran una respuesta de elongación y atracción cuando se exponen a sema 3A o 3C. Por lo anterior, se planteó que sema 3A y 3C podría complementar terapias de sustitución celular que tienen como objetivo sustituir, mediante implantes de células provenientes de fuentes como las células troncales, las neuronas y sus inervaciones perdidas debido a enfermedades neurodegenerativas o lesiones que producen la muerte neuronal. Un ejemplo de lo anterior es el caso de la enfermedad de Parkinson (EP), donde la muerte de neuronas dopaminérgicas en la zona de la sustancia nigra conlleva a la pérdida de la vía dopaminérgica que parte de la sustancia nigra y llega al estriado dorsolateral. Díaz y cols. en el 2013 utilizando modelos animales de la EP implantaron ES-TH en la sustancia nigra pars compacta, en combinación con

implantes, en dirección del cuerpo estriado, de células HEK293 transfectadas con la región codificante de sema 3A o sema3C. Se observó en los animales doblemente implantados que las neuronas ES-TH proyectaron sus axones hasta el estriado, liberaron dopamina y produjeron una recuperación funcional de los animales experimentales tratados con semaforinas, a diferencia de los animales solamente implantados con ES-TH o con células HEK293 sin transfectar. La liberación de semaforinas mediante el uso de la línea celular HEK293 sin embargo, no es un método muy adecuado para su aplicación clínica, ya que podría dar lugar a una respuesta inmune, el crecimiento no controlado de la línea celular, y la consecuente formación de tumores. De manera que, Tamariz y cols. (2011) estudiaron el uso de biomateriales nano estructurados como vectores de liberación de semaforinas. El biomaterial que emplearon fue un nano-gel compuesto de nanopartículas de poli-etilenglicol y sílice (PEG-Si), el cual fue capaz de liberar la semaforina de manera gradual formando un gradiente de concentración *in vitro* e induciendo la elongación de axones de VM-TH. Sin embargo, aunque el implante del gel de PEG-Si en el estriado de ratas adultas no mostró una respuesta inflamatoria temprana, sí se observó acúmulo de glía y células inflamatorias como microglía y macrófagos 30 días post implante, lo cual se relacionó con los productos de biodegradación del nanogel.

2- Sistema Inmunológico en el SNC

El SNC se ha considerado como un sistema inmuno-privilegiado. Esta definición se basa en diferentes características locales como la presencia de la barrera hematoencefálica. En condiciones normales el SNC no exhibe moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) ni se detectan células profesionales presentadoras de antígeno. La ruptura de la barrera hematoencefálica durante procesos patológicos como las enfermedades infecciosas o autoinmunes permite la entrada de células sanguíneas, disparando una serie de eventos de inmunidad en los que no sólo participan diversos componentes del sistema de defensa sino también elementos locales como la glia (Gonzales y Toro, 2006). En general cuando está presente un cuerpo

extraño en el SNC se produce inflamación y fagocitosis inespecífica del cuerpo extraño por la acumulación de fagocitos como neutrófilos y macrófagos en el área inflamada.

2.1-Reacción inflamatoria ante una lesión en el SNC

Las lesiones mecánicas en el parénquima cerebral producen una respuesta inflamatoria aguda en el sitio de la lesión. La ruptura de la barrera hematoencefálica favorece el reclutamiento de neutrofilos en las primeras 24 h, y 48 h después se observa la presencia tanto de macrófagos externos como de microglia activa (Schnell, 1999).

La microglía que es de origen mesodérmico (Kettenmann, 2011), es el principal, participa en la reacción inflamatoria innata después de una lesión en el SNC, ya que responde a una lesión, daño, patógenos y contribuye a la evolución neurológica de la lesión cerebral aguda. Estas células están normalmente presentes en el cerebro sano y tienen la capacidad de responder rápidamente a las lesiones o alteraciones en el microambiente. Después de una lesión cerebral aguda, estas células residentes se activan rápidamente y sufren cambios morfológicos y fenotípicos dramáticos, entre ellos, engrosamiento de las ramificaciones y de los cuerpos celulares seguido por la adquisición de una forma ameboide redondeada. Además, cuando hay una lesión, hay reclutamiento de macrófagos que migran hacia el parénquima del cerebro dañado. Tanto microglía como macrófagos secretan interleucina 1β (IL- 1β), factor necrótico tumoral α (TNF- α), proteasas, citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NO). Ambas células presentan cualidades protectoras, promueven neurogénesis y reparación en el lugar de la lesión. Los macrófagos presentan cambios fenotípicos que ocurren en la periferia de la inflamación, tomando así diferentes formas de activación polarizada: Una de ellas es la activación clásica o M1, que se caracteriza por su alta capacidad de presentar antígenos, alta producción de NO y ROS y de citoquinas proinflamatorias, las células M1 actúan como efectores potentes que matan a los microorganismos y células tumorales, de esta manera inicia una respuesta inflamatoria innata. El segundo fenotipo (M2) es un estado de activación relacionado con la promoción de angiogénesis. La adaptación de M1 o M2 dependerá del

microambiente en la zona lesionada (Hart et al., 2011, Perego et al., 2011 y Gonzales y Toro, 2006).

Además de las células microgliales, los astrocitos, de origen ectodérmico (Gonzales y Toro, 2006), juegan un papel importante en el SNC dando soporte físico a las neuronas, proveen nutrientes, mantienen el balance iónico en el espacio extracelular y además, participan en la respuesta inflamatoria. Los astrocitos responden a las lesiones en el SNC incrementando la producción de la proteína fibrilar acídica glial (GFAP) la cual sirve como indicador de que los astrocitos se han activado (astrocitos fibrilares), esto debido a la presencia de citocinas en el parénquima neural. Participan en dos aspectos fundamentales: la secreción de factores solubles como citocinas y quimiocinas y la presentación de antígenos en el contexto de las moléculas de clase II del CPH. Su función principal es crear una barrera física entre las células dañadas y las sanas. El daño físico de isquemia o inflamación resulta en una respuesta más intensa con proliferación de astrocitos, formación de cicatrices, el daño de la barrera hematoencefálica y activación colateral de microglía adyacente (Gonzales y Toro, 2006 y Raivich et al., 1999).

2.2 Reacción inflamatoria ante biomateriales

El implante de biomateriales inducen una cascada de eventos inicialmente similares a los descritos anteriormente, ya que el implante conlleva por sí mismo la presencia de una lesión. La exposición de biomateriales a componentes del torrente sanguíneo favorece el proceso de opsonización que consiste en la unión de diversas proteínas contenidas en el suero como opsoninas, inmunoglobulinas y proteínas del complemento (Anderson et al ., 2008 y Wilson et al., 2005). Las células inflamatorias reclutadas al sitio de la lesión reconocen las proteínas adsorbidas al biomaterial y se desencadena la respuesta de fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos, que intentarán degradar el material extraño generando una reacción inflamatoria aguda. La degradación del biomaterial y capacidad de fagocitosis de las leucocitos determina la resolución del evento inflamatorio; sin embargo si la capacidad de degradación o la

fagocitosis no es suficiente se puede desencadenar un procesos inflamatorio crónico que recluta linfocitos, células endoteliales y de tejido conectivo, la fusión de macrófagos en células multinucleadas gigantes, la formación de un tejido de granulación, y la encapsulación del sitio inflamado mediante fibrosis (Bryers, 2012)

Existen muy diversas estrategias dentro del campo de los biomateriales para producir materiales compatibles que reduzcan al mínimo la respuesta inflamatoria tales como la inhibición de la adsorción de proteínas del, velocidad de biodegradación, o el diseño de materiales porosos y/o de tamaños nanométricos.

3- Biomateriales

Los biomateriales son materiales capaces de estar en contacto con tejidos vivos durante un periodo determinado o como parte del tejido, con la finalidad de completar al tejido y/o para ayudar a su funcionamiento, sin afectar al resto del organismo o al mismo tejido (Dee et al., 2002).

En general los biomateriales se dividen en metálicos, poliméricos y cerámicos. Los metálicos tienen una estructura cristalina en la que los átomos están dispuestos de manera ordenada; los cerámicos son materiales inorgánicos no metálicos, cristalinos o no, donde los átomos mantienen enlaces iónicos y/o covalentes; y los poliméricos están formados por largas cadenas de moléculas orgánicas que pueden estar libres o unidas entre sí a través de algunos enlaces covalentes o fuerzas secundarias; esto es lo que permite diferenciar a los polímeros termoplásticos de los termorrígidos y es importante mencionar que las propiedades mecánicas de los polímeros dependerán de la temperatura (Sastre et al., 2004).

El uso de biomateriales para la liberación controlada de sustancias activas en los seres vivos se ha estudiado con especial interés desde las ciencias de nuevos materiales y la farmacéutica, lo que ha permitido conocer en detalle la mayor parte de los factores que intervienen en este proceso, con el objeto de proponer formas de

administración de fármacos de una manera controlada y para hacer los procesos terapéuticos más efectivos. Desde el punto de vista de los materiales, la tendencia es a obtener sistemas biocompatibles inteligentes, cargados con el principio activo del medicamento, que respondan a estímulos del ambiente y puedan liberar su carga en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada.

Es así como en las últimas décadas los polímeros han recibido mucha atención para su aplicación en esta área dado que sus propiedades pueden ser diseñadas de acuerdo con los requerimientos que se deseen. Entre los vehículos poliméricos utilizados están microesferas, nanoesferas, nanocompositos e hidrogeles. Los hidrogeles han mostrado muy buenas propiedades para ser cargados con medicamentos, por ser biocompatibles y presentar propiedades de hinchamiento en medio acuoso entre otras características de interés, lo que los perfila como una buena opción para ser usados en la liberación controlada de medicamentos (Arredondo y Londoño., 2009).

3.1-Hidrogeles

Un hidrogel es una red tridimensional conformada por cadenas flexibles de polímeros que absorben cantidades considerables de agua. Las características que presentan son: hidrófilos, blandos, elásticos e insolubles en agua, además de que se hinchan en presencia de ella, aumentando apreciablemente su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el equilibrio físico-químico. Adicionalmente, pueden tener gran resistencia mecánica según el método con el que se obtengan. Su conformación tridimensional ocurre en soluciones acuosas concentradas cuando el polímero inicial es capaz de gelificar con la consecuente formación de redes espaciales no covalentes. El carácter hidrófilo se debe a la presencia de grupos funcionales hidrófilos como son: OH, COOH, CONH, entre otros. Los hidrogeles son materiales muy apropiados para aplicaciones en medicina dada su buena interacción con los tejidos vivos, ya que por un lado muestran buenas propiedades de biocompatibilidad, debido principalmente a su consistencia blanda, elástica y contenido de agua, y por otro lado, son materiales inertes por lo que las células y proteínas no tienden a pegarse a su

superficie; y además, su característica de hinchamiento en medio líquido les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas, algunas soluciones orgánicas (Arredondo y Londoño. 2009). Los hidrogeles termorreversibles son aquellos que se encuentran en solución por debajo de la temperatura ambiente y en gel por arriba de ésta (Subodh y Weiguo, 2004).

3.1.1-Metilcelulosa (MC)

La MC es un polímero de origen natural, miembro de la familia del éter de celulosa, forma soluciones acuosas que presentan la característica única de formar geles reversibles debido a las interacciones hidrofóbicas cuando se calienta por encima de una determinada temperatura, esta propiedad fisicoquímica de gelificación pueden ser modificada agregando sales, citratos o azúcares a la solución; permitiendo que durante la hidratación la densidad de carga se transfiera a los átomos de hidrógeno y oxígeno del agua, produciendo la estabilización o desestabilización de la solución; y creando una competencia entre la interacción de iones de agua y la interacción agua-agua, dado que los aniones son más fuertes que los cationes en la estructuración de agua; esto debido a la asimetría de la carga en una molécula de agua y son mucho más eficaces en la reducción de la temperatura de gelificación (Itoh et al., 2011 y Bain et al. 2012). Previamente se mostró que al elaborar hidrogeles de metilcelulosa (HMC) al 5% con amortiguador de fosfatos (PBS 1X), los hidrogeles gelifican a 37°C. Esto permitió su microinyección en estado líquido en diferentes zonas del cerebro, mediante métodos poco invasivos, y su gelificación a la temperatura fisiológica en el sitio de inyección (Tate et al 2001). Se mostró también que depósitos de HMC en la corteza fronto-parietal de ratas adultas tras una lesión, puede servir como andamio para la regeneración del área dañada; además los HMC son biocompatibles ya que a las dos semanas no muestran una respuesta inmunológica significativa en la zona de inyección; esto también se observó en cultivos de astrocitos y neuronas que fueron puestos en contacto con los HMC (Tate et al 2001).

3.2-Microesferas

Los tres sistemas que se han aplicado con mayor éxito para la liberación de péptidos y proteínas son: los basados en la modificación química de las biomoléculas con polietilenglicol (PEGilación) y los que se basan en la encapsulación de las moléculas en sistemas lipídicos (liposomas) o poliméricos (microesferas). La PEGilación es la conjugación de las proteínas con polietilenglicol (PEG), este proporciona a las proteínas características de liberación, tales como mayor tiempo de vida en el organismo y mayor estabilidad térmica. Los liposomas son vehículos coloidales formados por una bicapa de fosfolípidos, que contiene sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas. Las estructuras únicas de los liposomas les brindan a las proteínas propiedades como: aumentar su eficacia y se pueden usar en el direccionamiento pasivo de los fármacos hacia los tejidos enfermos. En los últimos 20 años se han estudiado las microesferas biodegradables de polímeros biocompatibles como sistemas coloidales de liberación controlada de péptidos y proteínas. Generalmente, el fármaco está distribuido en la matriz polimérica y es liberado por dos mecanismos fundamentales: por la difusión a través de la matriz y por la degradación del polímero, que lleva a la erosión de las partículas. Para ello se han empleado polímeros naturales y sintéticos; entre estos últimos se destacan los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico (PLGA) (Saez et al., 2007, Roman et al., 2008 y Chiappetta et al., 2006).

3.2.1-Microesferas de PLGA

El copolímero de PLGA es un poliéster alifático, con la capacidad de transportar péptidos y/o proteínas (Chiappetta et al., 2006). La liberación de proteínas contenidas en microesferas de PLGA exhiben comúnmente un patrón compuesto por tres etapas: 1) liberación inicial rápida, que por lo general ocurre durante el primer día. En lo fundamental está determinada por la proteína que se encuentra en la superficie de las microesferas, y de los poros y canales que componen la estructura interna de la micropartícula, los cuales se llenan con el medio de incubación durante las primeras horas del ensayo, 2) liberación lenta, en la que se libera muy poca proteína y 3)

liberación más rápida, determinada por la erosión de las partículas. En ocasiones, la liberación puede ocurrir en dos etapas y el perfil muestra una forma asintótica. A la liberación de la proteína contribuyen los procesos de difusión de esta a través de los poros y canales que tienen las partículas, y la exposición de las moléculas de proteína al medio de incubación, debido a la erosión superficial de las partículas lo cual también ocurre como consecuencia de la degradación de la matriz polimérica. Los poros y canales de las micropartículas se forman como producto del propio proceso de fabricación o por la modificación de la estructura como consecuencia de la degradación del polímero. Por esta razón, existen varios factores que influyen en el perfil de liberación de las proteínas encapsuladas en microesferas de PLGA. Entre ellos se destacan las características de la matriz polimérica empleada y de la proteína encapsulada, la estructura de la micropartícula obtenida, la técnica de encapsulación y las condiciones experimentales en que esta se realiza, así como la coencapsulación de aditivos con fines diversos (Saez et al., 2007 y Chiappetta et al., 2006).

Las ventajas de las microesferas de PLGA son: una formulación sencilla, un mínimo de heridas quirúrgicas al implantar el biomaterial y presentan propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad, poca fluctuación en la concentración del fármaco (Qiao et al., 2005 y Saez et al., 2007) y su desventaja es presentar un perfil bajo de liberación (Saez et al., 2007). En la actualidad se encuentran disponibles comercialmente varios fármacos en microesferas de PLGA: Lupron, el cual tiene como principio activo Leuprorelina, Sondistain su principio activo es el Octreotida y Abarelix; estos fármacos son utilizados para el tratamiento de tumores y cáncer (Saez et al., 2007).

En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de liberación y la funcionalidad de semaforinas recombinantes incluidas en 2 tipos de biomateriales, así como la biocompatibilidad de estos biomateriales al ser implantados en el cerebro de ratas adultas.

III- JUSTIFICACIÓN

El uso de semaforinas de clase 3 para direccionar y promover el crecimiento axonal de neuronas dopaminérgicas, es una alternativa que puede ayudar a complementar terapias de sustitución celular en donde uno de los obstáculos para su éxito es la correcta proyección e inervación de las neuronas implantadas. Sin embargo, dada la poca accesibilidad del SNC, la naturaleza proteica de las semaforinas, y la necesidad de formar gradientes de concentración para tener efecto sobre los axones, es necesario buscar vehículos de liberación controlada que sean poco invasivos, impidan la pronta degradación de las semaforinas, que eviten efectos pleiotrópicos, y que permitan una liberación focalizada a partir de la cual se formen gradientes. El uso de biomateriales como vehículos de liberación local y controlada es una alternativa que ha mostrado ser funcional. Por lo anterior en este trabajo estudiamos el uso de hidrogeles termorreversibles de metilcelulosa y microesferas de PLGA como vehículos de liberación de semaforina 3A, y analizamos tanto la funcionalidad para liberar la semaforina activa, como la compatibilidad de los biomateriales con el SNC.

IV- HIPÓTESIS

- La sema 3A-FC liberada del hidrogel de metilcelulosa se mantiene biológicamente activa.
- La sema 3A-FC liberada de las microesferas de PLGA se mantiene biológicamente activa.
- La presencia del hidrogel de metilcelulosa en el estriado no causa alteraciones lesivas a nivel tisular y conductual.

V- OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los hidrogeles de metilcelulosa y las microesferas de PLGA como vehículos de liberación de sema 3A-FC *in vitro*, y si su implante en el SNC causa daño a nivel tisular y conductual.

Objetivos particulares

- 1) Evaluar *in vitro* la liberación de proteínas incluidas en HMC y en microesferas de PLGA .
- 2) Evaluar *in vitro* la liberación y actividad quimiotrópica de la sema 3A-FC incluida en HMC y microesferas de PLGA sobre neuronas de ganglio de la raíz dorsal y neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo embrionario.
- 3) Evaluar la biocompatibilidad de HMC previamente caracterizados *in vitro* al ser implantados en la zona del estriado de ratas Wistar adultas.

VI- MATERIAL Y MÉTODOS

1- Liberación de proteínas incluidas en HMC y microesferas de PLGA

1.1- Liberación de proteínas en un medio acuoso

La liberación de proteína a partir de HMC o microesferas de PLGA incluidos en un medio acuoso se evaluó utilizando como proteína de referencia a la albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés), y como medio acuoso una solución de buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

Para la elaboración de los HMC, se preparó una solución de metilcelulosa (MC) (grado GMP) (Colorcon, Pennsylvania, EUA) al 2% y al 5% en PBS 1X, y se verificó su

capacidad termorreversible mediante la incubación a 37°C de gotas de 20 µl de estas soluciones, se incubó a diferentes tiempos, y mediante la inversión de las gotas se verificó su estado gelificado. Para evaluar la liberación de proteína a partir de los HMC se preparó una solución de BSA (stock 1.5 mg/ml en agua destilada) en MC (5% en PBS1X). Se colocaron gotas de 2µl en cajas de cultivo de 24 pozos, se incubaron a 37°C por 1h para permitir la gelificación y al término de este tiempo se agregó PBS 1X a cada una de las muestras. Posteriormente se evaluó la liberación de la proteína tomando muestras de diferentes tiempos: 1, 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 192, 216, 240, 336 y 360 horas, todo se llevo a cabo por triplicado y se midió a 280nm la concentración de la proteína en el espectrofotómetro NanoDrop.

Para la evaluación de la liberación en microesferas de PLGA, se encapsuló BSA en microesferas utilizando la técnica de doble emulsión; para ello se mezcló 50mg del copolímero de ácido láctico y ácido glicólico 50:50 (grado GMP) (Purasorb PDLG 5002A, Purac biomaterials, Dusseldorf, Germany), con 1.25mL de cloruro de metileno y 250mL de BSA (1.05mg/mL); para realizar la primera emulsión, esta se agitó en vortex por 1min, y se añadió a una solución de alcohol polivinílico al 2% en agua destilada, para formar la doble emulsión (O/W/O), y se agitó por 30min. Posteriormente se evaporó el cloruro de metileno mediante la agitación a baja velocidad durante 3h. Al término de este tiempo se centrifugó la muestra para recobrar las microesferas de PLGA a 2000rpm por 5min, se retiró el sobrenadante y se le realizaron lavados mediante la adición de 5mL de agua destilada estéril seguido de centrifugación a 2000rpm durante 5min, este procedimiento se realizó 4 veces. Finalmente las microesferas de PLGA se secaron y concentraron en el SpeedVac a -55°C por 2 hr (NEU-TEC, Savant, EUA).

Para evaluar la eficiencia de encapsulación de BSA en las microesferas de PLGA elaboradas, se disolvieron 10mg de microesferas de PLGA en una solución de DMSO y ácido clorhídrico 0.05M, después de 1h de incubación a temperatura ambiente se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante, se midió se midió a 280nm la concentración de proteína en el espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 Thermo NanoDrop, Wilmington, EUA). Se calculó la eficiencia de encapsulación de la siguiente manera:

$$\% \text{ de eficiencia de encapsulación} = \left(\frac{\text{Proteína recuperada de microesferas}}{\text{Proteína introducida en microesferas}} \right) \times 100$$

Para cuantificar la liberación de BSA, se añadieron 5mg de las microesferas de PLGA en un volumen de 250 μ L de PBS 1X y se incubó a los mismos tiempos que los HMC y además a 480 y 720 horas, se tomó una muestra de 150 μ l del PBS para cada tiempo. La albúmina obtenida en cada muestra recolectada se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop. Cada una de las muestras fue independiente y se elaboró por triplicado.

1.2- Liberación de proteínas en una matriz tridimensional

Para evaluar la liberación de proteína a partir de HMC o microesferas de PLGA en una matriz tridimensional, se utilizaron geles de colágena y se evaluó la formación de un gradiente de concentración de la proteína liberada. Como proteína de referencia se utilizó inmunoglobulina acoplada al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen, Oregon, EUA). Para evaluar la liberación a partir de HMC se mezcló la inmunoglobulina a una concentración final de 0.016mg/mL con una solución de HMC al 5%; se colocó una gota de 2 μ L de la solución en cada pozo de una placa de cultivo celular de 24 pozos, y se incubó a 37°C por 1h, posteriormente se agregó una solución de colágena (30 μ L) para cubrir la gota del HMC previamente gelificada y se dejó incubando nuevamente a 37°C por 45min para polimerizar la colágena.

En el caso de las microesferas de PLGA, las inmunoglobulinas fluorescentes se encapsularon utilizando la técnica de doble emulsión previamente descrita, posteriormente se inyectaron directamente en la colágena ya gelificada 2 μ L de una solución de 10mg/ml de microesferas diluidas en PBS 1X; se empleó este volumen de microesferas debido a que fue la cantidad adecuada para poder detectar la liberación del fluoróforo mediante microscopía.

En ambos casos se tomaron una serie de micrografías tanto en microscopía de epifluorescencia como en contraste de fase (Microscopio de Epifluorescencia Nikon Eclipse E-600, Japón) que abarcaron todo el diámetro del gel para cada uno de los diferentes tiempos: 0, 1, 3, 12, 24, 48, 72 y 96 horas para HMC, y 0, 24, 48, 72, 192, 268 y 408 horas para microesferas de PLGA. Se realizó la reconstrucción de los geles utilizando tanto las imágenes de epifluorescencia como de contraste de fases utilizando Photoshop CS2 (Adobe Systems Incorporated, McLean, VA, EUA), y posteriormente se evaluó en cada reconstrucción el desplazamiento del fluoróforo de la siguiente manera: Se tomó como el punto más alto en fluorescencia la parte central del hidrogel o del cúmulo de microesferas (punto A), y se midió la intensidad de fluorescencia a lo largo de una línea trazada desde el punto A hasta la zona más distal del gel de colágena o punto B (fig 1). La intensidad de la señal fluorescente se obtuvo mediante la densidad óptica de la imagen a diferentes puntos a lo largo del área seleccionada, utilizando el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Maryland, EUA).

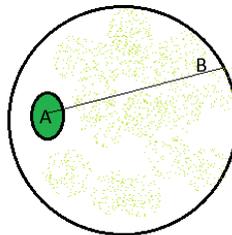


Figura 1. Medición de la difusión de la fluorescencia de inmunoglobulina acoplada al fluoróforo Alexa 488. El punto A es el punto más alto en fluorescencia la parte central del hidrogel o del cúmulo de microesferas y el punto B es la zona más distal del gel de colágena.

2- Evaluación *in vitro* de la liberación y actividad de la sema 3A-FC incluida en hidrogeles o microesferas

Se utilizaron dos ensayos para evaluar la liberación y bioactividad de la sema 3A-FC: La respuesta de colapso de conos de crecimiento de neuronas de ganglios de la raíz dorsal y la respuesta de inducción de la proyección axonal de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas embrionarias. Todos los procedimientos con animales fueron autorizados por el Comité de Bioética de Animales del Instituto de Neurobiología de la UNAM

2.1- Obtención de ganglios de la raíz dorsal (GRD)

Se obtuvieron embriones de 14.5 días de desarrollo procedentes de ratas Wistar, los cuales se colocaron en una solución Ringer y se mantuvieron en hielo hasta su disección. Se realizó la obtención de los ganglios disecando al embrión por la parte dorsal hasta acceder a la cadena de ganglios que corren a lo largo de la médula espinal, se cortó la unión entre los ganglios dorsales y los ventrales, se tomó cada ganglio dorsal con pinzas de relojero y se colocaron en un tubo cónico con solución Ringer. Posteriormente se centrifugaron a 1000rpm por 3min, se retiró la solución Ringer, se agregó una mezcla de tripsina-EDTA 0.25 % (Gibco, Invitrogen. Auckland, Nueva Zelanda) (2mL por aproximadamente 160 ganglios) previamente calentada a 37°C. Se incubó a 37°C por 10 minutos para realizar la disgregación enzimática del tejido; se agregaron 5 mL de medio de cultivo GRD y se realizó la disgregación mecánica de las células mediante la resuspensión con una pipeta pasteur. Se centrifugó a 1000rpm x 3min, se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo GRD, se resuspendió una vez con pipeta serológica y tres veces con pipeta pasteur y posterior a esto se centrifugó nuevamente a 1000rpm por 3min. Se retiró el sobrenadante, se añadieron los mililitros necesarios para resuspender el botón de células y se adicionó factor de crecimiento nervioso (NGF) (Invitrogen. Auckland, Nueva Zelanda) a una concentración final de 100ng/mL. Se sembraron en cubreobjetos y se incubaron a 37°C, 5% CO₂.

2.2- Obtención de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral (MV)

Se obtuvieron embriones de 14.5 días de desarrollo procedentes de ratas Wistar, los cuales se colocaron en una solución Ringer y se mantuvieron en hielo. Para cada embrión se obtuvo el tubo neural y se disectó la porción ventral del mesencéfalo el cual se colocó en un tubo Falcon con una solución salina de Hank's (Gibco, Invitrogen. Auckland, Nueva Zelanda). Posteriormente se centrifugaron los tubos cónicos a 1000 rpm por 3 min, se retiró la solución Hank's, se agregó una mezcla de tripsina-EDTA 0.25% previamente calentada a 37°C y 10µL de DNAsa. Se incubó a 37°C por 12 min, se agregó 5 mL de medio de cultivo MV y se resuspendió dos veces con una pipeta pasteur. Se centrifugó a 1000 rpm x 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo MV, se resuspendió tres veces con pipeta pasteur y posterior se centrifugó nuevamente a 1000 rpm x 3 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadieron los mililitros necesarios de medio de cultivo MV para resuspender el botón de células y adicionarlos a la mezcla de colágena; se colocaron gotas de 30µL sobre el gel de metilcelulosa previamente polimerizado, se dejó polimerizar 45min y se adicionó medio de cultivo MV.

2.3- Liberación *in vitro* y actividad quimiotrópica de la sema 3A-FC incluida en hidrogeles de metilcelulosa

La sema 3A-FC (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) fue mezclada con una solución de HMC al 5%/PBS 1X a una concentración de 0.5µg/mL, se colocaron 2 µL de esta solución en cada pozo (caja de 24 pozos) para la evaluación de las MV, o en cubreobjetos de vidrio para el caso de las GRD, las placas se incubaron a 37°C por 1h para gelificar el hidrogel, al término de este tiempo se adicionó sobre el HMC una suspensión de colágena (Invitrogen, Oregon, EUA) conteniendo las neuronas MV, o el medio de cultivo conteniendo las neuronas del GRD. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 12, 24 y 48h, y se fijaron los cultivos con paraformaldehído (PFA) 3.5% al término de cada tiempo; se realizó triplicado para cada tiempo evaluado.

El efecto de la sema 3A-FC liberada a las 12, 24 y 48 h de incubación se evaluó mediante la medición de los axones de las neuronas de MV o de GRD. Para identificar los axones en las neuronas de GRD se utilizó una tinción de faloidina (Invitrogen, Oregon, EUA) acoplada al fluoróforo rodamina que identifica F-Actina, y para las neuronas de MV se identificó específicamente a las neuronas dopaminérgicas mediante una inmunotinción usando el anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa (Pel-Freez, Arkansas, EUA) y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA). Se obtuvieron micrografías por medio de microscopía confocal (Nikon Eclipse E600 módulo PCM 2000, Japón) y se midieron los axones utilizando el programa Image Pro Plus. Cada una de las muestras es independiente y se elaboraron por triplicado.

2.3.1- Inmunotinción de neuronas dopaminérgicas

Los cultivos de neuronas MV previamente fijados se lavaron con PBS 1X 3 veces, se bloquearon con suero de cabra 5%/PBS 1X por 30min, seguido de un lavado con PBS 1X; se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti- tirosina hidroxilasa, al término de ese tiempo se realizaron lavados con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 488. Los cultivos inmunoteñidos se montaron en portaobjetos utilizando una solución de DABCO-Glicerol (SIGMA, St. Louis, Missouri, EUA).

2.3.2- Detección de neuritas mediante faloidina rodaminada:

Los cultivos de neuronas GRD previamente fijados se lavaron con PBS 1X 3 veces, se incubaron por 30min con faloidina rodaminada y al término de ese tiempo se lavaron nuevamente con PBS 1X. Los cultivos teñidos se montaron en portaobjetos utilizando una solución de DABCO-Glicerol.

3. Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad de las microesferas de PLGA

Para evaluar el efecto de los productos de degradación de microesferas en cultivos de neuronas MV, se realizaron 12 cultivos de neuronas de MV de la manera antes mencionada, de los cuales se hicieron 4 grupos: 1) sin microesferas 2) con 2 μ L de microesferas (10mg/mL) inyectadas en el gel de colágena con neuronas MV e incubados por 24h, 3) con 2 μ L de microesferas (10mg/mL) inyectadas en el gel de colágena con neuronas MV e incubado por 48h y 4) sin microesferas y con una porción 1:1 de medio de cultivo:etanol (control positivo). A estos cultivos se les hizo una prueba de citotoxicidad utilizando calceína-AM/ homodímero de etidio-1 (EthD-1) (Live/Dead Viability Kit, Invitrogen, Molecular Probes; Oregon, EUA). El principio de este kit se basa en la actividad intracelular de la esterasa, la cual determina la conversión enzimática de la calceína-AM—no fluorescente y permeable a una calceína polianiónica verde fluorescente la cual es retenida por las células vivas; y el homodímero de etidio-1 el cual entra en las células muertas con membrana dañada y al unirse a los ácidos nucleicos emite una fluorescencia de color rojo.

Se observaron en el microscopio de fluorescencia las células vivas (verde) y las muertas (rojo). Se tomaron micrografías de 10 campos de cada uno de los cultivos con el microscopio de epifluorescencia y se cuantificaron las células con el programa Image J (Image processing and analysis in java, National Institutes of Health, Maryland, Washington EUA); para cada grupo se realizó triplicado.

4. Evaluación *in vivo* de la biocompatibilidad.

4.1 Implante de HMC en el estriado

Se seleccionaron dos ensayos, en el ensayo uno se utilizaron 4 grupos de ratas Wistar macho de 250g (n=5) y en el ensayo dos se hicieron 5 grupos de ratas Wistar macho de 250g (n=4) del bioterio del Instituto de Neurobiología, en ambos ensayos se realizaron los siguientes grupos: el grupo 1 se sacrificó a la semana post-implante, al grupo 2 a las 2 semanas post-implante, al grupo 3 a las 4 semanas post-implante, el grupo 4 a las 8

semanas post-implante y el grupo 5 control se sacrifico a las ocho semanas. Para implantar los HMC los animales se anestesiaron utilizando una mezcla de ketamina 70mg/Kg e hidrocloreuro de xilazina 6mg/Kg (Cheminova de México, Villa Guerrero, México), una vez anestesiado se les afeitó la cabeza con una rasuradora eléctrica, iniciando entre los ojos de la rata hasta donde termina la cabeza, y se colocaron en el marco estereotáxico. A continuación se les hizo una incisión en el cuero cabelludo y se limpió el cráneo con peróxido, el cual nos permite buscar las suturas craneales bregma y lambda. Se localizó y marcó el estriado en ambos hemisferio con las siguientes coordenadas: AP +1, L \pm 2.6, V -5.5 (Paxinos y Watson, 2007); con un taladro se hizo un trépano en la región marcada, en el hemisferio control se introdujo una cánula la cual inyectó 5 μ L de solución salina estéril y en el hemisferio tratado se inyectó 2 μ L de una solución de HMC 5% o una solución de HMC 5%/dextran-FITC con una jeringa Hamilton estéril de 10 μ L con una aguja calibre de 26S (0.47mm de diámetro externo).

En el ensayo 1 se les hizo un depósito de solución salina en el hemisferio izquierdo y HMC al 5%/dextrán acoplado a fluoresceína (dextrán-FITC) en el hemisferio derecho, y en el ensayo 2 se hicieron 4 grupos a los cuales se les hizo un depósito de solución salina en el hemisferio izquierdo y HMC al 5% en el hemisferio derecho. Ambos ensayos tuvieron un grupo control el cual recibió depósitos de solución salina bilateralmente.

4.2- Evaluación de consumo de alimento

Tres días después de la cirugía estereotáxica, se les registró diariamente el agua y comida consumidas, así como el peso hasta el día de su sacrificio.

4.3- Coordinación motora

A los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, se les entrenó 3 días antes de su sacrificio; en una prueba de coordinación motora usando un cilindro giratorio, Rotorod (IITC Life Science Inc, Roto-R-D, series 8, Los Angeles, California, EUA). Primero se les colocó en la rueda

sin movimiento durante 1 minuto, posteriormente durante tres días se les entrenó a una aceleración de 4 a 20 rpm por 60 segundos hasta que todos los animales terminaran la prueba en al menos una ocasión. Después de entrenarlos se les realizó la prueba de coordinación el día de su sacrificio con excepción del grupo 5, en la fase oscura del ciclo luz /oscuridad (12-12h) y a la misma hora a todos, se registró el tiempo que tardaron en caer y la velocidad a la que cayeron; los parámetros programados en el aparato fueron los siguientes:

Tiempo total 240 segundos
 Velocidad inicial 10 rpm
 Velocidad final 45 rpm
 Aceleración 45 rpm en 180 segundos

4.4- Evaluación neurológica

Se les realizó una evaluación neurológica a los cinco grupos antes de ser sacrificados, de la siguiente manera:

4.4.1- Evaluación general:

	Observaciones				
Peso(g)					
Apariencia :	Ojos	Pelaje	Cola	Nariz	Patas

4.4.2- Evaluación Sensorial

	Observaciones	
Orientación de vibras	Tocar vibras con un objeto plástico y registrar la orientación de la rata hacia el objeto de plástico.	
Olfato	Observar la respuesta ante un estímulo irritante con xilol.	Observar la respuesta ante un

		estímulo no irritante con agua.
Estímulo suave en el cuerpo de la rata	Presión momentánea en tres superficies de cada lado del cuerpo de la rata: costillas, articulaciones superiores de la pata traseras y delanteras, registrándose la orientación del animal.	
Estímulo afilado en el cuerpo	Picar momentáneamente a la rata en cuatro superficies de cada lado de su cuerpo (articulaciones superiores de la pata traseras y delanteras, costillas y abdomen) registrándose la orientación de la rata al estímulo.	
Tono muscular	Manipular individualmente las cuatro extremidades, para evaluar su resistencia a la flexión pasiva.	
Comportamiento en campo abierto	Colocar a la rata en una mesa durante un minuto y registra los movimientos de cabeza hacia los lados, hacia arriba y abajo	

Para obtener la calificación de esta evaluación, se suman los puntos obtenidos en los diferentes parámetros evaluados siendo la calificación máxima esperada para una rata normal de 10 puntos.

4.5- Evaluación motora

	Observaciones	
Postura general (Sobre una mesa)	0: Postura normal 1: Mandíbula sobre la superficie de la mesa	

	2: Arco exagerado en la pata	
Orientación de las extremidades (se sujeta al animal por la cola durante 5seg)	<p>Patatas anteriores:</p> <p>0: Si la rata estira las estira adelante</p> <p>1: si se desvían hacia atrás más de 45°</p> <p>2: Si se desvían más de 90°</p> <p>3 Si se desvían más de 135°</p> <p>4: Si se quedan flexionadas al cuerpo</p>	<p>Patatas posteriores:</p> <p>0: Si se orientan hacia fuera</p> <p>1: Punto por cada 15° que se desvíen de la postura normal con un puntaje máximo de 3.</p> <p>4:Si permanecieron flexionadas al cuerpo</p>
Colocación de las extremidades en una superficie plana. (Se sujeta al animal de la cola y se acerca lentamente a la superficie de la mesa)	<p>0: Si la rata extiende las patas anteriores hacia la superficie de la mesa antes de tocarla.</p> <p>1: Si no extiende las patas, pero las extiende al acercarse a la superficie cuando sus vibrisas tocan la mesa.</p> <p>2: No extienden sus patas hacia la mesa</p>	

La calificación de la valoración máxima esperada para una rata control es de 11 puntos (Deckel et al., 1986 y Dunnett et al., 1987).

4.6- Actividad locomotora espontánea

Se evaluó a los 5 grupos durante la fase oscura del ciclo luz /oscuridad, usando un sistema de monitoreo de la actividad animal ya estandarizado, este ensayo se hizo un día antes de que los animales fueran sacrificados. Los animales se depositaron durante 2:30h en la caja de acrílico transparente rodeado por dos niveles de sensores infrarrojos que detectan el movimiento del animal y envían la información a un sistema de cómputo VersaMAX (AccuScan Instruments, Columbus, Ohio, EUA); tomando los primeros 30min

como el tiempo de aclimatación. Los movimientos que registra y cuantifica el sistema son los siguientes:

- Actividad horizontal (AH): número total de interrupciones en el sensor horizontal en un tiempo de muestreo determinado.
- Distancia total recorrida (DT): indica la distancia recorrida en cm por el animal en un tiempo de muestreo determinado.
- Número de movimientos (NM): número de movimientos horizontales realizados por la rata en un tiempo de muestreo determinado. Los movimientos individuales están separados uno de otro por un periodo de reposo de al menos un segundo.
- Actividad vertical (AV): número total de interrupciones en el sensor vertical registradas en un tiempo de muestreo determinado.
- Número de movimientos verticales (NMV): número de incorporaciones que el animal realiza en un tiempo de muestreo determinado. El animal debe de estar por lo menos un segundo debajo del sensor vertical antes de registrarse la siguiente incorporación.
- Tiempo en movimiento (TM): es el tiempo (seg) que el animal esta en actividad ambulatoria durante un periodo de tiempo determinado.
- Tiempo de descanso (TD): es la diferencia entre el tiempo de muestreo y el tiempo que pasa la rata en movimiento.
- Tiempo vertical (TV): es el tiempo (seg) que el animal se encuentra obstruyendo el sensor vertical al incorporarse, de esta manera la variable empieza a incrementar y continua incrementando hasta que el animal está debajo del sensor vertical.
- Cuentas estereotipadas (CE): número de veces que el animal interrumpe repetidamente el mismo sensor durante actividad estereotipada.
- Número de esterotipias (NE): número de veces que el sistema observa comportamiento estereotipado en el animal. Un espacio de 1seg o más se requiere para separar un episodio estereotipado del siguiente.
- Tiempo de estereotipia (TE): la cantidad total de tiempo (seg) en el que se observa el comportamiento estereotipado.
- Distancia del margen (DM): la distancia en cm que el animal recorre en el margen o esquina de la caja.

- Tiempo en el margen (TM): El tiempo (seg) que el animal pasa en la proximidad de un centímetro de las paredes de la caja.
- Distancia recorrida en el centro de la caja (DC): distancia (CM) que el animal recorre mientras está en el centro de la caja (no en los márgenes o esquinas).
- Tiempo recorrido en el centro de la caja (TC): es el tiempo (seg) que el animal pasa lejos de las paredes de la caja (centro de la caja).

De los cuales se analizaron para este trabajo: la actividad horizontal, la distancia total, el número de movimientos, la actividad vertical y el número de estereotipias.

4.7- Evaluación histológica

Cada grupo fue sacrificado a los tiempos antes mencionados. Previo a la perfusión los animales recibieron una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (>50mg/kg) y se perfundieron a través de un catéter insertado en el ventrículo izquierdo, primero con solución salina y después con una solución de PFA al 4%. Después de la perfusión los animales se decapitaron, se extrajeron los cerebros, y se fijaron con PFA al 4% durante 4h; posteriormente se pusieron en una solución de sacarosa al 10%/ PBS1X durante 24hr, después en una solución de sacarosa al 20%/ PBS1X durante 24hr y finalmente en una solución de sacarosa al 30%/PBS1X durante 3 días. Posteriormente de cada cerebro se obtuvieron 5 series de cortes coronales de 50µm cada una en el microtomo Leica SM 2000r de congelación (Leica microsystem, Heidelberg, Germany) y se recolectaron en una solución anticongelante con excepción de una serie que se colocó en PBS 1X. De cerebros obtenidos de los animales del ensayo dos se obtuvieron 3 series de cortes coronales de 30µm y se recolectaron en una solución anticongelante. Estos se almacenaron a 5°C hasta que se analizaron por inmunohistoquímica.

Del ensayo uno se tomó una serie de cortes, se montó en portaobjetos con DABCO/Glicerol y se les tomaron micrografías en microscopía de fluorescencia para ubicar el lugar donde se había colocado el depósito de la metilcelulosa 5%/Dextran-FITC.

A la serie del ensayo uno que se colocó en PBS 1X, se le realizó una tinción de violeta de cresilo para observar la histología del tejido. Los cortes de esta serie se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar por 4 días; posteriormente se pasaron por un tren de soluciones: cloroformo absoluto 30min, etanol al 25% 2min, violeta de cresilo (0.25g/100ml de etanol al 25%) 7min, etanol al 50% 1min, etanol al 70% 5min, solución diferenciadora (300ml de etanol al 70% con 10 gotas de ácido acético) 30seg, etanol al 95% 1min, etanol absoluto 30seg, etanol:xilol 2min y xilol 2min; posteriormente se cubrieron con una resina (Permount, Fisher Scientific, New Jersey, EUA) y cubreobjetos y se dejaron secar por 5 días. Se observaron en un microscopio óptico (Leica- DMLB, Houston, Texas, EUA).

Las tres series del ensayo dos se procesaron para inmunohistoquímica, se les realizaron seis lavados cada uno de 10min con KPBS al 0.05M, se incubó con H₂O₂ al 0.3% por 15min, se realizaron 3 lavados de 10min cada uno con KPBS al 0.05M, posteriormente se dejaron incubando con el anticuerpo primario a 4°C durante 48h, al término de este tiempo se realizaron 6 lavados cada uno por 10min con KPBS al 0.05M, se incubó con el anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente, se realizaron 5 lavados con KPBS al 0.05M, se incubó con el kit ABC (Vector laboratorios, Burlingame, California, EUA) durante 1h, se hicieron 3 lavados de 5min con KPBS al 0.05M, luego 3 lavados de 5min con acetato de sodio 0.175M, se incubó con 3,3'-Diaminobenzidina (SIGMA, St. Louis, Missouri, EUA) por 20min, al concluir el tiempo se hicieron 3 lavados de 5min con acetato de sodio 0.175M y posteriormente 3 lavados de 5min con KPBS al 0.05M. Los anticuerpos empleados fueron los siguientes:

Anticuerpo primario (concentración)	Población celular identificada	Anticuerpo secundario
anti-GFAP hecho en conejo (1:3500) (DAKO, Glostrup, Dinamarca)	Astroцитos	Anti-IgG (H+L) de conejo- biotinilado (Vector laboratorios, Burlingame, California, EUA)

anti-iba 1 hecho en burro (1:1500) (Abcam, Cambridge, Massachusetts, EUA)	Microglía activada	Anti-IgG (H+L) de burro- biotinilado (Jackson inmunoresearch laboratorios, Pennsylvania, EUA)
anti-CD68 (clona ED1) hecho en ratón (1:2000) (Serotec, Hercules, California, EUA)	Macrófagos activados	Anti-ratón- IgG (H+L) de ratón- biotinilado (Vector laboratorios, Burlingame, California, EUA)

Posteriormente, se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar por 4 días, al término de este tiempo se pasaron por un tren de deshidratación: etanol al 70% 5min, etanol al 95% 5min, etanol al 100% 10min, etanol al 100% 10min, xileno 10min y xileno 10min; se adicionó permount para montarlas y se dejaron secando por 5 días y al término de este tiempo se adquirió una serie de micrografías con un microscopio óptico.

Se cuantificó el número de células inmunoteñidas con anti-CD68 y anti-Iba1, presentes entre el límite del cuerpo calloso y el final del núcleo intersticial de la extremidad posterior de la comisura anterior, en el corte donde se encontraba la lesión (fig. 2). Debido a la densidad celular presente en los cortes teñidos para anti-GFAP, se calculó la densidad óptica en vez del conteo celular, abarcando la región antes mencionada.

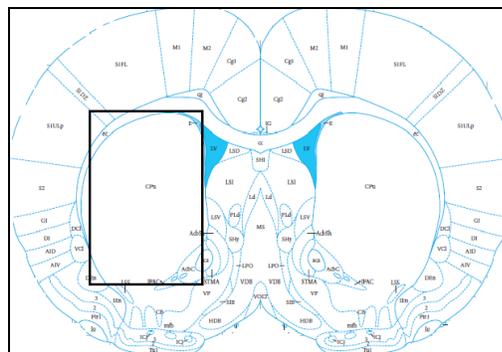


Figura 2. Esquema de la región que se cuantificó en cada corte inmunoteñido. La región que se cuantificó fue entre el límite del cuerpo calloso y el final del núcleo intersticial de la extremidad posterior de la comisura anterior.

4.8- Análisis estadístico

Para comparar los grupos tratados con los grupos control se usó estadística no paramétrica (U de Mann-Whitney) o paramétrica (t-student) dependiendo de si cumplían o no con los criterios requeridos. Se consideró como significativa una probabilidad menor a 0.05. Para realizar estos análisis se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (Graph pad, La Jolla, California, EUA).

VII- RESULTADOS

1- Elaboración y caracterización de los hidrogeles de metilcelulosa

Se elaboraron dos soluciones de HMC, al 2% y 5% en PBS1X y se observó a qué temperatura gelificaban. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la solución de HMC al 5% gelificó a los 45min a una temperatura de 37°C, mientras que la solución de HMC al 2% gelificó a las 2h a una temperatura de 49°C. Se consideró que la solución al 5% es la adecuada ya que su gelificación se lleva a cabo a temperatura corporal. Se comprobó además que la viscosidad de la solución de HMC al 5% antes de ser gelificada fuera fácilmente extruída de una jeringa Hamilton de 10µL con un calibre de 26S, la cual sería utilizada para implantar el hidrogel en el estriado utilizando cirugía estereotáxica.

2- Elaboración y caracterización de microesferas de PLGA.

Se elaboraron microesferas de PLGA según el método de doble emulsión y se incluyó como proteína de referencia BSA como se describe en la sección de materiales y métodos. Para evaluar la eficiencia de encapsulación de BSA se disolvieron 10mg de microesferas de PLGA en una solución de DMSO (Dimetil sulfóxido) y ácido clorhídrico, se incubó durante 1h a temperatura ambiente, se centrifugó y se obtuvo el sobrenadante, se midió la concentración en el NanoDrop. Se calculó la eficiencia de encapsulación de la siguiente manera:

$$\% \text{ de eficiencia de encapsulación} = \left(\frac{\text{Proteína recuperada de microesferas}}{\text{Proteína introducida en microesferas}} \right) \times 100$$

Se obtuvo una eficiencia de encapsulación de BSA de 58.6%. Para caracterizar la morfología y tamaño de las microesferas de PLGA obtenidas, se tomaron una serie de micrografías (fig. 3) de 4 diferentes lotes de microesferas de PLGA cargadas con una inmunoglobulina acoplada al fluoróforo Alexa 488 y se midió el diámetro de las microesferas mediante el programa Image Pro Plus, obteniéndose un valor de diámetro promedio de $64.63 \pm 22.96 \mu\text{m}$.

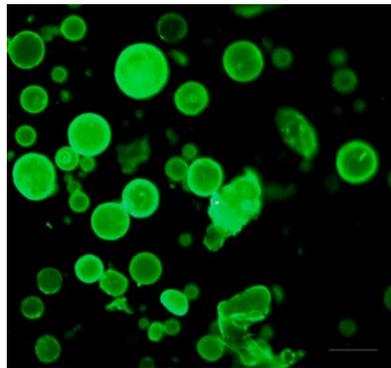


Figura 3. Micrografía de microesferas de PLGA a 10X, cargadas con una inmunoglobulina acoplada al fluoróforo Alexa 488. Barra de calibración de $100 \mu\text{m}$.

3- Liberación en PBS de albúmina bovina incluida en HMC o en microesferas de PLGA

Al cuantificar la liberación de proteína (BSA) incluida en los HMC o en microesferas de PLGA y obtener la curva de liberación en un lapso de 360 h para los HMC y de 720 h para las microesferas de PLGA, se observó que los HMC tiene una liberación rápida de la proteína en comparación con las microesferas de PLGA. El porcentaje de proteína liberada en HMC alcanza el $39.42\% \pm 6.97$ a las 360 h (fig. 4) mientras que en el mismo lapso de tiempo se liberó solamente el $13.2\% \pm 1.3$ de BSA de las microesferas de PLGA (fig. 5). En el caso de las microesferas de PLGA se observó una primera liberación a tiempo 0 de $9.4\% \pm 1.4$ que probablemente corresponde a un remanente de la proteína no encapsulada y que permanece en la superficie. En los HMC

se observó una liberación de tipo pulsátil que decrece a las 40h y nuevamente aumenta a las 96h hasta alcanzar su punto máximo a las 360h (fig. 5)

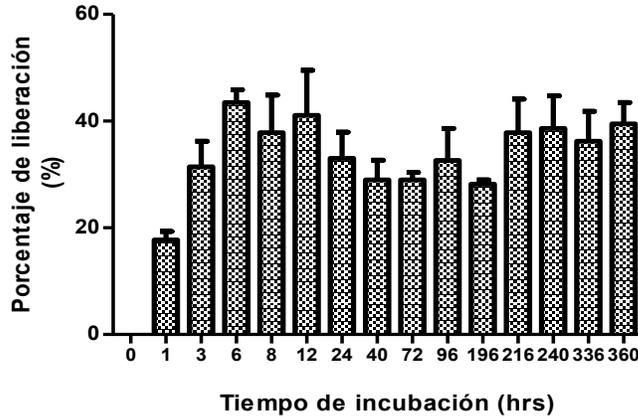


Figura 4. Porcentaje de liberación en PBS de albúmina bovina incluida en HMC. La mezcla de la albúmina bovina con los HMC se polimerizó y se incubó en PBS1X a diferentes tiempos. La difusión de BSA se cuantificó en el NanoDrop. En la gráfica se muestra el porcentaje de liberación de BSA incluida en los hidrogeles a los distintos tiempos evaluados. Cada barra representa un experimento independiente y el promedio de tres mediciones.

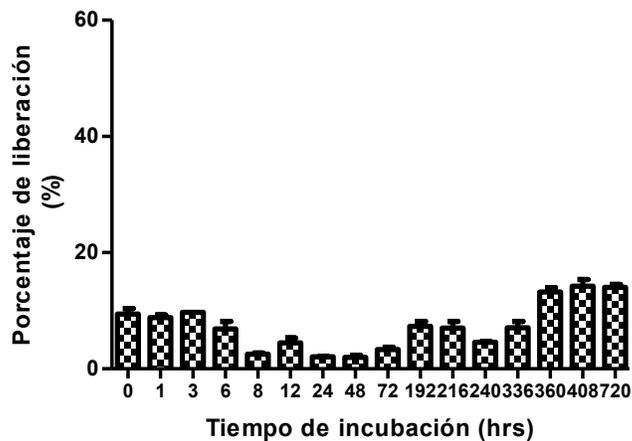


Figura 5. Porcentaje de liberación en PBS de BSA encapsulada en microesferas de PLGA. La BSA encapsulada se incubó en PBS1X a diferentes tiempos. La liberación de BSA se cuantificó en el NanoDrop. En la gráfica se muestra el porcentaje de liberación de BSA a los distintos tiempos evaluados. Cada barra representa el promedio de tres mediciones de experimentos independientes y el promedio de tres mediciones.

4- Formación de gradientes de concentración de inmunoglobulina fluorescente incluida en HMC o microesferas de PLGA en una matriz tridimensional de colágena.

Se observó la presencia de un gradiente de concentración de la proteína fluorescente Alexa 488 liberada a partir de HMC. La rápida liberación de proteínas a partir de los hidrogeles permitió observar la formación del gradiente desde el tiempo 0 (40 minutos posterior a la polimerización de la colágena). A las 24h se observó la presencia de aproximadamente el 52% de la fluorescencia a una distancia de 350 μ m, que corresponde a la mitad del diámetro total del gel de colágena, y en el punto más distante del gel se observó un 16% de fluorescencia (fig 6. E); tendiendo a aumentar con el paso del tiempo; de manera que a las 96h (fig 6.G) se observó el 55% de la fluorescencia a una distancia de 350 μ m y en el punto más distante del gel el 26%.

En el caso de las microesferas de PLGA, observamos una pobre difusión de la proteína fluorescente en comparación con los HMC (fig 7), observamos que la difusión en las primeras 24h es del 5% a una distancia de 350 μ m del sitio de inyección de las microesferas (fig 7. B), observando en este tiempo un pico máximo de liberación del 11.7% a una distancia de 100 μ m y a las 408h de solo el 16% a la misma distancia, mostrando señal fluorescente del 6.6% en el punto más distal del gel, (fig. 7. F), lo que denota que la distancia de difusión y de formación del gradiente formado fue pequeña, y prácticamente ausente en la parte más distal del gel, debiéndose probablemente a la lenta liberación de la proteína a partir de las microesferas de PLGA y a una pobre difusión en la matriz de colágena.

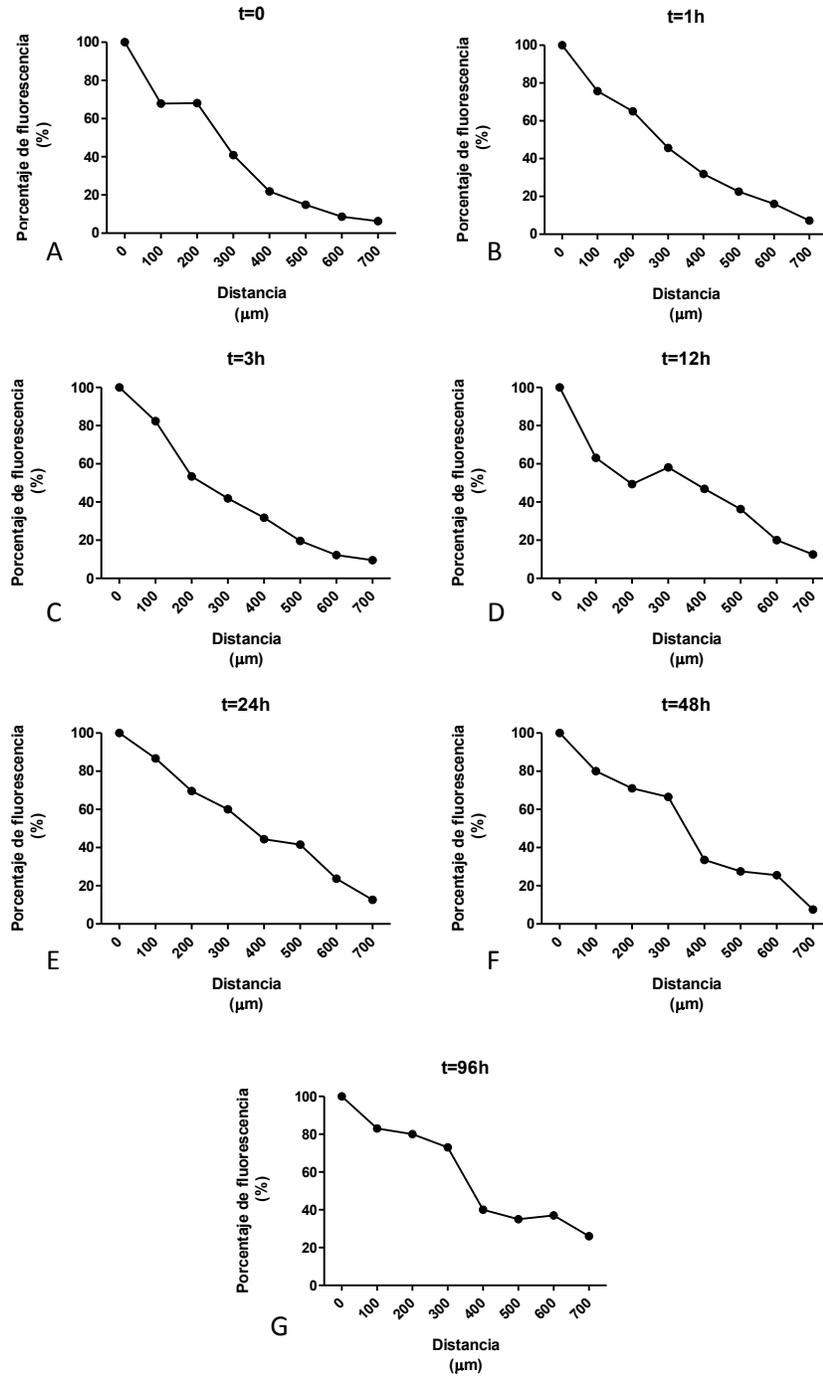


Figura 6. Porcentaje de difusión en geles de colágena de inmunoglobulinas acopladas al fluoróforo Alexa 488 incluidas en HMC. La mezcla de las inmunoglobulinas fluorescentes con HMC se polimerizó y se incluyó en una matriz de colágena. La difusión de la fluorescencia se registró en un microscopio de epifluorescencia y se midió la intensidad de señal fluorescente en pixeles a lo largo de los geles a diferentes tiempos; en las gráficas se muestra el porcentaje de difusión de la fluorescencia a lo largo de la matriz de colágena tomando como 100% la fluorescencia observada en el centro de los hidrogel para cada tiempo observado.

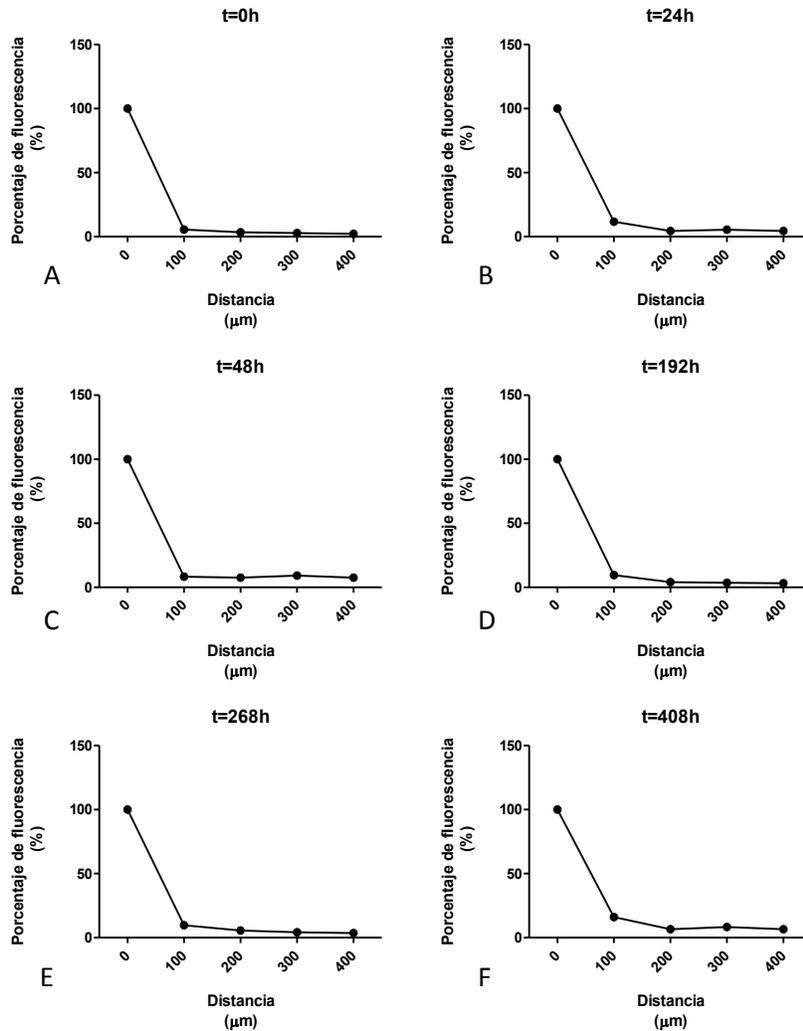


Figura 7. Porcentaje de difusión en colágena de las inmunoglobulinas acopladas al fluoróforo Alexa 488 incluidas en microesferas de PLGA. microesferas de PLGA conteniendo las inmunoglobulinas fluorescentes se inyectaron en una matriz de colágena. La difusión de la señal fluorescente se registró en un microscopio de epifluorescencia y se midió la intensidad de señal fluorescente en pixeles a lo largo de los geles a diferentes tiempos. En las gráficas se muestra el porcentaje de difusión de la señal fluorescente a lo largo del gel de colágena, tomando como 100% la fluorescencia observada en el centro del cúmulo de microesferas.

5- Efecto de sema 3A-FC, liberada a partir de HMC, sobre neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral.

Previamente se había mostrado el efecto quimioatractivo de sema 3A-FC a una concentración de 0.2μg/ml y 0.5μg/ml sobre neuronas dopaminérgicas obtenidas de mesencéfalo ventral embrionario (Tamariz et al., 2010 y Tamariz et al., 2011), por lo que

se evaluó si la liberación de 0.5µg/ml de sema 3A-FC incluida en hidrogeles (HMC-sema 3A-FC) mantenía el efecto de quimiotracción. Al medir la distancia de elongación de axones de neuronas MV expuestas a HMC-sema 3A-FC; se observó un mayor crecimiento en los axones a las 12h de incubación (fig 8. A-C y J) en comparación con los cultivos expuesto solamente al HMC ($t=4.554$, $gl=2$, $p<0.05$); a las 24h de incubación el cultivo control (sin HMC) presentó una menor elongación axonal al compararlo con los cultivos expuestos al HMC y a los expuestos a HMC-sema 3A-FC ($t=2.935$, $gl=2$, $p<0.05$ y $t=4.151$, $gl=2$, $p<0.05$) (fig 8. D-F y K). El crecimiento de los axones de las neuronas MV fue menor a las 48h en todas las condiciones e incluso no se apreció el efecto de la sema 3A-FC, lo que se atribuye probablemente a que el cultivo ya no se encontraba en buenas condiciones y los axones habían iniciado una etapa de retracción.

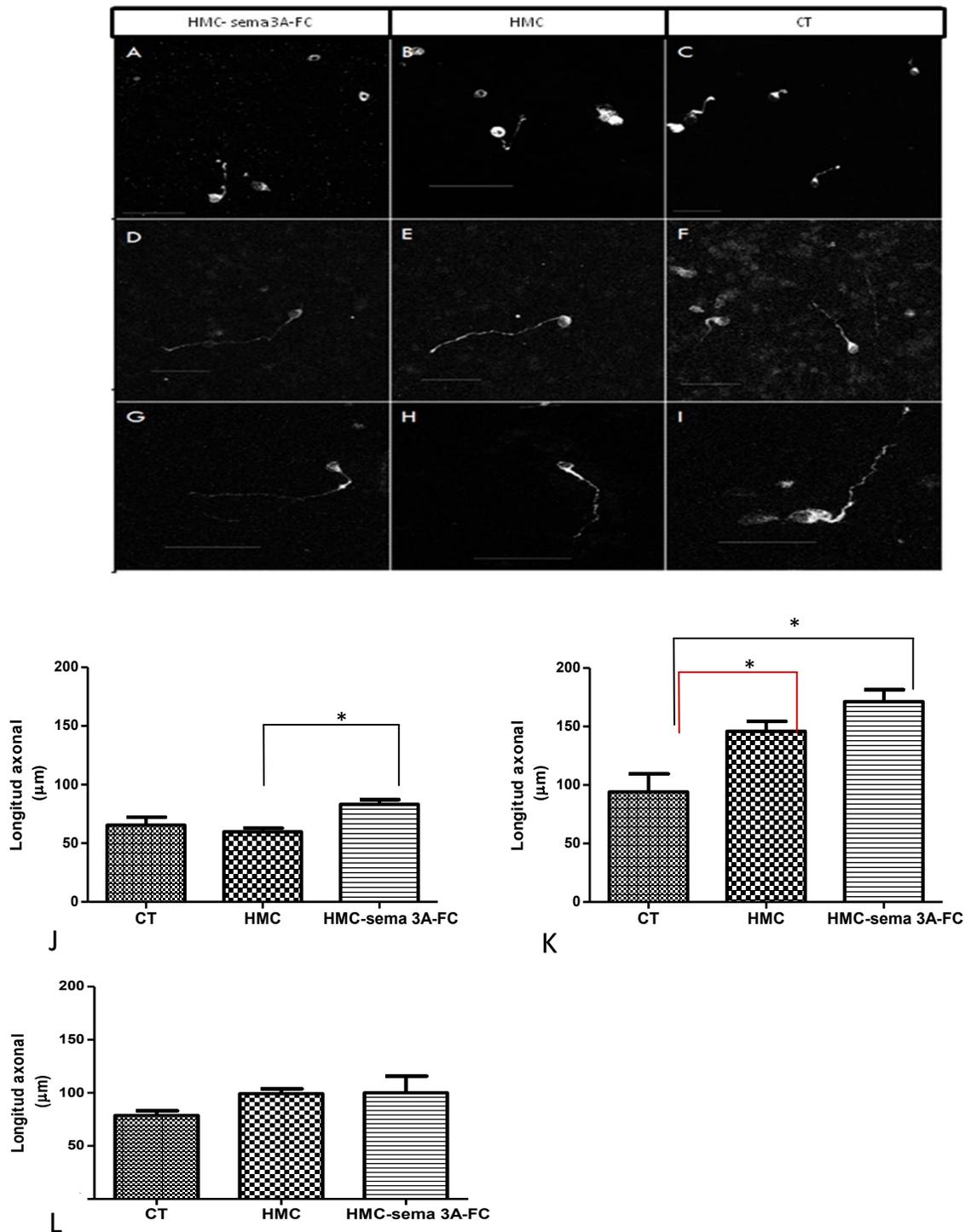


Figura 8. Efecto de sema 3A-FC incluida en HMC, sobre la elongación de axones de neuronas MV. Los MV obtenidos de embriones de E-14.5, disgregados y expuestos a la mezcla de HMC y sema 3A-FC (HMC-sema 3A-FC), o HMC o sin hidrogel de metilcelulosa (CT). Estos se cultivaron a diferentes tiempos: 12h (A, B, C y J), 24h (D, E, F y K) y 48h (G, H, I y L) y se cuantificó la longitud de los axones dopaminérgicos inmunoteñidos contra hidroxilasa de tirosina (A-I). (* $p < 0.05$, $n = 3$, t Student). Barras de calibración = $50 \mu\text{m}$.

6- Efecto de la sema 3A-FC liberada a partir de HMC en neuronas de ganglios de la raíz dorsal.

El efecto quimiorrepelente de sema 3A-FC sobre neuronas GRD ha sido ampliamente caracterizado (Luo Y et al 1993; Brown y Bridgman. 2009 y Brown et al. 2009), por lo que se evaluó si la inclusión de sema 3A-FC incluida en hidrogeles mantiene su actividad repelente para estas neuronas. Al comparar la distancia de elongación de axones de GRD se observaron diferencias significativas entre HMC- sema 3A-FC y CT y HMC sin sema 3A, a las 24 h (CT vs HMC-sema 3A-FC, $t=4.4096$, $gl=2$, $p<0.05$ y HMC vs HMC-sema 3A-FC, $t=5.530$, $gl=2$, $p<0.05$) y 48h (CT vs HMC-sema 3A-FC, $t=9.907$, $gl=2$, $p<0.05$ y HMC vs H MC- sema 3A-, $t=4.513$, $gl=2$, $p<0.05$); (fig 9-D, F, G, I, K y L).

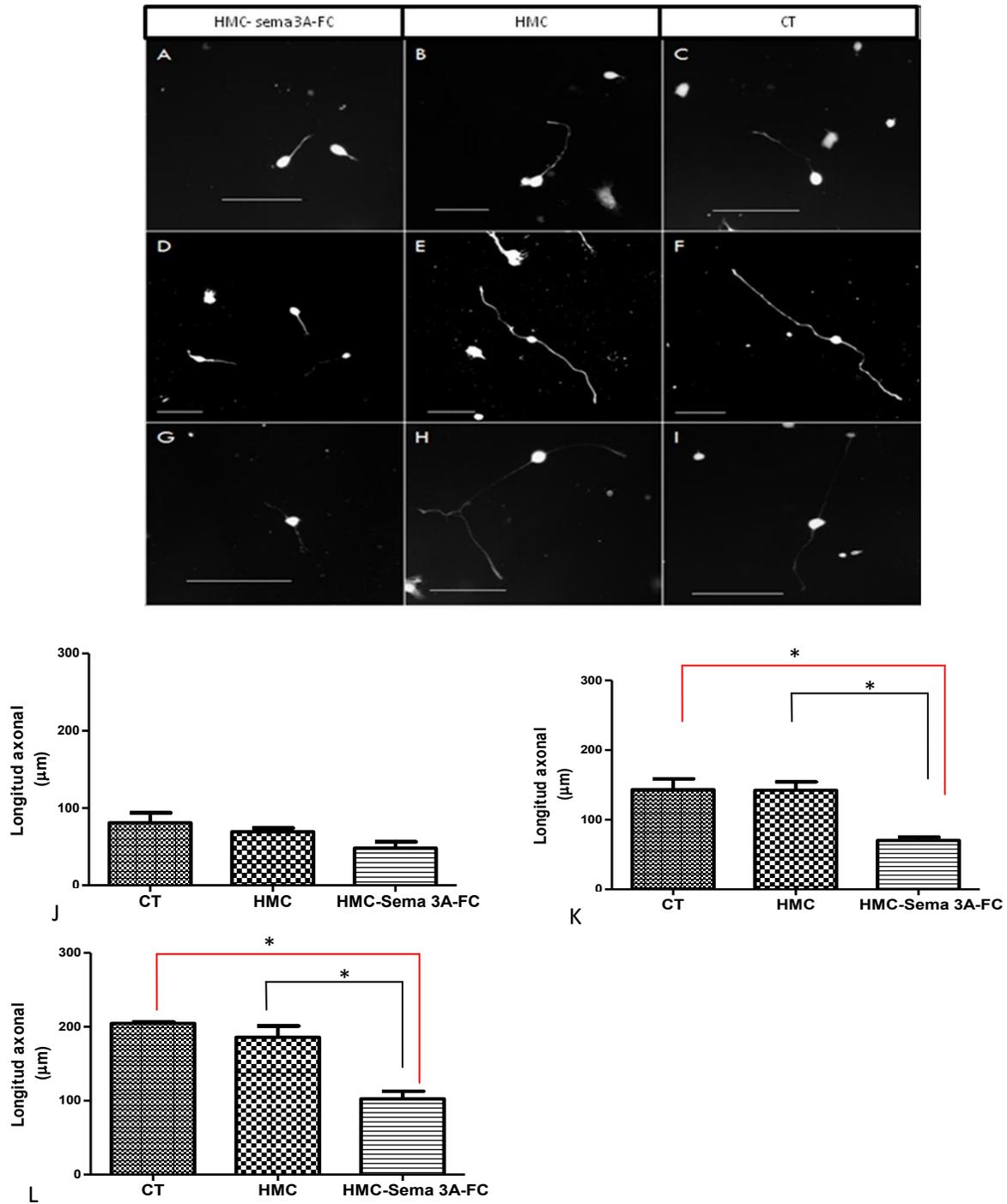


Figura 9. Efecto de sema 3A-FC incluida en el HMC, en axones de neuronas GRD. Los GRD obtenidos de embriones de E-14.5, fueron disgregados, cultivados y expuestos a la mezcla de metilcelulosa y sema 3A-FC (HMC-sema 3A-FC), como control negativo se emplearon cultivos de neuronas DRG expuestas a hidrogel de metilcelulosa (HMC) o sin hidrogel de metilcelulosa (CT) a diferentes tiempos: 12h (A, B, C y J), 24h (D, E, F y K) y 48h (G, H, I y L). Se tomaron micrografías y se observó que los axones de los cultivos expuestos a la sema 3A recombinante disminuyeron su longitud. (* $p < 0.05$, $n = 3$, t student). Barras de calibración = $100\mu\text{m}$.

7- Evaluación *in vitro* del empleo de microesferas de PLGA

7.1- Efecto de los productos de degradación de las microesferas de PLGA, en cultivos de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral

Previamente se ha reportado que la degradación de las microesferas de PLGA produce la acidificación del medio en el que se encuentran y por tanto puede tener efectos adversos tanto para las proteínas liberadas como para las células adyacentes (Raghavendra, 2007). Por lo anterior se evaluó si los productos de degradación de las microesferas de PLGA tenían efectos en la sobrevivencia de las neuronas MV. Observamos que los cultivos expuestos a las microesferas de PLGA y a sus productos de degradación por 24h muestran un 98% de células vivas y un 96% a las 48h, porcentajes muy semejantes a lo observado para los cultivos en ausencia de microesferas de PLGA; Se verificó la fiabilidad de esta prueba con el control positivo de muerte celular (1:1 etanol:medio de cultivo), con el cual se obtuvo un 92% de neuronas muertas a las 24h de incubación (fig 10)

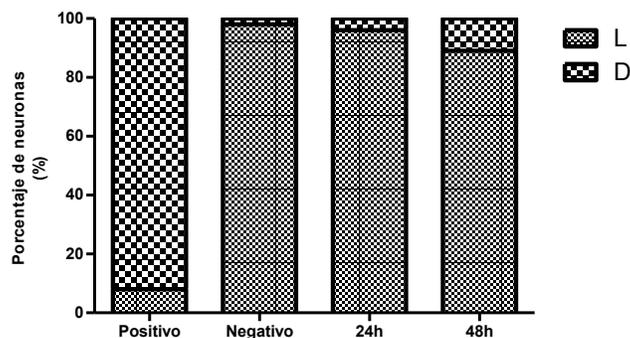


Figura 10. Efecto de productos de degradación de PLGA en cultivos de neuronas MV. Neuronas MV obtenidas de embriones de E-14.5, fueron cultivadas y expuestas a microesferas de PLGA por 24 y 48h. Teniendo como control positivo a un cultivo expuesto a etanol y como control negativo a un cultivo que no fue expuesto a las microesferas de PLGA. Se evaluó la muerte celular mediante la incorporación de etidio y la sobrevivencia por la incorporación de calceína. Se tomaron micrografías en los diferentes tiempos y se realizó una cuantificación de las neuronas vivas y las muertas. No se observó diferencia entre las neuronas expuestas a las microesferas de PLGA con las que no lo fueron. D=Muestras, L=Vivas. n=3

7.2- Efecto de diferentes concentraciones de sema 3A-FC sobre neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral.

Los resultados previos mostraron que la liberación de proteínas a partir de microesferas es muy baja alcanzando un máximo de 7.3% a las 192h, por lo que de acuerdo a la eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación, la cantidad de sema 3A-FC que sería factible liberar a partir de las microesferas obtenidas, utilizando el stock de sema 3A-FC de 50 µg/ml, es de 0.0224ng/ml; más de un orden de magnitud por debajo de la concentración que previamente se había probado como efectiva para inducir la elongación de los axones dopaminérgicos del MV. Por lo anterior se probó si concentraciones inferiores de sema 3A-FC tienen un efecto quimioatractivo. Observamos crecimiento significativamente mayor en los axones de las neuronas expuestas a las concentraciones de 2ng/mL y 0.5ng/mL de sema 3A-FC; (U=4.527, gl=2, p<0.05 y U=4.304, gl=2, p<0.05) en comparación con el cultivo sin sema 3A-FC. Las concentraciones de sema 3A-FC de 0.25ng/mL y 0.025ng/mL no favorecieron el elongamiento de los axones en comparación con el cultivo control (p > 0.05) y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el efecto de las concentraciones de 0.5ng/mL y 2ng/mL y las de 0.25ng/mL y 0.025ng/mL (fig 11). Estos resultados permiten concluir que una concentración menor a 0.5ng/mL no tendría efectos atractivos.

Lo anterior nos llevó a concluir que aunque las microesferas de PLGA liberan proteínas y sus productos de biodegradación no tiene un efecto deletéreo sobre la sobrevivencia de neuronas *in vitro*; la baja eficiencia de encapsulación y liberación, la ausencia de un gradiente de concentración en una matriz tridimensional; así como la cantidad de semaforina que de acuerdo a los modelos *in vitro* tendría que estar disponible para observar un efecto quimioatractivo *in vivo*, hace poco viable el uso de este sistema como vehículo para la liberación de semaforinas en el cerebro. Por lo que se descartó continuar con el análisis de su compatibilidad *in vivo*, y solamente se continuó con el estudio para los HMC.

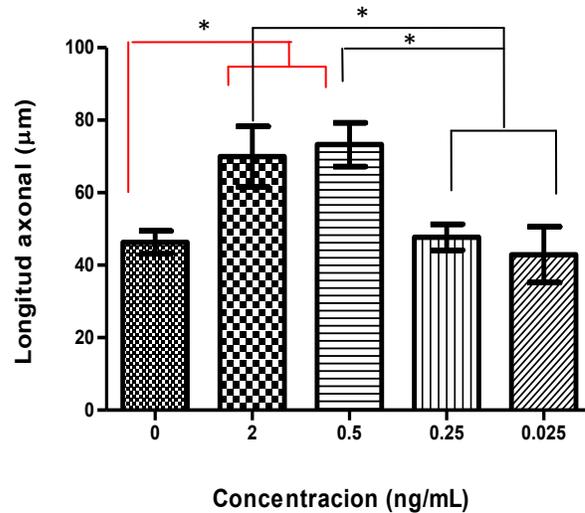


Figura 11. Efecto de sema 3A-FC en axones de neuronas MV obtenidas de embriones de E-14.5. Las células fueron disgregadas y expuestas a diferentes concentraciones de sema 3A-FC. Se cuantificó la longitud de los axones y se observó que los axones de los cultivos expuestos a la sema 3A-FC en una concentración de 2ng/mL y 0.5 ng/mL, aumentaron su longitud en comparación con el control y las concentraciones de 0.25 ng/mL y 0.025ng/mL (* $p < 0.05$, $n = 3$, U de Mann-Whitney).

8. Evaluación de la biocompatibilidad de los HMC *in vivo*

8.1- Evaluación neurológica

Se evaluaron los grupos de ratas Wistar a las que se inyectó de manera bilateral en el estriado; en uno de los hemisferios se depositó de 2µL de HMC (hemisferio tratado) y en el otro hemisferio 5 µl de solución salina (hemisferio control). Previamente se había caracterizó que la inyección de 5 µl de solución salina en el estriado no tiene un efecto deletéreo. La evaluación neurológica se realizó antes de ser sacrificadas las ratas de la siguiente manera: ensayo 1: grupo 1 ($n = 4$) a la primera semana, grupo 2 ($n = 4$) a la segunda semana, grupo 3 ($n = 4$) a las cuarta semana y del ensayo 2 el grupo 4 ($n = 4$) a la octava semana. Como grupo control ($n = 4$) se inyectó de manera bilateral solución salina, y se evaluó a los mismos tiempos que los grupos tratados con HMC. Se observó que las ratas tratadas con el HMC no mostraron alteraciones neurológicas, ya que al hacer pruebas sensoriales y motoras obtuvieron un puntaje promedio de 10 en el grupo 1, 10.6 en el grupo 2, 10.5 en el grupo 3, 10.7 en el grupo 4 y 10.4 en las ratas control; siendo

10 o más el puntaje esperado para considerar que una rata no presenta alteraciones neurológicas (Rodríguez, 2002); (fig.12).

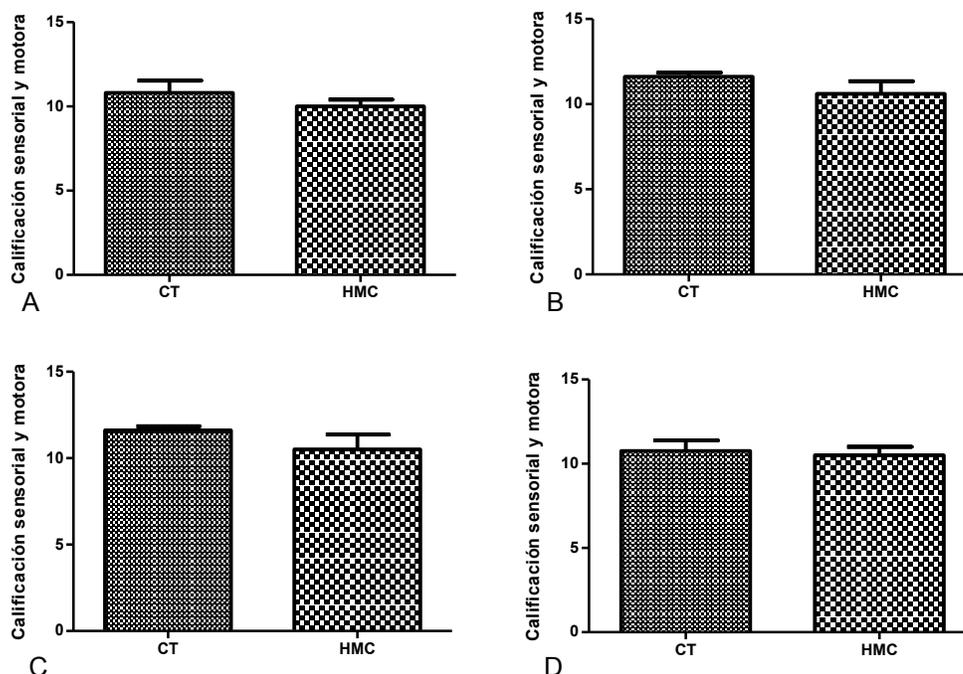


Figura 12. Evaluación sensorial y motora. En las gráficas se muestra el puntaje obtenido por los grupos tratados con el hidrogel de metilcelulosa (HMC) y controles(CT) en los distintos tiempos de análisis: una semana (A), dos semanas (B), cuatro semanas (C), ocho semanas (D); en la evaluación neurológica se muestra que no hay alteraciones neurológicas en ninguno de ellos.

8.2- Evaluación del consumo de alimento

Se analizó el consumo de agua y alimento en los grupos de ratas Wistar previamente descritos con la finalidad de asegurarnos de que no había una alteración del consumo del alimento. Como se muestra en la figura 13, se observó que en los grupos tratados de 1 semana y de 4 semanas, el consumo de agua es menor que en el grupo control, siendo significativa la diferencia, ($U=0$, $gl=2$, $p<0.05$ y $U=0$, $gl=2$, $p<0.05$); y en los de 2 semanas y 8 semanas no hay diferencia significativa al ser comparados con el grupo control ($p > 0.05$).

El consumo de alimento en los grupos tratados de una semana y dos semanas es mayor en comparación con el grupo control (figura 14), mostrando una diferencia significativa ($U=1$, $gl=2$, $p<0.05$ y $U=0.5$, $gl=2$, $p<0.05$); esto se correlaciona con el aumento de peso observado en las ratas de estos grupos en comparación con los grupo control ($U=0.5$ $gl=2$, $p<0.05$ y $U=2.5$, $gl=2$, $p<0.05$) (figura 15). En los grupos tratados de cuatro semanas y ocho semanas no se observan diferencias significativas entre los tratados y controles, ni en el consumo de alimento ni en el peso.

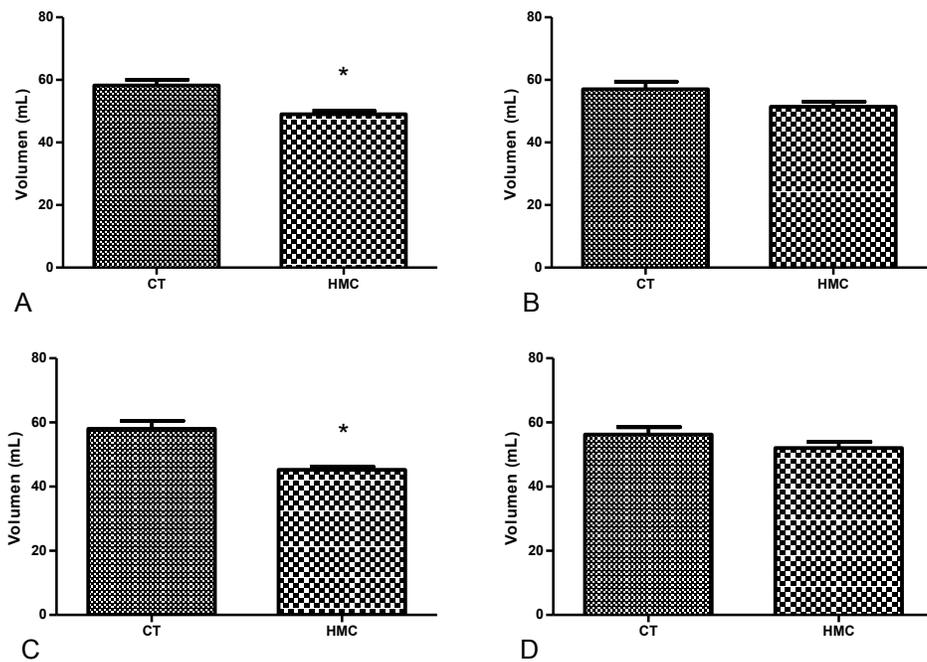


Figura 13. Promedio \pm EEM del volumen de consumo de agua. Se midió el volumen de agua consumido al día por rata, de cada uno de los grupos durante: una semana A), dos semanas (B), cuatro semanas (C), ocho semanas (D) (* $p<0.05$, indica diferencias significativas con el control de acuerdo con la prueba U de Mann Whitney) A y D $n=4$; B y C $n=5$,.

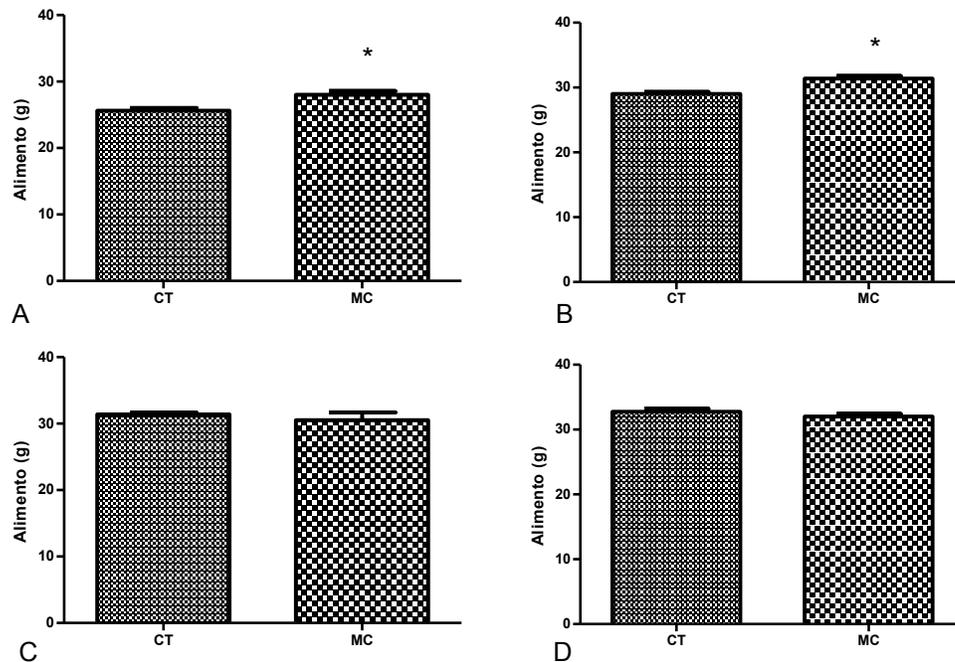


Figura 14. Promedio \pm EEM del peso del alimento consumido diariamente por rata en gramos, para cada uno de los grupos: una semana (A), dos semanas (B), cuatro semanas (C), ocho semanas (D) (* $p < 0.05$, indica diferencias significativas con el control de acuerdo con la prueba U de Mann Whitney) A y D $n=4$, B y C $n=5$.

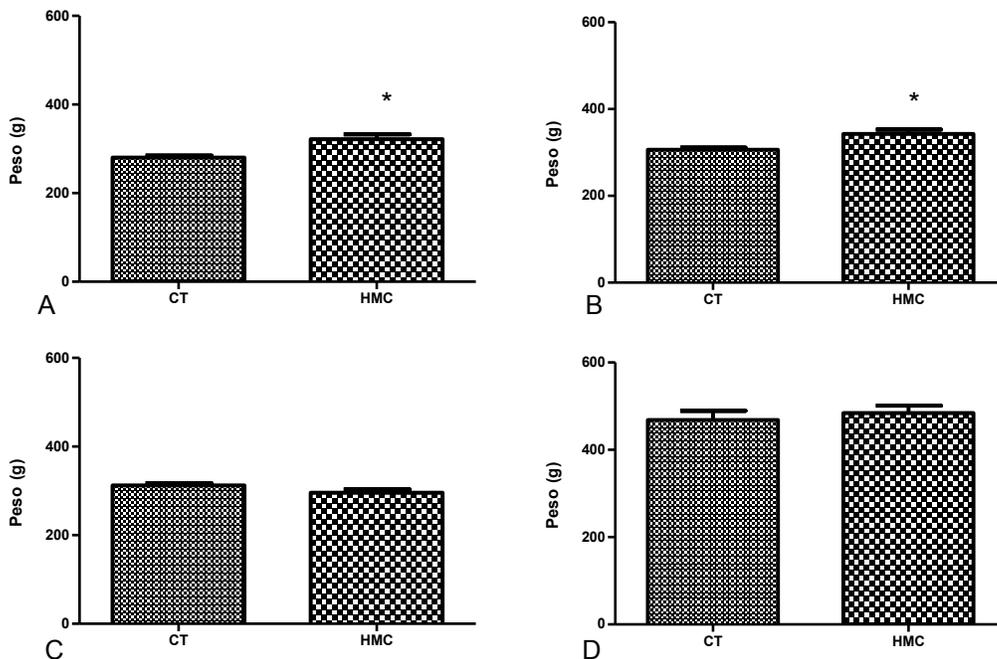


Figura 15. Promedio \pm EEM del peso corporal de las ratas en gramos. Se midió el peso de las ratas por día, de cada uno de los grupos: una semana (A), dos semanas (B), cuatro semanas (C), ocho semanas (D) (* $p < 0.05$, indica diferencias significativas con el control de acuerdo con la prueba U de Mann Whitney) A y D $n=4$, B y C $n=5$.

8.3- Coordinación motora

Al analizar la coordinación motora de los grupos tratados 1, 2, 4 y 8 semanas en comparación con el grupo control, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (figura 16).

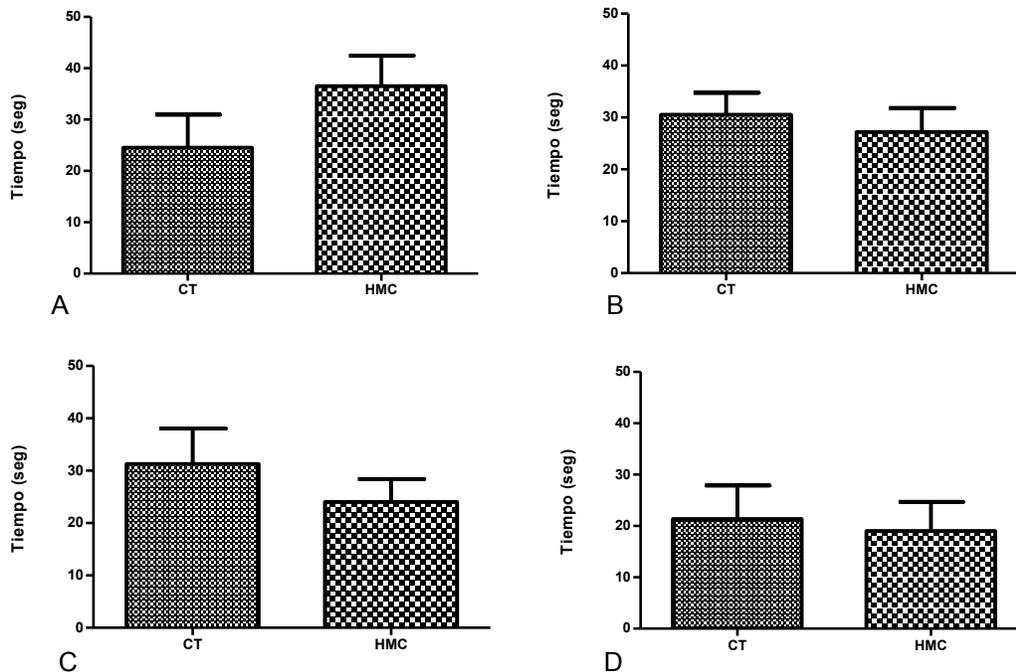


Figura 16. Coordinación motora registrada en el RotaRod. En las gráficas se muestra el promedio del tiempo (seg) \pm EEM de permanencia en el rodillo giratorio del RotaRod de los siguientes grupos: Una semana A), dos semanas (B), cuatro semanas (C), ocho semanas (D); ninguno mostró diferencia significativa al compararlo con el grupo control. Prueba estadística U de Mann Whitney) A y D $n=4$, B y C $n=5$.

8.4- Actividad locomotora

Se evaluó la conducta locomotora espontánea por un periodo de 150 minutos en cuatro ocasiones (una, dos, cuatro y ocho semanas). Observamos un efecto significativo de hiperactividad en los animales tratados con HMC, solo en la primer semana y en los siguiente parámetros: actividad horizontal ($t=2.994$, $gl=3$, $p < 0.05$), distancia total ($t=4.675$, $gl=3$, $p < 0.05$), y número de movimientos ($t=3.273$, $gl=3$, $p < 0.05$) (Fig.17). A las dos semanas hubo diferencia entre grupos en la actividad vertical ($t=2.664$, $gl=4$, $p < 0.05$)

(figura 18). A las cuatro y ocho semanas no observamos diferencias entre grupos experimentales y control (figuras 19 y 20).

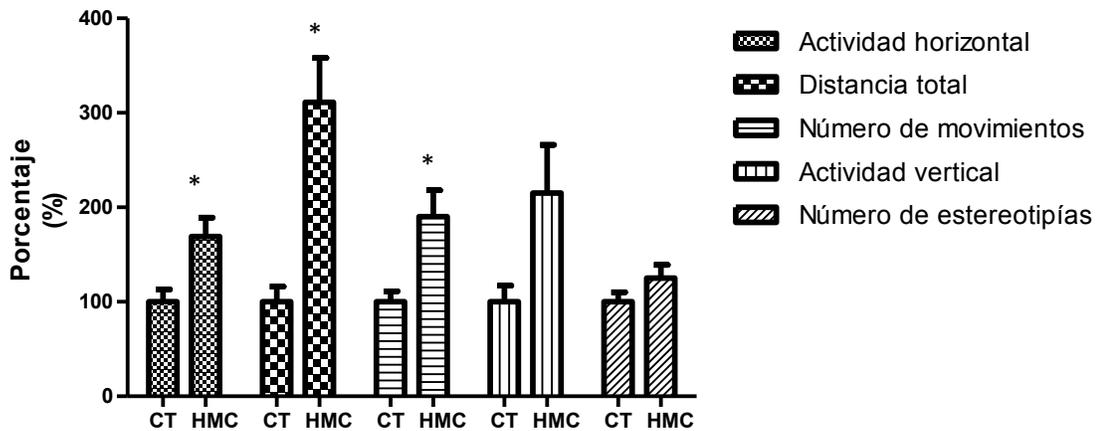


Figura 17. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora espontánea registrada en la primera semana expresada como porcentaje del grupo control. Se registró la actividad locomotora espontánea durante 150 minutos una semana después del implante de HMC (unilateral) en el grupo experimental y de solución salina bilateral en el estriado en el grupo control, Se evaluó: actividad horizontal, distancia total, número de movimientos, actividad vertical y número de estereotipias. En las gráficas se muestra el comportamiento de los grupos en cada uno de los parámetros (* $p < 0.05$, indica diferencias significativas entre los grupos, prueba estadística de t de student $n=4$).

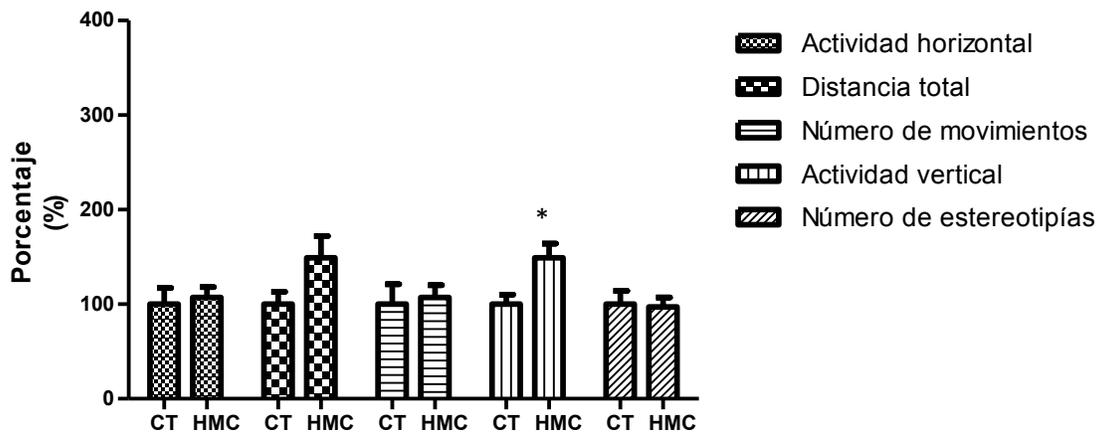


Figura 18. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora registrada en la segunda semana expresada como porcentaje del grupo control. Se registró la actividad locomotora espontánea durante 150min a las dos semanas después del implante de HMC (unilateral) en el grupo experimental y de solución salina bilateral en el estriado en el grupo control. Se evaluó: actividad horizontal, distancia total, número de movimientos, actividad vertical y número de estereotipias. En las gráficas se muestra el comportamiento de los grupos en cada uno de los parámetros (* $p < 0.05$, indica diferencias significativas entre los grupos prueba estadística de t de student $n=4$).

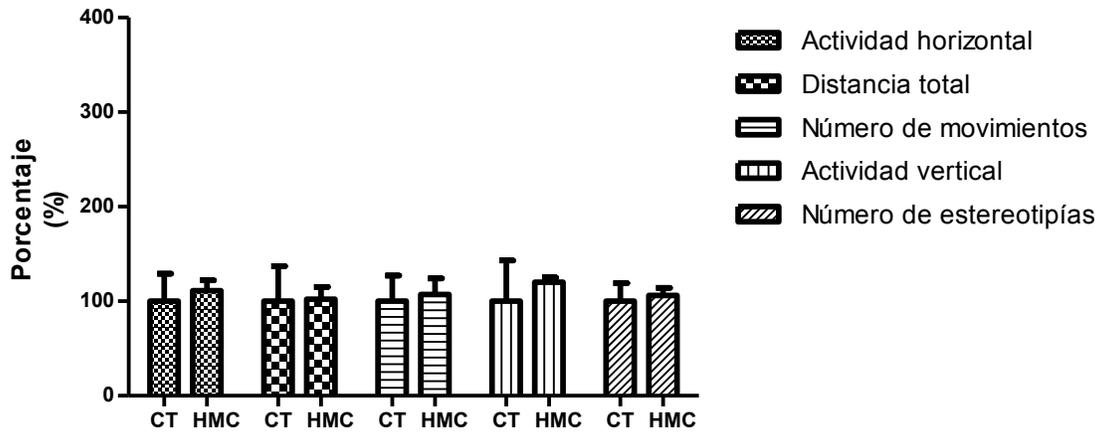


Figura 19. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora espontánea registrada en la cuarta semana expresada como porcentaje del grupo control. Se registró la actividad locomotora espontánea durante 150min a las cuatro semanas después del implante de HMC (unilateral) en el grupo experimental y de solución salina bilateral en el estriado en el grupo control. Se evaluó: actividad horizontal, distancia total, número de movimientos, actividad vertical y número de estereotipias. En las gráficas se muestra el comportamiento de los grupos en cada uno de los parámetros (* $p < 0.05$, indica diferencias significativas entre los grupos prueba estadística de t de student $n=4$).

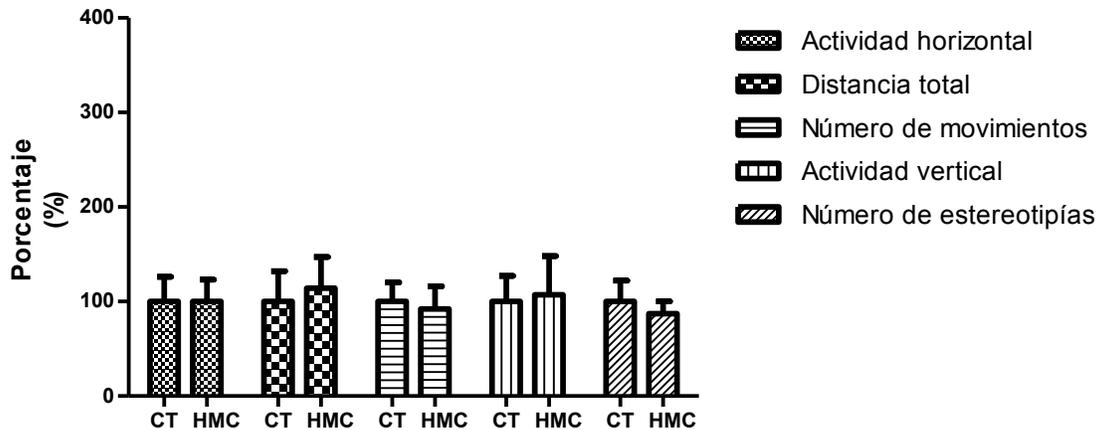


Figura 20. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora espontánea registrada en la octava semana expresada como porcentaje del grupo control. Se registró la actividad locomotora espontánea durante 150min a las ocho semanas después del implante de HMC (unilateral) en el grupo experimental y de solución salina bilateral en el estriado en el grupo control. Se evaluó: actividad horizontal, distancia total, número de movimientos, actividad vertical y número de estereotipias. En las gráficas se muestra el comportamiento de los grupos en cada uno de los parámetros. (* $p < 0.05$, indica diferencias significativas entre los grupos, prueba estadística de t de student $n=4$).

8.5- Evaluación histológica

Posterior a la evaluación conductual los animales fueron sacrificados el mismo día. Los animales fueron perfundidos y se obtuvo el cerebro, el cual se post fijó con PFA 4%, se criopreservó en sacarosa y se seccionó en el microtomo de congelación. Para el ensayo uno se usó una serie de cortes de 50µm para teñir con violeta de cresilo y otra serie para observar bajo el microscopio de epifluorescencia. Para el ensayo dos se usaron tres series de 30µm para detectar las proteínas GFAP, Iba-1 y CD68 con inmunohistoquímica. Los resultados se presentan en las siguientes secciones.

8.5.1- Tinción con violeta de cresilo

Mediante esta tinción se observó la citoarquitectura del estriado y si se modificó como resultado del depósito de HMC o de la inyección de solución salina. No se observó alteración evidente del parénquima en el tejidos control o en el tratado, solo se pudo apreciar la cicatriz correspondiente al sitio de entrada de la aguja con la que se realizó el depósito (fig 21, flechas rojas) se corroboró además que la aguja llegó a la región estriatal en ambos hemisferios (fig 21, A-F).

8.5.2- Identificación de la presencia del HMC en el estriado

Para confirmar la presencia del HMC, se observó mediante microscopía de fluorescencia la señal del dextrán acoplado a fluoresceína. En la figura 22 se observa a nivel de estriado la señal fluorescente siguiendo la trayectoria de entrada de la aguja lo que demuestra que se realizó el depósito de HMC/dextran-FITC (B, D y F), encontramos también la presencia de células fluorescentes lo cual indica la liberación e incorporación del dextran-FITC a las células adyacentes al sitio de depósito. En el hemisferio control (CT) no se aprecia señal fluorescente (A, C y E).

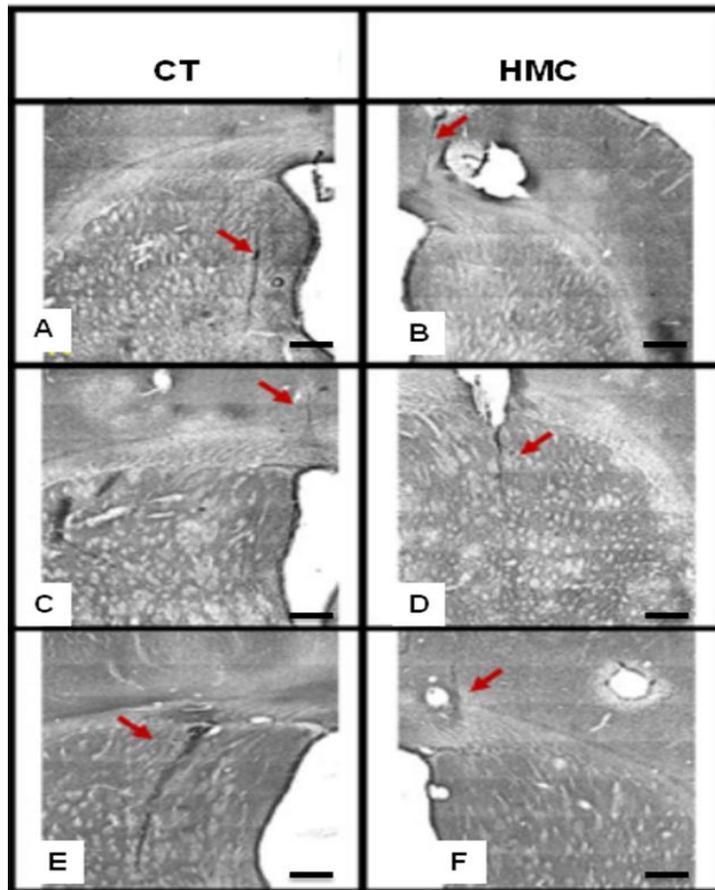


Figura 21. Implante en estriado. Micrografías de cortes coronales de 50 μm de grosor, después de hacer un depósito en el estriado con HMC/ dextrán-FITC en uno de los hemisferios y en el contralateral una inyección de solución salina, teñidos con Violeta de cresilo. Las microfotografías son ejemplo del tejido obtenido de los grupos: primera semana (A y B), segunda semana (C y D) y cuarta semana (E y F), se verificó que hubiera evidencia de la inyección y si había cambios en la citoarquitectura. La flecha roja indica la entrada de la aguja. Barra de calibración de 500 μm .

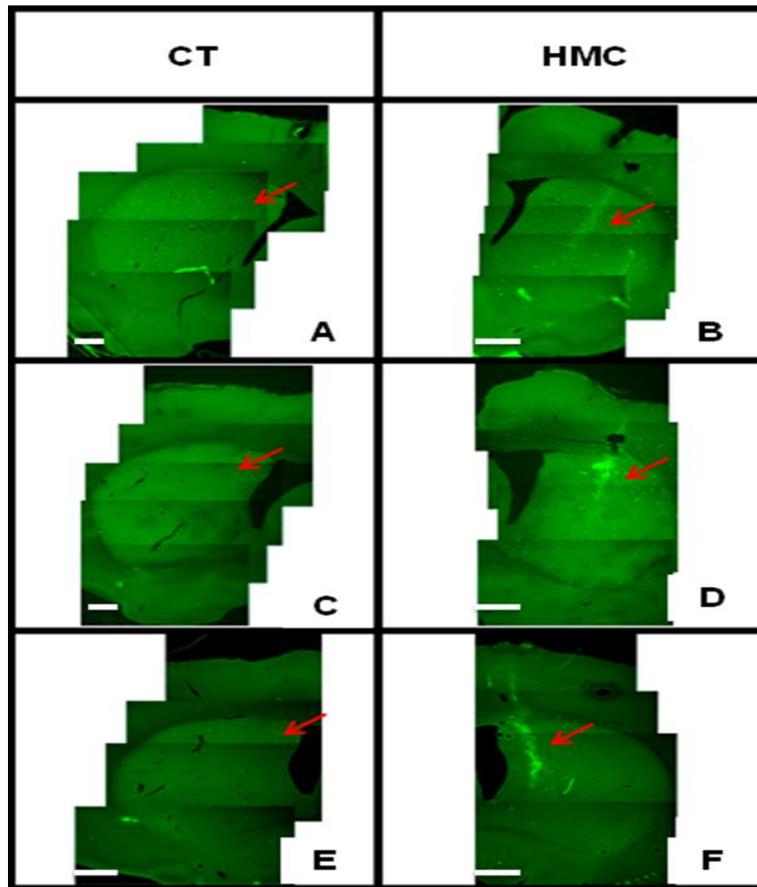


Figura 22. Presencia de dextrán-FITC en el estriado. Micrografías de cortes coronales a nivel de estriado de 50 μm de grosor, en los que se muestra la presencia de un depósito de HMC/ dextrán-FITC en uno de los hemisferios y en el contralateral una inyección de solución salina (CT). En los grupos: primera semana (A y B), segunda semana (C y D) y cuarta semana (E y F), se verificó el depósito del HMC mediante la observación en microscopía de fluorescencia. Objetivo de 4X. La flecha roja indica el sitio del implante de la HMC-dextran-FITC. Barra de calibración de 500 μm .

8.5.3- Análisis de la respuesta inflamatoria

Para analizar la respuesta inflamatoria se realizaron inmunohistoquímicas con el anticuerpo anti-CD68, que reconoce proteínas lisosomales de macrófagos y microglía activada ; anti-iba-1, que es una molécula adaptadora 1 unidora de calcio ionizado, y que es específica de microglía activada (Ohsawa et al. 2004); y anti-GFAP, que marca los filamentos intermedios de los astrocitos. De las inmunohistoquímicas realizadas se obtuvieron micrografías del sitio de la inyección utilizando el objetivo 10X de un microscopio óptico. A las imágenes obtenidas se les realizó el siguiente análisis:

8.5.3.1- Análisis cualitativo y cuantitativo de la respuesta inflamatoria

Las micrografías de los cortes inmunoteñidos con anti- CD68 mostraron la presencia de microglía fagocítica/macrófagos activados, con la típica morfología amorfa y sin proyecciones, en todos los días analizados, y siempre de manera adyacente a la herida (Fig. 23); por lo que la respuesta inflamatoria fue siempre localizada. Al cuantificar la microglía y macrófagos en la primera semana se observó la tendencia a un incremento de células inflamatorias en el hemisferio tratado, el cual no fue significativo al compararla con el hemisferio control (fig. 24 A, B y J); a las dos semanas disminuyó el número de microglía fagocítica/macrófagos tanto en el hemisferio control como en el hemisferio tratado (Fig. 24 C, D y J); la presencia de microglía fagocítica/macrófagos siguió disminuyendo a las cuatro y ocho semanas (fig. 24 E, F, G, H y J), en ninguno de los tiempos hubo una diferencia significativa entre el hemisferio control y el tratado. Tanto en el hemisferio tratado como hemisferio control se observó la resolución del proceso inflamatorio.

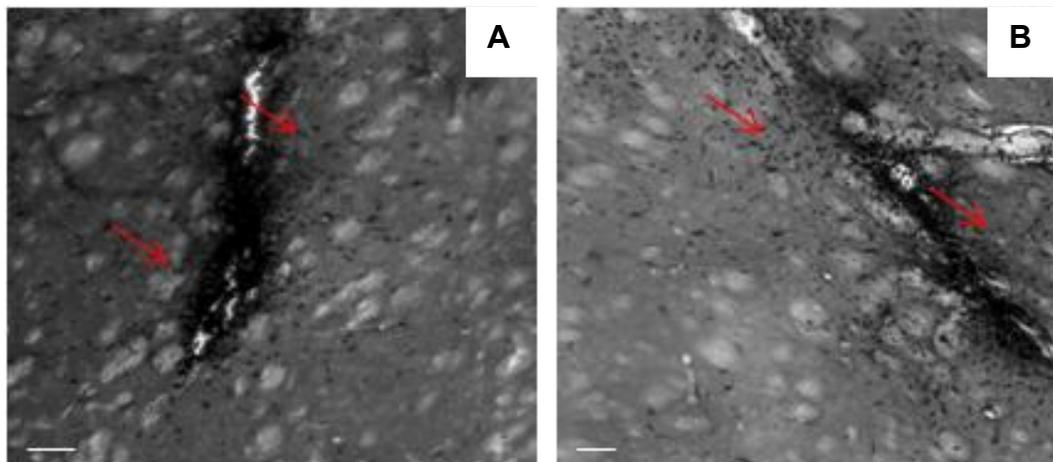


Figura 23. Micrografías de la respuesta inflamatoria de macrófagos y microglía activa. Micrografías de macrófagos y microglía activa en el estriado después de 1 semanas de tratamiento A) solución salina y B) HMC. Barra de calibración de 200 μ m

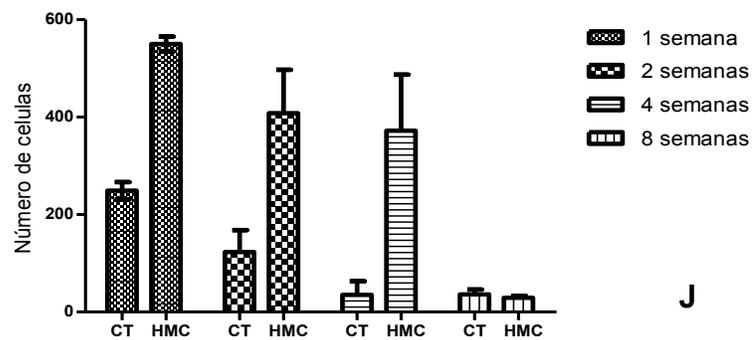
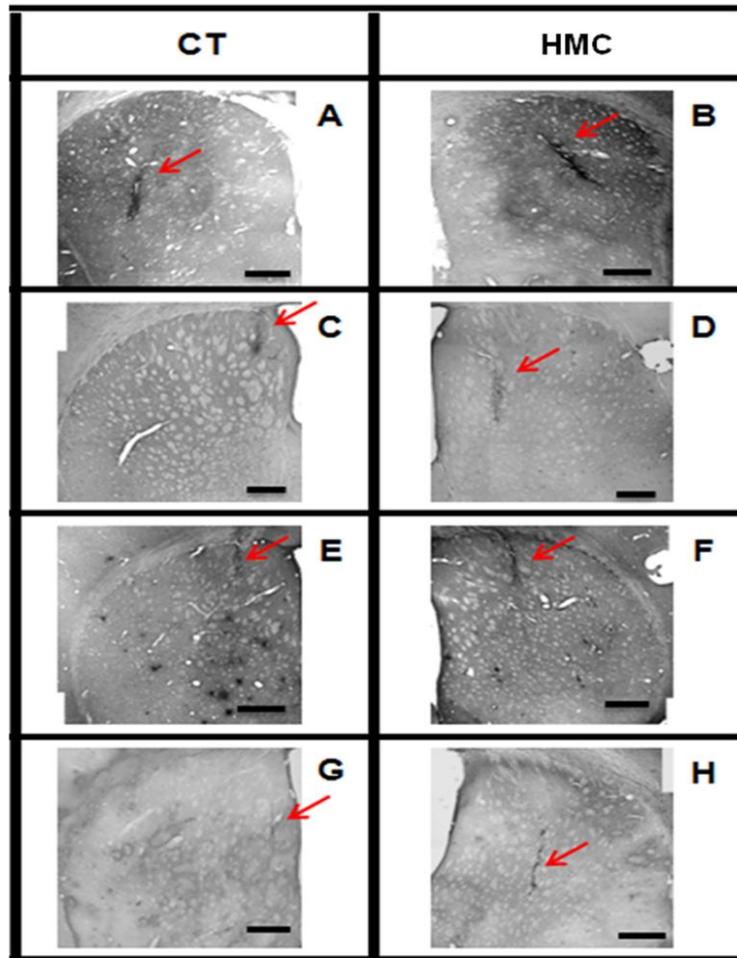


Figura 24. Respuesta inflamatoria de macrófagos y microglía activa. A-H) Micrografías de cortes coronales de 30 μm de grosor, procesados por inmunohistoquímica contra el anticuerpo anti-CD68 visualizado por diaminobenzidina. J) Promedio \pm EEM del número de células cuantificadas en las micrografías, en la gráfica se muestra el número de macrófagos y microglía presente post-implante en los cuatro tiempos de tratamiento. CT (control) y HMC (metilcelulosa), (n=3). Barra de calibración de 500 μm . Prueba estadística U de Mann Whitney.

Al analizar los cortes inmunoteñidos con anti iba-1, se observó la morfología de la microglía teñida y se cuantificó la población celular activada de acuerdo a las siguientes características morfológicas: Microglía con morfología ameboidea, cuerpo celular pequeño y sin procesos (microglía fagocítica), microglía con cuerpo hipertrófico y con procesos con apariencia de arbusto (microglía no fagocítica) (Fig. 25 A-C). La microglía con cuerpo celular pequeño y varios procesos ramificados se consideró microglía no activa (Fig. 25 D).

Una semana posterior al implante se observó en el hemisferio control y en el lugar de la inyección la presencia de microglía fagocítica, cercana a este sitio microglía no fagocítica, y dispersas en todo el estriado microglía no activa; en contraste en el hemisferio tratado se observó una mayor cantidad de microglía en las diferentes fases de activación, predominando la microglía redondeada sin proyecciones en el lugar del depósito y formando una barrera (fig. 26 A y B). A las dos semanas en el hemisferio control disminuyó el número de microglía fagocítica, aunque se observó aún los tres tipos de morfología al igual que en el hemisferio tratado; en éste último se incrementó el número de microglía dispersa en el estriado y con morfología ramificada (fig. 26 C y D). A las cuatro semanas disminuyó aún más el número de microglía fagocítica en el lugar de la inyección en el hemisferio control. En el hemisferio tratado también hubo disminución de la microglía, en ésta predominó la microglía dispersa y ramificada en todo el estriado pero en menor cantidad a lo observado a las dos semanas (fig. 26 E y F). A las ocho semanas se siguió observando tanto en el hemisferio control como en el hemisferio tratado el mismo tipo de microglía ramificada y dispersa en el estriado, y en el lugar de la inyección predominó la microglía con dos o tres proyecciones descritas por Kettenmann et al., en el 2011 (fig. 26 G y H). Al cuantificar la microglía activa y en proceso de activación en la primera semana se observó un incremento aparente de células inflamatorias en el hemisferio tratado, la cual no fue significativa al compararla con el hemisferio control (Fig. 26 A-B, J), a las dos, cuatro y ocho semanas se observó una disminución gradual el número de microglía activa tanto en el hemisferio control como en el hemisferio tratado, indicando la resolución del proceso inflamatorio (fig. 26 J).

En ninguno de los tiempos analizados hubo diferencia significativa entre el hemisferio control y el tratado.

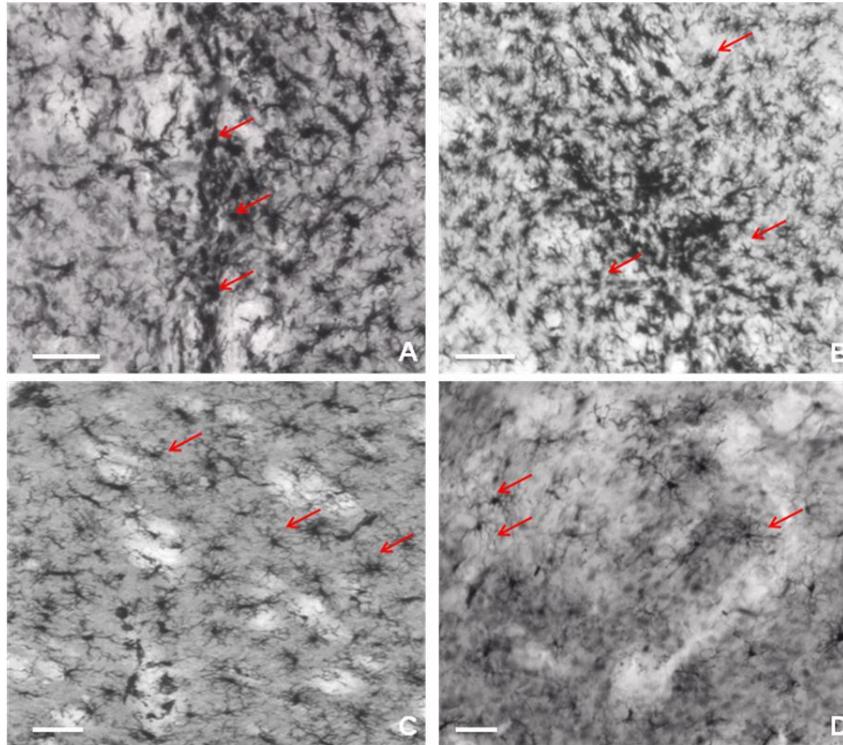


Figura 25. Micrografías de las diferentes morfologías de la microglía en el estriado después de 2 semanas de la administración de HMC A) Cuerpo celular pequeño y sin procesos (microglía fagocítica), B) Cuerpo pequeño, ameboideo y con pocos procesos, C) Cuerpo hipertrófico y con procesos con apariencia de arbusto (microglía no fagocítica) y D) Cuerpo celular pequeño y varios procesos ramificados (microglía no activa).Las flechas rojas indican la morfología descrita. Barra de calibración de 100 μ m

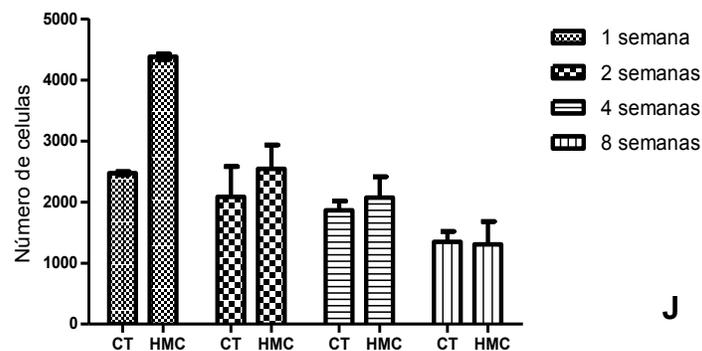
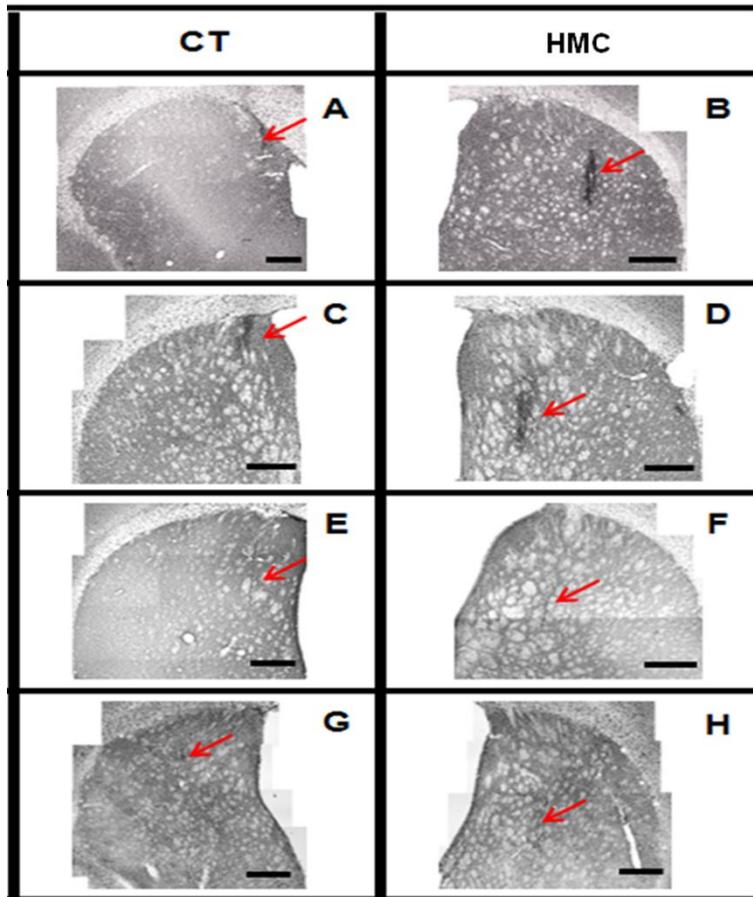


Figura 26. Respuesta inflamatoria de microglía activa. A-H) Micrografías de cortes coronales de 30 μm de grosor, procesados por inmunohistoquímica contra la proteína el Iba-1 visualizado por diaminobenzidina. J) Promedio \pm EEM del número de microglía activa cuantificada, en la gráfica se muestra el número de microglía presente post-implante en los cuatro tiempos de tratamiento. CT (control) y HMC (metilcelulosa), (n=3). Prueba estadística U de Mann Whitney. Barras de calibración de 500 μm

Al analizar los cortes inmunoteñidos con anti- GFAP para detectar la presencia de astrocitos se obtuvieron los siguiente resultados: En la primera semana, en el hemisferio control, la respuesta mediada por los astrocitos fue alta, principalmente localizada en la

región de la inyección, y con pocas células dispersas en el estriado; en el hemisferio tratado hubo menor número de astrocito activos en el lugar de la inyección y dispersos en el estriado (fig. 28 A y B). A las dos semanas en el hemisferio control disminuyó el número de astrocitos dispersos en el estriado al igual que en el lugar de la inyección y en el tratado aumentó, principalmente en regiones aledañas al lugar del depósito (fig. 28 C y D), a las cuatro semanas en el hemisferio control disminuyó el número de astrocitos activos disperso al igual que en el hemisferio tratado, pero en este último incrementó el número de astrocitos en el lugar del depósito, esto representaría el movimiento de los astrocitos dispersos hacia el lugar del depósito (fig. 28 E y F). A las ocho semanas tanto en el hemisferio control como en el hemisferio tratado disminuyó el número de astrocitos activos, tanto en el lugar de la inyección como los dispersos en el estriado. En todos los tiempos observamos astrocitos con cuerpos hipertróficos y procesos cortos y gruesos, con muchas ramificaciones, sugerentes de astrocitos reactivos (Bjugstad et al., 2010), estos se encontraban principalmente alrededor del lugar de la inyección, formando una barrera entre las regiones afectadas y las no afectadas (cicatriz glial) y los astrocitos que se encontraban dispersos en el estriado tenían un cuerpo celular pequeño con procesos largos y delgados (no reactivos) según la descripción de Bjugstad et al. en el 2010; en ninguno de los tiempos hubo una diferencia significativa entre el hemisferio control y el tratado (Fig. 28 J).

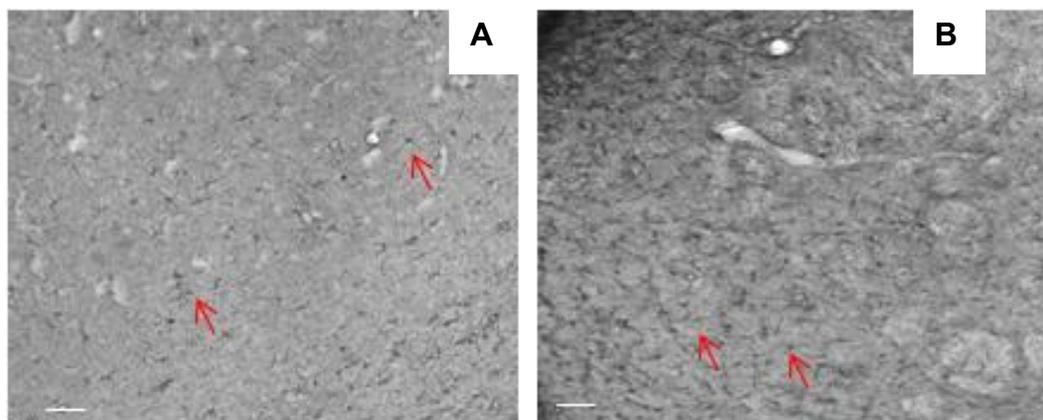


Figura 27. Micrografías de la respuesta inflamatoria de astrocitos activados. Micrografías de astrocitos activados en el estriado después de 2 semanas de la administración de A) solución salina y B) HMC. Barra de calibración de 200µm

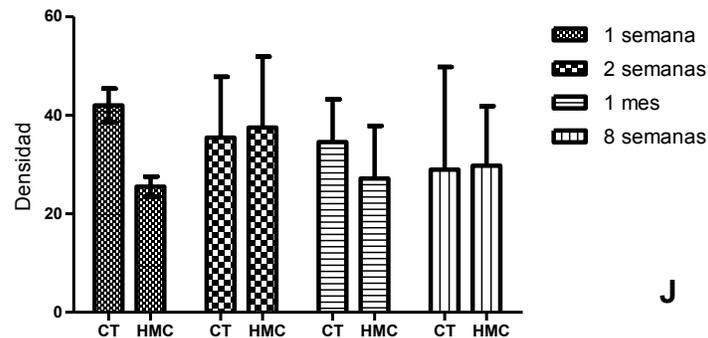
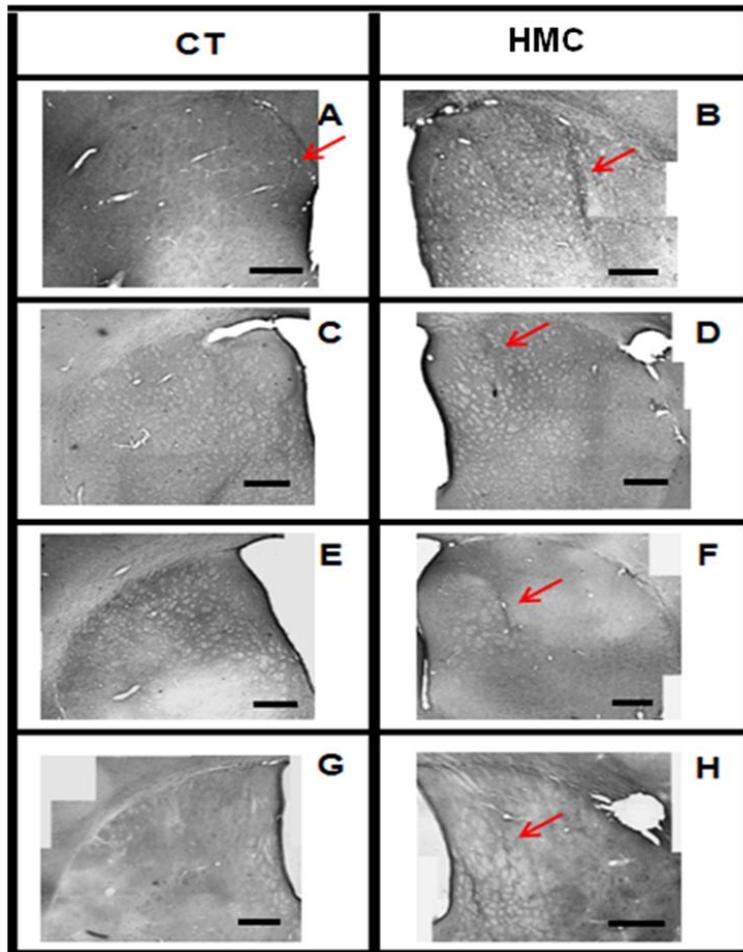


Figura 28. Respuesta inflamatoria de astrocitos. A-H) Micrografías de cortes coronales de 30 μm de grosor, procesados por inmunohistoquímica con el anticuerpo contra la proteína CD68 visualizado por diaminobenzidina para evaluar la respuesta inflamatoria. J) Promedio \pm EEM del número de células observadas en las micrografías, en la gráfica se muestra el número de microglía presente post-implante en los cuatro tiempos de tratamiento. CT (control) y HMC (metilcelulosa), (n=3). Prueba estadística U de Mann Whitney. Barra de calibración de 500 μm .

VIII- DISCUSION

Las proteínas recombinantes, las drogas sintéticas y pro-drogas han sido desarrolladas para tratar enfermedades y daños en el sistema nervioso central. Aunque éstas son estrategias prometedoras de tratamiento, se ven afectadas por la vida media y la biodisponibilidad de las proteínas y drogas, así como por la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que dificulta su liberación en el cerebro. Estos parámetros son clave para un tratamiento terapéutico exitoso, por esta razón se requiere el empleo de vehículos de liberación local, que sean biocompatibles, biodegradables y que sus productos de biodegradación no produzcan neurotoxicidad, y con ello permitan administrar un tratamiento de manera local asegurando que llegue a la célula diana. Entre los vehículos de liberación que existen están partículas poliméricas, los liposomas y micelas, los dendrímeros, entre otros, que facilitan colectivamente la encapsulación, focalización y liberación de fármacos. Nosotros seleccionamos biomateriales poliméricos, los cuales pueden ser diseñados para liberar de manera controlada, en el lugar, y a la velocidad deseada, la proteína de interés sin modificarla; además muestran poca fluctuación en la concentración del fármaco. En particular nos enfocamos a evaluar microesferas de PLGA e hidrogeles de metilcelulosa como posibles vehículos de liberación de sema 3A-FC en el parénquima cerebral.

Uno de los vehículos de liberación más utilizados actualmente son las microesferas, que pueden ser de diferentes materiales tanto naturales como el alginato, la dextrana, la goma arábiga, la quitosana y sintéticos como el poli-e-caprolactona, el ácido poliláctico, los copolímeros del ácido láctico y ácido glicólico (Saez et al. 2007); y actualmente se comercializan con fármacos como por ejemplo: Lupron Depot® (Takeda-Abott), el Zoladex® (Zeneca), el Decapeptyl ® (Ipsen Biotech) y el Prostap SR® (Lederle). El PLGA ha mostrado tener alta biocompatibilidad (Chiappetta et al., 2006; Igartua et al., 1998; Lampe et al., 2010; Garbayo et al., 2009 y McRae y Dahlstrom, 1993); ser biodegradable, no ser tóxico y seguro para usarse en humanos (Williams, 1982). Sin embargo existen diversos parámetros que deben ser controlados en el proceso de elaboración de las microesferas como son: el tamaño, la eficiencia de

encapsulación de la proteína, la cinética de liberación, la viabilidad de la proteína liberada, cantidad de proteína liberada, los productos de biodegradación y el método de encapsulación. En el presente trabajo se elaboraron microesferas de PLGA utilizando un co-polímero que contenía una proporción 50:50 de ácido láctico y glicólico y un grupo terminal ácido. Esta proporción de los monómeros le permite tener una degradación relativamente rápida de aproximadamente 30 días. Las proporciones de los monómeros que componen el co-polímero modifican el tiempo en el cual este se degrada; se sabe que a mayor proporción de ácido láctico incrementa el tiempo de degradación. El grupo terminal (-COOH o -COOR) ayuda a determinar su cinética de degradación. Las características antes mencionadas determinan también la eficiencia de encapsulación y la velocidad de liberación de la sustancia encapsulada. (McRae y Dahlstrom, 1993 y Saez et al. 2007). Para este trabajo, el co-polímero utilizado presentaba una alta biodegradabilidad, pero una menor tasa de encapsulación. Otros parámetros que pueden influir en los perfiles de liberación son aquellos involucrados en el proceso de doble emulsión. A este respecto Nihant et al. en 1995 describió que la morfología y estabilidad de la microesfera pueden ser controlados mediante la primera y segunda emulsión, y Yang et al. en el 2001 reportó que al emplear diferentes concentraciones de polivinilalcohol como emulsificante en la fase externa acuosa, se puede influir fuertemente en la distribución del fármaco dentro de las microesferas y en los perfiles de liberación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis, se observó una eficiencia de encapsulación del 58.6% en microesferas con un diámetro medio de 64.63 μm ; estos resultados son semejantes a los obtenidos por Chiappetta et al. en el 2006 quienes reportan una eficiencia de encapsulación de entre el 12.2 y 76.2% con un tamaño de entre 9 y 67.9 μm utilizando microesferas de poli(D,L-láctico-co-glicólico) 50:50 preparadas por una emulsión múltiple agua en aceite en agua (A1/ O/ A2) y empleando una técnica de evaporación del solvente. Al evaluar la cinética de liberación de proteína a partir de las microesferas de PLGA observamos una liberación trifásica tanto en los experimentos independientes como en los continuos. La liberación trifásica se caracteriza por una liberación rápida de proteína al inicio denominada "burst", la cual corresponde a la proteína que se queda en la superficie de las microesferas,

posteriormente hay una liberación lenta a través de los poros o canales de la microesfera, y por último la liberación mediada por la bioerosión de las microesferas en un medio acuoso (Igartua et al., 1998). Nosotros observamos al tiempo 0 una liberación del 9.4%, semejante a lo obtenido por Igartua en 1998 (8.61%), esta liberación es atribuida a un remanente en la superficie de las microesferas, posteriormente se observó una disminución en la liberación a un 2.5% a las 8 h y se obtiene un máximo de liberación del 13.2%; semejante al 16.6% reportado por Igartua (1998); este incremento de la liberación de la proteína puede atribuirse a la erosión hidrolítica de las microesferas de PLGA, en la cual hay una escisión hidrolítica de los enlaces éster que se incrementa debido a la acción autocatalítica de los productos de degradación de naturaleza ácida (Saez et al., 2007). Chiappetta et al. en el 2006 mostró que al elaborar microesferas de menor tamaño (9.5 μ m) se incrementaba la eficiencia de encapsulación al 76.2% y una liberación al tiempo 0=40% y a partir de los 15 días=90%. Esto sugiere que si se disminuye el tamaño de las microesferas la cinética de liberación sería mejorada y posiblemente requeriríamos encapsular una menor cantidad de sema 3A-FC.

Muchos de los ensayos de liberación de proteínas a partir de microesferas contemplan la liberación en un medio acuoso, sin embargo, para nuestro proyecto era importante verificar si la proteína liberada podía difundir en una matriz tridimensional que simulara las condiciones de liberación dentro del parénquima cerebral, por lo anterior se evaluó la liberación de proteína a partir de microesferas de PLGA incluidas en un gel de colágena, los resultados mostraron una pobre difusión, y por tanto un gradiente de proteína que abarcó un área muy pequeña y cercana al punto de liberación de la proteína. En las primeras 24 h se difundió solamente el 5% en una distancia de 350 μ m y las 408h, la liberación máxima fue del 16% a una distancia de 100 μ m. Esto puede estar relacionado con la lenta liberación de las proteínas y con la ausencia de degradación del PLGA durante el tiempo evaluado, ocasionando una disminución de la liberación a través del tiempo, como lo sugiere Cowsar et al. (1985).

Cuando se evaluó qué cantidad de sema 3A-FC se requiere encapsular para poder observar los efectos quimiotrópicos en neuronas dopaminérgicas, tomando en

cuenta la eficiencia de encapsulación (58.6%) y de liberación (7.3% a las 192h) de microesferas de PLGA; se concluyó que el proceso es poco eficiente y que se requeriría encapsular una cantidad de proteína recombinante muy por encima del stock disponible para realizar el proyecto (50mg/ml). Por otra parte, los experimentos realizados mostraron que a concentraciones menores de 0.25ng/ μ l no hay respuesta quimiotrópica de los axones, esta cantidad es un orden de magnitud por encima de la que sería factible encapsular. Otra estrategia que podría utilizarse para alcanzar la concentración funcional de sema 3A-FC sería aumentar el número de microesferas que se aplicarían en el sitio de la herida en aproximadamente 223.21mg/mL, aunque no sería factible administrar ese volumen en el cerebro.

Previamente, Mundargi et al. en el 2008 reportaron que la degradación de las microesferas de PLGA producen la acidificación del medio en el que se encuentran y por tanto desnaturalizan la proteína encapsulada. Además se ha reportado que el pH ácido en el medio circundante puede alterar la viabilidad de las células, comprometiendo las funciones vitales, afectando la actividad eléctrica, la activación de enzimas o la apertura de canales iónicos que se vean influenciados por el cambio de pH (Chelser, 2003). En este proyecto no observamos efecto negativo de los productos de degradación de ME en la sobrevivencia de las neuronas MV.

Los resultados obtenidos nos mostraron por tanto que las microesferas formadas con el PLGA 50:50, mediante el método de doble emulsión, no fue el adecuado para liberar sema 3A-FC, en las cantidades requeridas para formar un gradiente de concentración y favorecer la elongación de los axones de las neuronas MV; y que sería necesario modificar diversos parámetros como las características químicas del copolímero, el método de encapsulación o el tamaño de la microesferas a fin de hacer más eficiente este vehículo de liberación.

Al evaluar la liberación de proteína a partir de HMC observamos una liberación pulsátil, ya que en un medio acuoso la liberación máxima se llevó a cabo entre las 6 y 12 h (40%); posteriormente la liberación disminuyó e incrementó nuevamente a las 216 h,

esto pudo deberse al inicio de la degradación del HMC; y por esto mismo una liberación mayor y constante de proteína. Este fenómeno de degradación fue observado por Tate et al. 2001 después de la incubación de estos hidrogeles *in vitro* por una semana. Al evaluar la liberación de proteína en un gel de colágena, observamos una buena difusión de proteínas y la formación de un gradiente de concentración que abarcó la totalidad del gel (700µm) a las 24 hr. Esta liberación y difusión de la proteína nos sugiere que al utilizarse los HMC como vehículo de liberación en el parénquima cerebral se pueden formar gradientes de concentración y llegar a células dianas distantes.

Otra característica de la encapsulación de sema 3A-FC en HMC es que mantiene su efecto quimiotrópico y quimiorrepelente al ser liberada del hidrogel en cultivos de neuronas dopaminérgicas y de ganglios de la raíz dorsal, respectivamente. Interesantemente, también hubo efecto de elongación a las 24h en los cultivos que tenían solo el HMC; Wells et al. en 1997 reportó que plataformas hechas de HMC promueven el crecimiento, diferenciación y previene la agregación celular en trasplantes celulares, ayudando a la sobrevivencia e integración en el organismo huésped. Será interesante analizar si la MC por si misma ejerce algún efecto inductor de la proyección axonal de neuronas dopaminérgicas.

Las evaluaciones *in vivo* de la biocompatibilidad del hidrogel de metilcelulosa no comprometieron la condición general de los animales, evaluada por una batería de pruebas, ingesta de agua y alimento, función sensorial, motora, y actividad locomotora espontánea. Estas conductas se evaluaron dado que el depósito del hidrogel de metilcelulosa se hizo en el estriado, y el estriado dorsal es la puerta de entrada de los ganglios basales, los cuales reciben aferencias excitatorias de la corteza y el tálamo, y forman el origen de las vías directas e indirectas envueltas en el control motor (Kreitzer y Malenka, 2008). No se observó alteración en la función sensorial ni en la motora, y se observó una ligera diferencia en el consumo de agua y alimento en las primeras semanas que se pueden atribuir a la recuperación de la cirugía ya que posteriormente los animales tratados no difirieron del control.

Con respecto a la conducta motora espontánea en la primer semana posterior al implante se observó aumento en la actividad horizontal, la distancia total recorrida y el número de movimientos al compararlas con las ratas control, esto pudo deberse a una irritación producida por el depósito del hidrogel de metilcelulosa o a un daño temporal como el descrito por Deckel et al 1986, quien observó hiperactividad en la actividad locomotora cuando se remueve o daña una zona del estriado medial. El efecto observado fue transitorio y desapareció casi por completo en la segunda semana post tratamiento, de manera que los niveles de actividad locomotora espontánea fueron semejantes entre los grupos tratados y el control a partir de las dos semanas hasta las 8 semanas, durante las cuales se evaluó su conducta, lo anterior refleja la recuperación progresiva de la lesión en el estriado y la ausencia de un daño crónico y/o progresivo en el sitio implantado.

Además de la actividad locomotora espontánea se evaluó la coordinación motora con una prueba que requiere que los animales se mantengan sobre un rodillo giratorio. El depósito de HMC tampoco tuvo efectos adversos sobre el desempeño de esta tarea, lo que robustece la noción de que este depósito en el estriado dorsal no tiene efecto indeseables sobre la conducta y la coordinación motora de los animales.

A nivel histológico se realizaron varios análisis que permitieron evaluar diferentes aspectos. Se demostró mediante tinción de violeta de cresilo que el depósito del hidrogel de metilcelulosa no altera la citoarquitectura del estriado ni del parénquima; además no se observaron diferencias de tamaño en el sitio de la inyección con solución salina y con el HMC, lo cual refleja la ausencia de citotoxicidad y daño crónico que llevaría a la pérdida del tejido; estas observaciones han sido también reportadas previamente por Tate et al. en el 2001 en implantes realizados en la zona de la corteza cerebral. Por otra parte, el depósito del HMC/dextran-FITC permitió corroborar la presencia de este marcador a los diferentes tiempos del tratamiento, además se observó que había células fluorescentes que incorporaron el dextran-FITC, lo cual mostró que existe una difusión del contenido incluido en el HMC.

Finalmente la evaluación de la respuesta inflamatoria mostró, durante las dos primeras semanas, una tendencia al aumento de células de respuesta innata como macrófagos y microglía en el tejido tratado; aunque estadísticamente no hubo diferencia con el control. De manera importante se observó que las células inflamatorias estaban presentes sólo en el sitio de la herida y cercano a ésta, y que hubo una significativa disminución de la respuesta a las ocho semanas, lo que indica que la reacción inflamatoria fue localizada y transitoria, y por tanto más referida a una respuesta de daño mecánico, tal como se ha descrito con anterioridad para el encéfalo con una duración aproximadamente 7 días (Bjugstad et al., 2010). Al medir la respuesta inflamatoria local innata de la microglía activada y en proceso de activación, se observó una respuesta semejante en tejido control y tratado a todos los tiempo evaluados, y significativa disminución de la microglía conforme avanzó el tiempo post implante, llegando a los mismo niveles que los presentados en el hemisferio control. La respuesta inflamatoria primaria (innata) observada por el reclutamiento de microglía y macrófagos fue seguida de la respuesta secundaria mediada por los astrocitos (GFAP positivos) que tienen la función de crear una barrera (cicatriz glial) entre las áreas afectadas y las que no lo están (Bjugstad et al., 2010). No se encontró diferencia entre el hemisferio control y el hemisferio tratado en los diferentes grupos. La presencia de astrocitos en la primera semana se atribuye a una interacción microglía-astrocitos, mediante la cual los astrocitos regulan la activación de la microglía mediante la producción de moléculas anti-inflamatorias (Jeong et al., 2013). A las cuatro y ocho semanas del implante, la presencia de astrocitos disminuyó y no se observó un proceso de encapsulamiento, o acumulación específica de éstas células en el sitio de la inyección del HMC, que indicara respuesta inflamatoria crónica a un cuerpo extraño. Resultados semejantes fueron reportados por Tate et al. 2001, con la única diferencia de que a los 14 días ellos observaron que la respuesta de la microglía y macrófagos deja de concentrarse en el lugar del depósito del HMC y nosotros lo observamos a las 8 semanas.

Por tanto, los resultados obtenidos indican la presencia del HMC no induce un proceso crónico de inflamación, una respuesta de cuerpo extraño, ni un daño citotóxico que con el tiempo produzca la pérdida del tejido o necrosis en el parénquima cerebral

implantado. Esto nos da la pauta a seguir trabajando con el HMC como un vehículo de liberación de proteínas en el cerebro, y a plantear como perspectiva analizar la liberación de sema 3A-FC *in vivo* y el uso de HMC en conjunto con trasplantes intranigrales de células dopaminérgicas, que faciliten la reconstrucción de vías neuronales perdidas tales como la vía nigroestriada .

IX- CONCLUSIONES

- Los hidrogeles de metilcelulosa (HMC) y las microesferas de un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA) funcionan como vehículos de liberación de proteínas en un medio acuoso.
- Las microesferas de PLGA no fueron adecuadas para liberación de proteínas en una matriz tridimensional y para la formación de gradientes de concentración, debido a su lenta cinética de liberación, y su baja eficiencia de encapsulación provoca que la concentración del fármaco, en este sema 3A-FC, necesario para tener un efecto quimiotrópico sobre neuronas dopaminérgicas del MV sea ineficiente, por lo que no hace factible su uso como vehículo de liberación en el sistema nervioso central.
- Los HMC fue el vehículo más adecuado para la liberación de proteínas debido a sus propiedades fisicoquímicas, que permiten su microinyección en el cerebro en su forma líquida, y su gelificación termorreversible una vez dentro del parénquima cerebral; induciendo una inflamación transitoria y localizada sin causar inflamación crónica, ni daño a nivel histológico y conductual, lo que lo hace un vehículo biocompatible para la liberación de proteínas en el sistema nervioso central.
- La sema 3A-FC incluida en los HMC es liberada y mantiene su actividad quimiotrópica y quimiorepelente.

X- REFERENCIAS

Anderson J, Rodriguez A, Chang D. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. NML ID. 18162407. 20. 86-100.

Arredondo AP y Londoño ME. 2009. Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. Revista Ingeniería Biomédica. 3. 83-94.

Artigiani S, Comoglio PM y Tamagnone L. 1999. Plexins, Semaphorins, and Scatter Factor Receptors: A Common Root for Cell Guidance Signals?. NML ID. 100888706. 48. 477-482.

Bain M, Bhowmicka B, Maitya D, Mondal D, Mollicka M, Ranab D, Chattopadhyaya D. 2012. Synergistic effect of salt mixture on the gelation temperature and morphology of methylcellulose hidrogel. NML ID. 22884434. 51. 831-6.

Bjugstad B, Lampe K, Kern D, Mahoney M. 2010. Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. NML ID. 20740603. 95. 79-91.

Brown JA y Bridgman PC. 2009. Disruption of the cytoskeleton during semaphoring 3A induced growth cone collapse correlates with differences in actin organization and associated binding proteins. NML ID. 101300215. 69. 633-646. 109. 1898-911.

Brown JA, Wysolmerski RB y Bridgman PC. 2009. Dorsal root ganglion neurons react to semaphoring 3A application through a biphasic response that requires multiple myosin II isoforms. NML ID. 9201390. 20. 1167-1179.

Bryers J, Giachelli C, Ratner B. 2012. Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts. NML ID. 22592568.

Castellani V, Angelis E, Kenwrick S, Rougon G. 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. NML ID. 8208664. 21. 6348-6357.

Chelser M. 2003. Regulation and Modulation of pH in the Brain. NML ID. 14506304.83.1183–1221.

Chiappetta D, Apicella C, Gentile T, Dokmetjian J y Bregni C. 2006. Vehiculización de proteínas en microesferas biodegradables. Acta Farmaceutica. Bonaerense. 25.485-490.

Cowsar D, Tice T, Gilley R, English J. 1985. Poly(lactide-co-glycolide) Microcapsules for Controlled Release of Steroids. NML ID. 4046844. 112. 101-116.

Deckel A, Moran T, Coyle J, Sanmerg P y Robison R. 1986. Anatomical predictors of behavioral recovery following fetal striatal transplants. NML ID. 0045503. 365. 249-258

Dee K, Puleo D y Bizios R. 2002. An introduction to tissue biomaterial interactions. New Jersey: Wiley-Liss.

Dent E y Gertler FB. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. NML ID, 8809320. 40. 209-227.

Díaz E, Tamariz E, Díaz N, García, C, Varela A y Velasco I. 2013. Recovery of experimental parkinsonism by semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. NML ID. 23732989. 40: 1579-91.

Dickson B. 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. NML ID. 0404511I. 6. 1959-1963.

Dunnett S, Whishaw I, Jones G y Bunch S.1987. Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. NML ID. 7605074. 20. 635-669

Garbayo E, Montero C, Ansorena E, Lanciego J, Aymerich M y Blanco M. 2009. Effective GDNF brain delivery using microspheres- A promising strategy for Parkinson's disease. NML ID. 19154763. 135, 119-126

Gheradi E, Love CA, Esnouf, RM y Jones EY. 2004. The sema domain. NML ID. 9107784.14. 669-678.

Gonzales J., Toro J. 2006. La neuroglia en la respuesta inmune del sistema nervioso central. Acta Neurología Colombia. 23. 55-30

Hart A, Wyttenbach. A, Perry H y Teeling J. 2011. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: Grey versus white matter differences. NML ID. 8800478.

Hernandez H, Tamariz E, Sandoval M y Varela A. 2008. Semaphotins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axón pathfinding. NML ID. 0406041. 506. 387-397.

Igartua M, Hernández R, Esquisabel A, Gascón A, Calvo M, Pedraz J. 1998. Stability of BSA encapsulated into PLGA microspheres using PAGE and capillary electrophoresis. International Journal of Pharmaceutics.169. 45-54.

Itoh K, Hatakeyama T, Shimoyama T, Miyazaki S, Emanuele A, Attwood D. 2011. In situ gelling formulation based on methylcellulose/pectin system for oral-sustained drug delivery to dysphagic patients. NML ID. 21405940.1-8.

Jeong H, Ji K, Min K, Joe E. 2013. Brain Inflammation and Microglía: Facts and Misconceptions. NML ID. 23833554. 22. 59-67.

Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of Microglía. NML ID. 21527731. 91. 461–553.

Kolodkin A, Matthes D y Goodman C. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. NML ID. 0413066. 75. 1389-1399.

Kolodkin A, Levensgood D, Rowe E, Tai Y, Giger R y Ginty D. 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. NML ID. 0413066. 90. 753-754.

Kreitzer A, Malenka R. 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. NML ID. 19038213. 60. 543-554

Kruger R., Aurandt J y Guan KL. 2005. Semaphorins command cells to move. NML ID. 100962782. 6. 789-800.

Lampe K, Kern D, Mahone M, Bjugstad K. 2010. The administration of BDNF and GDNF to the brain via PLGA microparticles patterned within a degradable PEG-based hydrogel: Protein distribution and the glia response. NML ID. 21254391. 96, 595-607

McRae A, Dahlstrom A. 1993. Transmitter-loaded polymeric microspheres induce regrowth of dopaminergic nerve terminals in striata of rats with 6-OH-DA induce Parkinsonism. NML ID. 7950966. 25, 27-33

Mundargi R, Ramesh V, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi T. 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. NML ID. 18083265. 125. 193–209

Nihant N, Schugens C, Grandfils C, Jérôme R, Teyssié P. 1994. Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. Effect of primary emulsion stability. NML ID. 7855056. 10, 1479-1484

Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. 2004. Microglía/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*. NML ID. 14756805. 88: 844-856.

Paxinos G, Watson C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic press

Perego C, Fumagalli S y Garzía MG. 2011. Temporal pattern of expression and colocalization of microglía/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. NML ID. 101222974.8. 1-19.

Qiao M, Chen D, Ma X y Liu Y. 2005. Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA–PEG–PLGA copolymers: Synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer-based hydrogels. NML ID. 7804127. 294. 103–112

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL y Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. NML ID. 8908638.30. 77-105.

Raper JA. 2000. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. NML ID. 9111376. 10. 88-94

Rodríguez VM. 2002. Caracterización de los efectos neurotóxicos del plomo y arsénico sobre los Ganglios Basales de la rata. México: Tesis de Doctorado.

Roman M, Castillo J, Picciteli V, China K., Arribas G y China C. 2008. Caracterización morfológica de sistemas poliméricos biodegradables utilizando técnicas de UV y fluorescencia láser confocal. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 9:526-537.

Saez V, Hernandez J y Peniche C. 2007. Las microesferas como sistemas de liberación. *Biología Aplicada*. 24.98-107

Sastre R, Aza S y Román J. 2004. Biomateriales. México: Faenza Editrice Iberica.

Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab M, Perry V. 1999. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. NML ID. 10564372. 10. 3648-58.

Song H. y Poo M. 2001. The cell biology of neuronal navigation. NML ID: 100890575. 3: 81-88.

Steffensky M., Steinbach K., Schwarz U., Schlosshauer B. 2006. Differential impact of semaphorin 3E and 3A on CNS axons. NML ID. 8401784. 24: 65-72.

Subodh S. y Weiguo D. 2004. Hidrogeles biodegradables termosensibles/sensibles al pH para la liberación sostenida de agentes biológicamente activos. Número de publicación: 2 197 711. Patente: ES 2 197 711 T3

Tamagnone L., Comoglio P. 2004. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. NML ID.100963049. 5: 356-359.

Tamariz E, Díaz N, Díaz N, García C, Velasco I, Varela A. 2010. Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. NML ID. 7600111. 88: 971-980

Tamariz E, Wan AC, Pek Y, Giordano M, Hernández G, Varela A, Velasco I, Castaño V. 2011. Delivery of Chemotropic Proteins and Improvement of Dopaminergic Neurons Outgrowth through a Thixotropic Hybrid Nano-gel. NML ID. 9013087. 22. 2097-2109

Tate M, Shear D, Hoffman S, Stein D y LaPlaca M. 2001. Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. NML ID. 8100316. 22: 1113-1123.

Valdembri D, Caswell P, Anderson K, Schwarz J, König I, Astanina E, Caccavari F, Norman J, Humphries M, Bussolino F y Serini G. 2009. Neuropilin 1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. NML ID. 101183755. 7,115-132.

Wells M, Kraus K, Batter D, Blunt D, Weremowitz J, Lynch S, Antoniadis H y Hansson H. Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. NML ID. 9270050. 2, 395-402

Williams F. 1982. Biodegradation of surgical polymers. NML ID. 051233 17, 1233-1246.

Wilson C, Clegg R, Leavesley D, Percy M. 2005. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. NML ID. 15738657. 11. 1-18.

Yang Y, Chung T, Ng N. 2001. Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. NML ID. 11197498. 22, 231-41

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Medición de la difusión de la fluorescencia de inmunoglobulina acoplada al fluoróforo Alexa 488.

Figura 2. Esquema de la región que se cuantifico en cada corte inmunoteñido.

Figura 3. Micrografía de microesferas de PLGA a 10X, cargadas con una inmunoglobulina acoplada al fluoróforo Alexa 488. Barra de calibración de 100µm.

Figura 4. Porcentaje de liberación en PBS de albúmina bovina incluida en HMC

Figura 5. Porcentaje de liberación en PBS de BSA encapsulada en microesferas de PLGA.

Figura 6. Porcentaje de difusión en geles de colágena de inmunoglobulinas acopladas al fluoróforo Alexa 488 incluidas en HMC.

Figura 7. Porcentaje de difusión en colágena de las inmunoglobulinas acopladas al fluoróforo Alexa 488 incluidas en microesferas de PLGA.

Figura 8. Efecto de sema 3A-FC incluida en HMC, sobre la elongación de axones de neuronas MV.

Figura 9. Efecto de sema 3A-FC incluida en el HMC, en axones de neuronas GRD.

Figura 10. Efecto de productos de degradación de PLGA en cultivos de neuronas MV.

Figura 11. Efecto de sema 3A-FC en axones de neuronas MV obtenidas de embriones de E-14.5.

Figura 12. Evaluación sensorial y motora.

Figura 13. Promedio \pm EEM del volumen de consumo de agua.

Figura 14. Promedio \pm EEM del peso del alimento consumido diariamente por rata en gramos, para cada uno de los grupos: una semana (A), dos semanas (B), cuatro semanas (C), ocho semanas (D) (* $p < 0.05$, indica diferencias significativas con el control de acuerdo con la prueba U de Mann Whitney) A y D $n=4$, B y C $n=5$.

Figura 15. Promedio \pm EEM del peso corporal de las ratas en gramos.

Figura 16. Coordinación motora registrada en el RotaRod.

Figura 17. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora espontánea registrada en la primera semana expresada como porcentaje del grupo control.

Figura 18. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora registrada en la segunda semana expresada como porcentaje del grupo control

Figura 19. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora espontánea registrada en la cuarta semana expresada como porcentaje del grupo control.

Figura 20. Promedio (\pm EEM) de la actividad locomotora espontánea registrada en la octava semana expresada como porcentaje del grupo control

Figura 21. Implante en estriado.

Figura 22. Presencia de dextrán-FITC en el estriado

Figura 23. Micrografías de la respuesta inflamatoria de macrófagos y microglía activa.

Figura 24. Respuesta inflamatoria de macrófagos y microglía activa.

Figura 25. Micrografías de las diferentes morfologías de la microglía en el estriado después de 2 semanas de la administración de HMC.

Figura 26. Respuesta inflamatoria de microglía activa.

Figura 27. Micrografías de la respuesta inflamatoria de astrocitos activados.

Figura 28. Respuesta inflamatoria de astrocitos.

ANEXOS

Soluciones

a. Howard's Ringer (pH 7.2)

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

b. PBS 10X (pH 7.3)

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

c. PFA 4%

Reactivo	Para 1L
Paraformaldehido	40 g
PBS 10X	100 mL
NaOH 5N	1 mL

d. Colágena (0.2 mg/mL)

Reactivo	Para 1mL
Colágena tipo 1 (3 mg/mL)	66 µL
DMEM	934 µL
10XMEM	2 µL
NaOH 0.1N	2 µL

Medios de cultivo

a. Medio MV

Reactivo	Para 50 mL
DMEM	25 mL
DMEM-F12	25 mL
Penicilina / Estreptomicina (10, 000 µg /mL)	0.5 mL
Suplemento B-27	1 mL
Glucosa 1.5%	0.78 g

b. Medio GRD

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