



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

TÍTULO:

**EL PAPEL DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUSTRATO
SOBRE LA PROYECCIÓN AXONAL**

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRA EN:

CIENCIAS DE LA SALUD

LGAC: ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES Y CELULARES
DE LA ENFERMEDAD

PRESENTA:

ANA MONSERRAT VELA ALCÁNTARA

DIRECTORA:

DRA. ELISA H. TAMARIZ DOMÍNGUEZ

XALAPA DE ENRÍQUEZ, VER.

FEBRERO, 2017



Universidad Veracruzana

ACTA DE EXAMEN CERRADO

ACTA NÚMERO ONCE. En la Ciudad de Xalapa-Enríquez, Veracruz, México siendo las Nueve horas con diez minutos del día treinta del mes de Septiembre de dos mil dieciseises, reunido el **comité tutorial** en la Sala de Juntas del Instituto de Ciencias de la Salud conformado éste por: **Dra. María Leonor López Meraz, Dra. María Sobeida L. Blázquez Morales y Dr. Juan D. Santiago García.** Se procedió a examinar a la **C. Ana Monserrat Vela Alcántara** alumna de la **generación 2013-2015 y con matrícula S13015584**, quien presentó la tesis titulada: **“El papel de las propiedades físicas del sustrato sobre la proyección axonal y la expresión de receptores a semaforina 3A”**, como requisito para presentar el examen abierto, dentro del programa de la **Maestría en Ciencias de la Salud**. Acto seguido el comité deliberó en privado y, una vez hecho esto, se procedió a hacer la votación acerca del resultado, habiéndose determinado por unanimidad que la **C. Ana Monserrat Vela Alcántara** obtuvo aprobación para la impresión de la tesis y la presentación del examen abierto para la defensa de la misma. Posteriormente el comité en pleno procedió a notificar a la alumna los resultados del examen cerrado, con las siguientes observaciones: Enriquecer el modelo planteado, acatar las recomendaciones sobre el análisis estadístico, detallar los métodos

Firmado para constancia los que en el intervinieron, siendo las once horas con treinta minutos del día antes mencionado.

Comité tutorial

Dra. María Leonor López Meraz

Dra. Ma. Sobeida L. Blázquez Morales

Dr. Juan D. Santiago García

Financiamiento

El presente proyecto contó con el financiamiento PROMEP, a través del programa Apoyo a la incorporación de nuevos PTC, UV-PTC-631.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca N297485, otorgada para llevar a cabo mis estudios del posgrado.

Dedicatoria

A mi madre Rocío, guerrera de corazón de acero y alma de roble.

A mi padre Joel, el ángel que susurra en la inmensidad de los sueños.

A mi esposo David por apoyarme en este camino, por ser esa “invisible cadena que me ata a la vida”.

A mi hija Ana Lucía, la luz que llegó a revolucionar nuestro mundo.

A mi hermano Saúl, alma noble; “wherever you are, remember: the light at the end of the tunnel may be you”.

A mi abuela Alejandrina, dinastía de “plumajes que cruzan el pantano y no se manchan”, ejemplo de fortaleza.

A mi maestra Irma Lira, su pasión por la investigación trasciende tiempo y espacio.

Agradecimientos

A mi tutora, Dra. Elisa H. Tamariz Domínguez, Instituto de Ciencias de la Salud (ICS), UV, por su tiempo, enseñanzas, paciencia y dedicación.

Al comité tutorial, Dra. Sobeida L. Blázquez Morales, coordinadora de la Maestría en Ciencias de la Salud, ICS, UV, Dra. Ma. Leonor López Meraz, Centro de Investigaciones Cerebrales, UV y Dr. Juan Santiago García, titular del laboratorio de biología molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), UV.

Al Dr. Enrique Juárez Aguilar, titular del laboratorio de Cultivo Celular, ICS, UV y a la MC. Eva Montoya, técnico del laboratorio de Cultivo Celular, ICS, UV.

Al Dr. Luis E. Cruz Silva, titular de la unidad de microscopía, BioMimic[®], INECOL, Xalapa.

Al Dr. Roberto Zenteno Cuevas, titular del laboratorio de biología molecular, Instituto de Salud Pública, UV.

A la MC. Isela Santiago, titular del laboratorio de Neurotoxicología, UV.

A la Lic. Otilia Martínez Galán, auxiliar en estadística del ICS, UV.

A la Dra. Citlalli Regalado Santiago y LB. Brayan Condado Salazar, compañeros del laboratorio de Cultivo Celular, ICS, UV; a la Dra. Mariana Gabriela Lecourtois Amézquita y MC. Andrés Hernández Oliveras, compañeros del laboratorio de Biología Molecular, IIB, UV. A la Dra. Cynthia Fernández Pomares, del laboratorio de Neuroetología, UV.

A las MC. Jael, Mireya, Olivia y Paulina, compañeras de estudio y amigas.

Resumen

Las nuevas terapias para el tratamiento de lesiones medulares se han centrado en la búsqueda de factores que ayuden a la regeneración para restablecer la continuidad de la red neuronal lesionada. Uno de estos es la proteína quimiotrópica semaforina 3A (Sema3A), la cual actúa guiando el crecimiento axonal hasta el sitio blanco de innervación de las neuronas sensoriales. Se sabe que la rigidez del sustrato sobre el cual proyectan las neuronas es relevante para inhibir o estimular la formación y elongación de neuritas sin embargo, existen pocos estudios acerca de cómo interaccionan las diversas señales que componen el micro ambiente en el cual se forman las proyecciones. El objetivo de este trabajo fue estudiar cómo las propiedades mecánicas del sustrato modulan la morfología y el citoesqueleto del cono de crecimiento de neuronas de Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD), así como la expresión y distribución de Neuropilina-1 (Nrp-1) y Plexina A4 (PlxA4), receptores a Sema3A, para lo cual se utilizó el modelo de hidrogeles de poliacrilamida con rigidez variable. Los resultados muestran que en sustratos blandos las neuronas presentaron un axón más corto, menor área y menor número de filopodios en el cono de crecimiento. Asimismo, el citoesqueleto del cono de crecimiento fue modulado por la rigidez del sustrato, presentando cambios en la relación actina/ β III-tubulina. La rigidez del sustrato moduló la expresión de los receptores a Sema3A, en sustratos rígidos Nrp-1 aumentó su expresión, mientras que PlxA4 la disminuyó, en ambos casos al compararlo con la expresión observada en los GRD. Los datos obtenidos son relevantes para futuras investigaciones que busquen aprovechar las propiedades mecánicas del medio extracelular para potenciar o inhibir la respuesta a Sema3A, y en el diseño de biomateriales para el tratamiento de lesiones medulares.

Palabras clave:

Cono de crecimiento; citoesqueleto; Neuropilina-1; Plexina A4; rigidez del sustrato

Abstract

New therapies for the treatment of spinal cord injuries have focused on the search for factors that improve regeneration to restore the continuity of the injured neural network; one of these factors is the chemotropic protein semaphorin 3A (Sema3A), that guides the axonal outgrowth of the sensory neurons up to their innervations sites. It is known that the stiffness of the substrate where these neurons projects is relevant to inhibit or stimulate the formation and elongation of neurites, however; there are few studies trying to understand the interactions of the diverse signals that compose the microenvironment where the projections are formed. The aim of this work was to study how the mechanical properties of the substrate modulate the morphology and cytoskeleton of the growth cone of dorsal root ganglion (DRG) neurons, and the expression and distribution of Sema3A receptors neuropilin-1 (Nrp-1) and plexin A4 (PlxA4), using a polyacrylamide hydrogels with variable stiffness model. Results showed that neurons in soft substrates have shorter axons, and smaller growth cones with fewer filopodia. The substrate stiffness also modulates the cytoskeleton of the growth cone, showing changes in actin/ β III-tubulin relationship. Substrate stiffness modulated the expression of the Sema3A receptors; Nrp-1 increased its expression as stiffness increases, while PlxA4 expression decreased as compared to the expression in DRG tissue. The data obtained in this study are relevant for future research looking to take advantage of the mechanical properties of the extracellular medium to enhance or inhibit response to Sema3A, and in the design of biomaterials for the treatment of spinal cord injuries.

Keywords:

Growth cone; cytoskeleton; Neuropilin-1; Plexin A4; substrate stiffness

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
APS	Persulfato de Amonio (Ammonium Persulfate)
APTES	(3-Aminopropil)triethoxisilano
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BMP	Proteínas Morfogénicas de Hueso (Bone Morphogenic Proteins)
BACT	β -actina
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2] octano
DCDMS	Diclorodimetil-silano
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Dinucleótidos TriFosfato
ECM	Matriz Extracelular (Extracellular Matrix)
FA	Adhesión Focal (Focal Adhesion)
FAK	Cinasa de Adhesión Focal (Focal Adhesion Kinase)
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GIPC1	Miembro 1 de las Proteínas contenedoras del dominio PDZ (PDZ domain-containing protein, member 1)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRD	Ganglios de la Raíz Dorsal
HAB	Hidrogel de Acrilamida/Bisacrilamida
HEPES	2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperacilil]-etanosulfónico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
L1 CAM	Molécula de Adhesión Celular L1 (Cell Adhesion Molecule L1)
MSCs	Células Troncales Mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells)
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso (Neural Growth Factor)
Nrp-1	Neuropilina-1
NSPC	Célula Troncal/Progenitora Neural (Neural stem/progenitor cell)
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBS	Solución salina de fosfatos (Phosphate-buffered saline)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
PFA	Paraformaldehído
PLO	Poli-L-Ornhitina
PlexA4	Plexina A4
PSI	Dominio Plexinas-Semaforinas-Integrinas (Plexins-Semaphorins-Integrins domain)
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (Quantitative Polimerase Chain Reaction)
Sema3A	Semaforina 3A
SNC	Sistema Nervioso Central
Sulfo-SANPAH	Sulfosuccinimidil-6-[4'-azido-2'-nitrofenilamino]hexanoato
TEMED	Tetrametiletilendiamina (Tetramethylethylenediamine)
VASP	Fosfoproteína Estimulante de la Vasodilatación (Vasodilator-stimulated phosphoprotein)
VEGF	Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)
Ywhaz	Tirosín 2-monooxigenasa/triptófano proteína de activación 5-monooxigenasa polipeptido Z

Índice

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

1.1. Estructura y función del cono de crecimiento

1.2. Mecanismos celulares y moleculares implicados en la proyección y retracción de neuronas

1.3. Anatomía y función de los Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD)

1.4. Mecanismos de guiado axonal

1.5. Semaforinas

1.6. La matriz extracelular y el impacto de sus propiedades físicas en el comportamiento celular

1.7. Antecedentes directos

2. JUSTIFICACIÓN

3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

4. OBJETIVO GENERAL

4.1. Objetivos específicos

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Variables de estudio

5.2. Cultivo de neuronas de GRD

5.2.1. Elaboración de hidrogeles de acrilamida/bisacrilamida (HAB)

5.2.2. Cultivo de neuronas de GRD sobre HAB

5.3. Inmunocitoquímica

5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

5.5. Análisis estadístico

6. RESULTADOS

6.1. Modulación de la morfología de neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez

1

2

2

6

10

11

12

17

19

21

24

25

25

26

26

26

27

30

32

35

40

41

41

6.2. Cambios en la distribución del citoesqueleto en los conos de crecimiento de neuronas de GRD cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez	47
6.3. Expresión de ARN mensajero de los receptores a Sema3A, Nrp-1 y PlxA4 en neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez	50
6.4. Distribución del receptor a Sema3A, Nrp-1 en neuronas de GRD cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez	53
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIONES	65
9. PERSPECTIVAS	66
10. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD	67
REFERENCIAS	68
ÍNDICE DE FIGURAS	77
ÍNDICE DE GRÁFICAS	77
ÍNDICE DE TABLAS	77
ANEXO 1	78
ANEXO 2	80

Introducción

Actualmente, existe una alta incidencia de padecimientos en los que ocurre un daño a un órgano o tejido que impide su funcionamiento e incluso en muchos casos lleva a la discapacidad o muerte. Ante este problema, las terapias de sustitución celular y la medicina regenerativa están desarrollando nuevas estrategias centradas en la regeneración de tejidos y órganos, mediante la sustitución de las células dañadas, o mediante la estimulación de la proliferación y diferenciación de la población celular endógena. En el caso particular del sistema nervioso, los retos para lograr una terapia de regeneración exitosa implican no sólo el obtener los tipos neuronales específicos, o inducir el reclutamiento de nuevas neuronas endógenas, sino lograr su plena integración y funcionalidad en el intrincado sistema de conexiones neuronales. La proyección de axones ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario, pero también durante procesos de plasticidad y regeneración neuronal, y es modulada por la presencia de proteínas y componentes de matriz extracelular que determinan la proliferación, el crecimiento y la orientación de las neuritas hasta las células blanco, mediante la proyección estereotípica de las mismas, formando así las complicadas redes neuronales.

Actualmente se sabe también que la rigidez del sustrato sobre el que proyectan las neuronas, es relevante para inhibir o estimular la formación y elongación de neuritas; sin embargo, existen pocos estudios acerca de cómo interaccionan las diversas señales que componen el micro ambiente en el cual se forman las proyecciones. Este proyecto se centra en estudiar cómo las propiedades mecánicas del sustrato modulan la morfología del cono de crecimiento de neuronas de ganglios de la raíz dorsal, la distribución del citoesqueleto y la expresión y distribución de los receptores para la proteína quimiotrópica semaforina 3A, implicada en la proyección de axones de estas neuronas, para contribuir así al conocimiento básico que sustente el diseño de sustratos para estimular la adecuada neuroregeneración.

1. Antecedentes

El Sistema Nervioso Central (SNC) es una estructura anatómicamente compleja, formada por diversos tipos celulares entre los que se destacan las neuronas, las cuales son consideradas la unidad funcional de este tejido.

El tejido neural se forma a partir de la placa neural del ectodermo embrionario por un proceso conocido como neurulación, en el que a través de la inhibición de morfógenos como las Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMP's), y la activación de otras como Noggin, Cordina y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), se induce la expresión de factores de transcripción que desencadenan la neurogénesis^{1,2}.

Una vez diferenciadas, las neuronas comienzan el proceso de proyección de sus prolongaciones celulares, conocidas de manera genérica como neuritas y de manera particular como axones y dendritas, para establecer conexiones con otras neuronas adyacentes o localizadas en sitios distantes y formar los circuitos neuronales. Este proceso se lleva a cabo mediante una serie de eventos regulados por mecanismos moleculares específicos que promueven o inhiben la proyección neural, y que son dirigidos por una estructura localizada al final de la proyección, denominada cono de crecimiento.

1.1. Estructura y función del cono de crecimiento

El cono de crecimiento es una estructura especializada localizada en el extremo del axón o dendrita, cuya función es detectar las señales que sirven de guía extracelular, e integrarlas en un movimiento de proyección direccionada hasta la célula blanco de innervación³. El cono de crecimiento fue descrito por primera vez por el neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal en 1890, quien lo describió como una "protuberancia cónica terminal cubierta por expansiones espinosas muy irregulares y con movimientos ameboides, la cual a veces posee

extensiones más largas, triangulares, laminares, a veces ramificadas, que parece deslizarse entre los elementos nerviosos buscando su camino a través del cimiento intersticial”⁴. En 1907, el biólogo estadounidense R. G. Harrison observó en vivo los conos de crecimiento, y proporcionó evidencias de que el cono de crecimiento es una estructura motil que tiene energía suficiente para poder guiarse a través del “protoplasma” de las células de explantes del tubo neural, siguiendo señales extrínsecas, lo que le permitió inferir que los axones son guiados por características mecánicas del sustrato o por campos eléctricos. Estos resultados dieron paso a otras interrogantes acerca del mecanismo y condiciones que guían a las células neurales hasta el sitio blanco de innervación^{3,5}, las cuales tuvieron respuesta muchos años después, con ayuda de los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular y la óptica.

Recientemente, los métodos ópticos de alta resolución han permitido obtener imágenes de neuronas cultivadas en las cuales se puede estudiar detalladamente el citoesqueleto del cono de crecimiento, llegando hasta un nivel subcelular⁶; así mismo, estudios de morfología que utilizan microscopia de fuerza atómica, han demostrado que el cono de crecimiento está constituido por materiales blandos con diferente rigidez, de acuerdo a las diferentes zonas del mismo, así como por un material más rígido, que forma parte del citoesqueleto de la célula, es decir, la expresión diferencial de proteínas en las distintas zonas del cono no sólo tiene que ver con la función que esté realizando, sino también con su estructura⁷.

El citoesqueleto es el componente de la célula que le da soporte y estructura, además de tener otras funciones importantes; su dinámica está implicada en el proceso de motilidad celular⁸, y está constituido por tres tipos de filamentos proteicos: filamentos de actina, microtúbulos (constituidos por α y β -tubulina), y filamentos intermedios (neurofilamentos, en el caso de células neuronales)⁹.

El principal componente del citoesqueleto -que le da forma al cono de crecimiento- es F-actina, la cual es esencial en el proceso de guiado axonal, mientras que los microtúbulos (MT's) son los que le dan estructura al axón y tienen una función importante durante la elongación axonal⁶.

De acuerdo a la distribución del citoesqueleto, el cono de crecimiento se puede dividir en tres dominios, el dominio central (dominio C), en el que se encuentran haces estables de microtúbulos que entran al cono de crecimiento a partir del eje del axón, también hay organelos, vesículas y haces de actina; el dominio periférico (dominio P), que se sitúa en la parte más externa del cono de crecimiento, y contiene filamentos de actina (haces de F-actina) que forman los filopodios, así como también una red de F-actina que conforma los lamelipodios. También existen microtúbulos dinámicos que se extienden desde el dominio C, e invaden el dominio P del cono de crecimiento siguiendo a los haces de F-actina. Finalmente, la zona intermedia entre el dominio C y el dominio P, se denomina zona de transición (zona T), en la cual existen estructuras contráctiles de actomiosina que se sitúan de manera perpendicular a los haces de F-actina¹⁰. En el dominio P del cono de crecimiento, existen dos estructuras a partir de las cuáles éste puede comenzar el proceso de elongación, los lamelipodios y los filopodios³ (Figura 1).

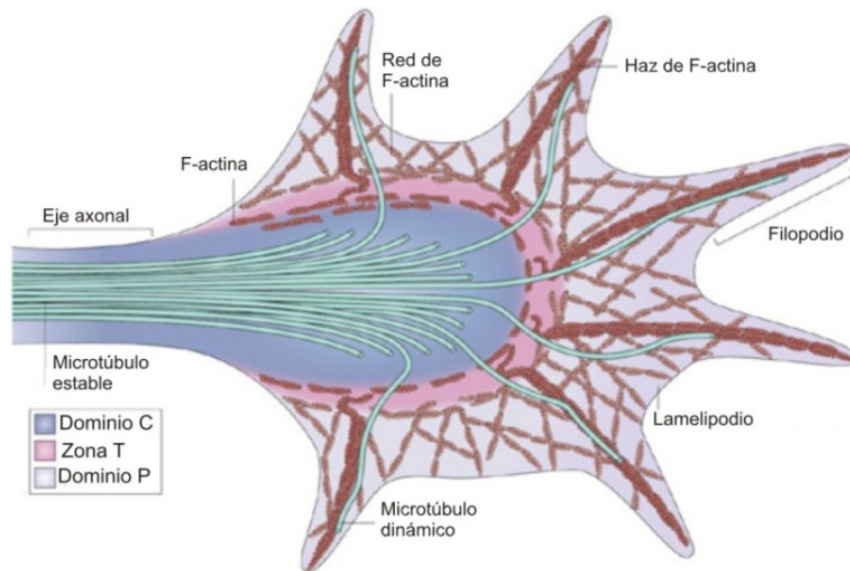


Figura 1. Distribución de los elementos del citoesqueleto en el cono de crecimiento.

Los microtúbulos estables organizados constituyen el eje del axón, en el dominio central (dominio C) del cono de crecimiento; en el lado opuesto, en la zona periférica se sitúa el dominio P, constituido por un red de filamentos de actina (F-actina) que conforman los lamelipodios del cono de crecimiento, así como por haces de F-actina que conforman los filopodios. La región intermedia se denomina zona de transición (zona T) y en ella se encuentran microtúbulos dinámicos que intervienen en el proceso de elongación axonal. Adaptada de Lowery y Van Vactor¹⁰.

Los lamelipodios se localizan en los bordes del extremo del cono de crecimiento, los cuales son ricos en filamentos de actina, mientras que los filopodios son prolongaciones delgadas, de aproximadamente 100-200 nm de diámetro y de 10 μm o más de longitud, que emergen de la superficie del borde del cono de crecimiento del axón o dendritas, formándose y desapareciendo rápidamente, explorando así el ambiente local; los filopodios están constituidos por un núcleo de 10-30 filamentos de actina muy juntos organizados paralelamente para formar el eje del filopodio (Figura 2), en cuya punta existen complejos de proteínas que ayudan a mantener unidos los filamentos al que dan forma, y que están involucradas en el ciclo de elongación y retracción del cono de crecimiento¹¹.

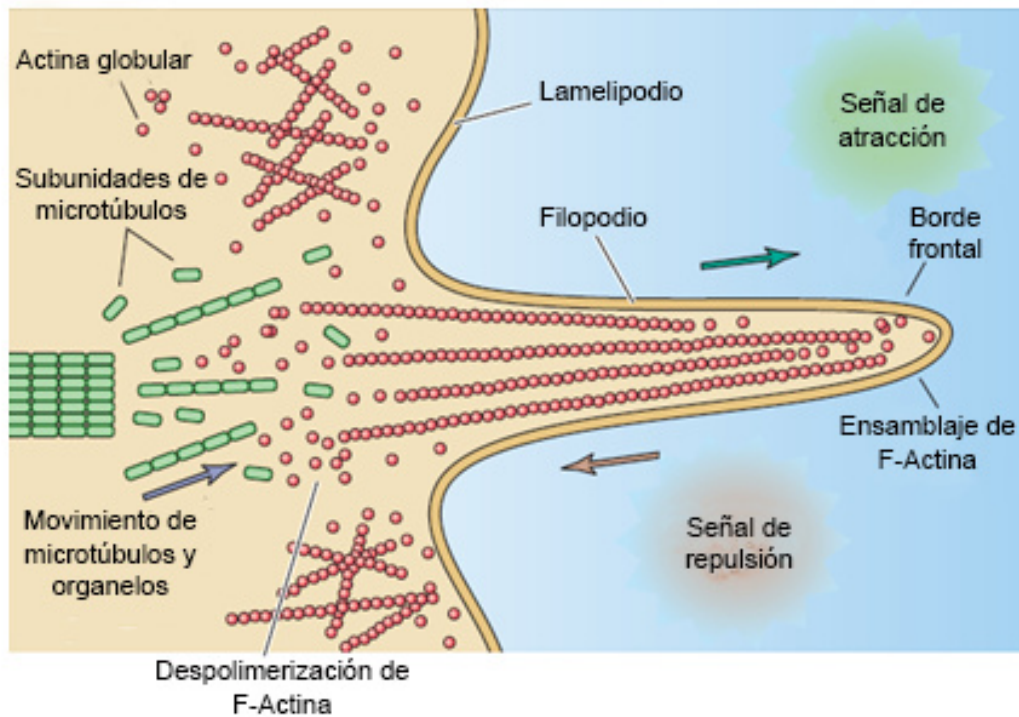


Figura 2. Distribución y dinámica de los elementos del citoesqueleto en el cono de crecimiento. La actina globular (G-actina) se polimeriza y ensambla formando F-actina en el extremo frontal del filopodio en respuesta a señales de atracción. Las señales de repulsión estimulan el desensamblaje de F-actina hacia el lamelipodio. Los microtúbulos organizados constituyen el núcleo del citoesqueleto del axón y su ensamblaje se lleva a cabo principalmente en la zona adyacente a la zona de desensamblaje de la F-actina. Adaptada de Purves, et al.³

1.2. Mecanismos celulares y moleculares implicados en la proyección y retracción de neuronas

Los cambios en la morfología del cono de crecimiento y en su direccionamiento dependen de la regulación tanto de la dinámica, como del ensamblaje de los filamentos de actina y los microtúbulos. Los filamentos de actina son necesarios en el proceso de proyección axonal y migración neuronal a través de la elongación de los filopodios y lamelipodios, al ejercer estos filamentos una fuerza tensora y a su vez de tracción; sin embargo, en el caso de los conos de crecimiento de neuronas de GRD, se ha reportado que al bloquear la polimerización de estos filamentos utilizando la toxina citocalasina B, la cual inhibe la polimerización de F-actina, los microtúbulos pueden mantener la elongación de las neuritas

ejerciendo una fuerza de “empuje”, a través del transporte anterógrado que se lleva a cabo en ausencia de la elongación dada por los filamentos de actina en los filopodios^{12,13}.

El proceso de elongación o retracción del cono de crecimiento responde a señales extracelulares que sirven de guía hacia un blanco específico, y que desencadenan una compleja red de mecanismos de transducción de señales que, en conjunto, se traducen en movimiento de elongación hasta el sitio blanco, y en anclaje a la matriz extracelular, o de retracción del cono de crecimiento y re-direccionamiento de la proyección axonal.

Morfológicamente, el cono de crecimiento pasa por tres etapas para formar nuevos segmentos del axón durante el proceso de elongación: alargamiento, donde ocurre una elongación de los filopodios y lamelipodios a través de la polimerización de los filamentos de F-actina; engrosamiento, donde hay una invasión de vesículas y organelos a través del transporte en los MT's; y finalmente, la consolidación, que ocurre cuando la parte proximal del cono de crecimiento se constriñe, asumiendo una forma cilíndrica y el transporte de organelos se vuelve bidireccional, agregándose así un nuevo segmento del axón⁶ (Figura 3).

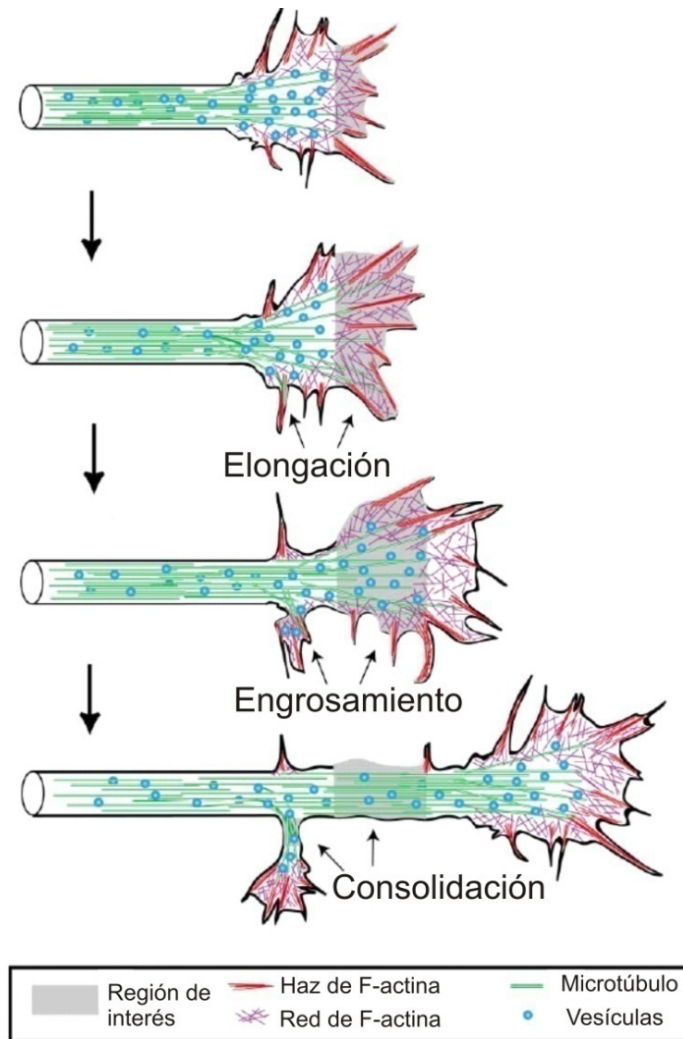


Figura 3. Etapas de formación de un nuevo segmento axonal. Al haber una señal atrayente, en primera instancia ocurre una elongación de los filopodios y lamelipodios del cono de crecimiento, a través de la polimerización de los haces de filamentos de F-actina (rojo); posteriormente ocurre un engrosamiento en los lamelipodios debido a la invasión de vesículas y organelos (azul) a través del movimiento browniano y transporte dirigido por microtúbulos (verde), y finalmente ocurre la consolidación axonal cuando la parte proximal del cono de crecimiento se constriñe, asumiendo una forma cilíndrica y formando así un nuevo segmento del axón. Adaptada de Dent y Gertier⁶.

Las señales de guiado axonal involucran la actividad de proteínas de unión a GTP de la familia Rho, como Cdc42, Rac y RhoA, que son reguladores clave de la dinámica de la actina del citoesqueleto, ya que participan en el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina mediante el control de la polimerización de G-actina, también dirigen el flujo retrógrado de F-actina dependiente de la contractilidad actina-miosina en el cono de crecimiento¹⁴. Se ha reportado que la

contractilidad de miosina II potencia el rompimiento del filamento de actina en la zona T del cono de crecimiento, definiendo un límite entre el eje del axón y el lamelipodio, además de controlar la tasa de flujo retrógrado de F-actina en esta zona¹⁵.

El flujo retrógrado de actina es un fenómeno constitutivo que ocurre en los filopodios y lamelipodios y es promovido por la proteína motora miosina; este fenómeno ocurre cuando la ATP-actina ensamblada en los filamentos cercanos a la membrana distal en el dominio P, es hidrolizada y transportada hacia la zona T como F-actina polimérica. Ya en la zona T, los monómeros de ADP-actina se despolimerizan por proteínas específicas, por ejemplo gelsolina o cofilina, y se reciclan en ATP-actina para repetir el ciclo, por lo que mientras los filamentos de F-actina van empujando la membrana celular durante la elongación, también se empujan a sí mismos hacia atrás, es por eso que se conoce como flujo retrógrado⁶.

La adhesión del cono de crecimiento al sustrato, ocurre en forma de “puntos de contacto” (contact points), en donde están involucrados complejos proteicos que permiten la adhesión y generación de fuerza de tracción sobre el sustrato¹⁶. En 2008, Chan y Odde construyeron un modelo físico estocástico del sistema de transmisión de fuerzas basado en el principio “motor-embrague”; su simulación mostró que en sustratos rígidos, los embragues moleculares de miosina enganchan los filamentos de F-actina, pero se desenganchan rápidamente, resultando en una rápida generación de tensión dentro de los embragues que drásticamente acortan la vida útil de la interacción de miosina-F-actina, aumentando el flujo retrógrado. Mientras que en sustratos más blandos, hay un alto número de embragues de miosina interactuando con F-actina, que provocan que se ralentice la velocidad a la que se acumula la tensión, prolongando el tiempo de interacción miosina-F-actina, aumentando la fuerza de tracción, lo que incrementa, a su vez, gradualmente la tensión del sustrato, hasta que ocasiona una falla abrupta del acoplamiento, por lo que disminuye el flujo retrógrado de

F-actina y finalmente genera que se pierda la adhesión al sustrato, y ocurre una rápida retracción del filopodio hacia el punto inicial, ocasionando periodos cortos de proyección seguidos de abruptos periodos de retracción¹⁷.

Por otra parte, la extensión de los microtúbulos en el dominio P está regulada tanto por los haces de F-actina, como por el flujo retrógrado, que capturan y guían el crecimiento de los microtúbulos. Esta extensión ocurre mediante uniones físicas de los haces de F-actina con los extremos finales de los microtúbulos, a través de proteínas de entrecruzamiento¹⁸, y es un mecanismo eficiente para hacer llegar los microtúbulos hacia sitios particulares, como el extremo del filopodio o las adhesiones focales en el dominio P¹⁹.

1.3. Anatomía y función de los Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD)

La médula espinal es la parte del SNC que se ubican en el canal vertebral desde el foramen magnun hasta el borde superior de la segunda vértebra lumbar (L2); es la estructura encargada de recibir y procesar la información sensorial de la piel, las articulaciones y músculos de las extremidades y el tronco. Se subdivide en las regiones cervical, torácica, lumbar, y sacra; la médula espinal tiene forma cilíndrica pero aplanada dorsoventralmente.

Las fibras nerviosas que unen la espina dorsal con los músculos y los receptores sensitivos de la piel, están agrupados en 31 pares de nervios espinales, cada uno de los cuales tiene una división sensorial que emerge de la cara dorsal de la médula (la raíz dorsal), y una división motora que emerge de la cara ventral (la raíz ventral), formando así el sistema somatosensorial. Las raíces dorsales llevan la información sensorial de la médula espinal a los músculos y la piel. Las neuronas sensoriales que transmiten información desde la piel y los músculos, se encuentran agrupadas en los Ganglios de la Raíz Dorsal (GRD) dentro de la columna vertebral; estas neuronas tienen un axón bifurcado con ramificaciones centrales y periféricas, y las terminaciones de la rama periférica inervan piel, músculo y otros tejidos^{20,21}.

Las neuronas sensoriales se derivan de las crestas neurales y migran a través de las somitas en el mesodermo durante el desarrollo embrionario, para agruparse en los GRD adyacentes al tubo neural²²; se ha reportado que el crecimiento de los primeros nervios aferentes en la sustancia gris de la médula espinal en ratas ocurre en el día 14 de la etapa embrionaria (E14), en forma de fibras originadas de la columna dorsal media y que proyectan ventralmente a través del límite de la zona neuroepitelial²³. A continuación se abordarán con detalle los mecanismos implicados en el guiado axonal de estas neuronas que culmina con la invasión en los sitios blanco.

1.4. Mecanismos de guiado axonal

Como se mencionó anteriormente, las neuronas proyectan sus neuritas hacia blancos específicos, guiados por señales extracelulares que son integradas por el cono de crecimiento. Estos mecanismos se basan en la interacción con proteínas quimiotrópicas secretadas, o ancladas al sustrato, por ejemplo las proteínas Slit o semaforinas.

También las interacciones directas entre axones que se extienden a lo largo de una trayectoria específica, mediada por proteínas ancladas a la membrana celular, por ejemplo cadherinas e inmunoglobulinas^{24,25}, pueden guiar las proyecciones neurales. Además de la selección de una vía específica, la dirección de crecimiento de los conos de crecimiento responde a la detección de señales asociadas con el sustrato; también responden a gradientes de moléculas difusibles que sirven de guía hasta su blanco de invasión, estas moléculas pueden ser de quimioatracción o de quimiorrepulsión, y la matriz extracelular puede estabilizar gradientes de moléculas provenientes de células blanco o células intermediarias extendiéndolos a una mayor distancia²⁵.

1.5. Semaforinas

Las semaforinas son moléculas con propiedades tanto quimiorrepulsivas como quimioatrayentes, y constituyen una de las familias más grandes de proteínas quimiotrópicas filogenéticamente conservadas, pueden ser secretadas o transmembranales, y se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso, actuando en el direccionamiento axonal, la fasciculación, la ramificación y la formación de sinapsis^{24,26}. Estas proteínas están involucradas en dirigir los axones de GRD hacia su blanco final, principalmente durante el desarrollo embrionario, aunque también se expresan en el organismo adulto y en algunos casos forman parte del ambiente inhibitorio que impide la regeneración neuronal²⁷.

La familia de semaforinas consta de más de 20 miembros divididos en ocho clases; las familias de clase 1 y 2 corresponden a invertebrados; las de clase 3, 4, 6 y 7 a vertebrados; las de clase 5 existen tanto en vertebrados como en invertebrados, y la clase V corresponde a semaforinas virales^{28,29}. Las semaforinas de clase 2 y 3 son proteínas secretadas, mientras que las de clase 1, 4, 5, 6 y 7 están ancladas a membrana, todas contienen un dominio extracelular de aproximadamente 500 aminoácidos llamado dominio sema (Figura 4).

La primera semaforina identificada fue la semaforina 3A (Sema3A) por Luo y cols. (1993), quienes demostraron su habilidad de actuar como factor quimiorrepelente induciendo el colapso y retracción de los conos de crecimiento en neuronas de GRD³¹. Se ha demostrado que las semaforinas además de tener la habilidad de guiar el crecimiento axonal mediante esta acción quimiorrepelente, también tienen una función quimioatrayente, incluso la misma semaforina puede tener ambas habilidades dependiendo del tipo celular, así como de la expresión de receptores y las propiedades químicas del tejido circundante^{24,32}, no obstante, el papel que juegan las propiedades físicas de la matriz celular circundante en la actividad y respuesta a semaforinas, aún no se han estudiado a fondo. Además del papel de Sema3A en el SNC, se ha demostrado su participación en las interacciones que

regulan la homeostasis inmunológica^{28,33}, también tiene participación en la angiogénesis que ocurre en el sistema vascular³².

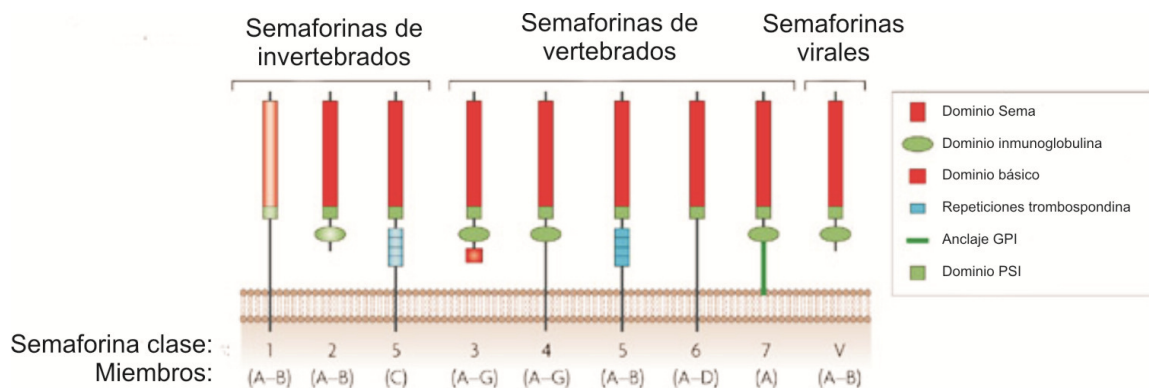


Figura 4. Esquema de las diferentes clases de semaforinas y sus características estructurales. Todas las semaforinas tienen un dominio amino terminal SEMA fundamental para la señalización. Tienen un dominio PSI (Dominio Plexinas-Semaforinas-Integrinas) que tiene homología con el dominio N-terminal de β integrinas, y todas las semaforinas de vertebrados (excepto las clase 5 y 6) tienen un dominio similar a inmunoglobulina. Las semaforinas 1 y 2 son de invertebrados y las semaforinas clase 5 se encuentran tanto en invertebrados como en vertebrados; las semaforinas clase V corresponden a semaforinas virales. Las semaforinas clase 2 y 3 son secretadas y tienen un dominio básico altamente conservado en el extremo C-terminal. Las semaforinas clase 4 a 7 poseen un dominio glicofosfatidilinositol (GPI) que las ancla a los ácidos grasos de la membrana celular. Las semaforinas clase 5 tienen un dominio de repeticiones de trombospondina. Adaptada de Neufeld y Kessler³⁰.

Sema3A es una proteína que se encuentra como dímero no covalente (unido por puentes disulfuro), formando gradientes en la matriz extracelular; cada monómero de Sema3A se une con el otro a través de cuatro asas que sobresalen de la superficie de la proteína, mismas que interactúan entre sí para formar una interfase con residuos tanto hidrofóbicos, como polares³⁴.

Se sabe que el receptor identificado para Sema3A es un heterodímero formado por la glicoproteína Neuropilina-1 (Nrp-1) y la glicoproteína con puentes disulfuro identificada como Plexina A (PlxA), de la 1 a la 4. La unión del homodímero en solución de Sema3A induce la heterodimerización de las moléculas de Nrp-1 y PlxA^{34,35} (Figura 5); Nrp-1 por sí sola no tiene la habilidad de transducir la señal de

Sema3A, por lo que al formar el complejo receptor con PlxA, esta última es quien transduce la señal río abajo por su porción citoplasmática e induce la respuesta repulsiva y el colapso del cono de crecimiento³⁶; siendo el blanco principal de esta vía de transducción de señal, la actina del citoesqueleto³⁷.

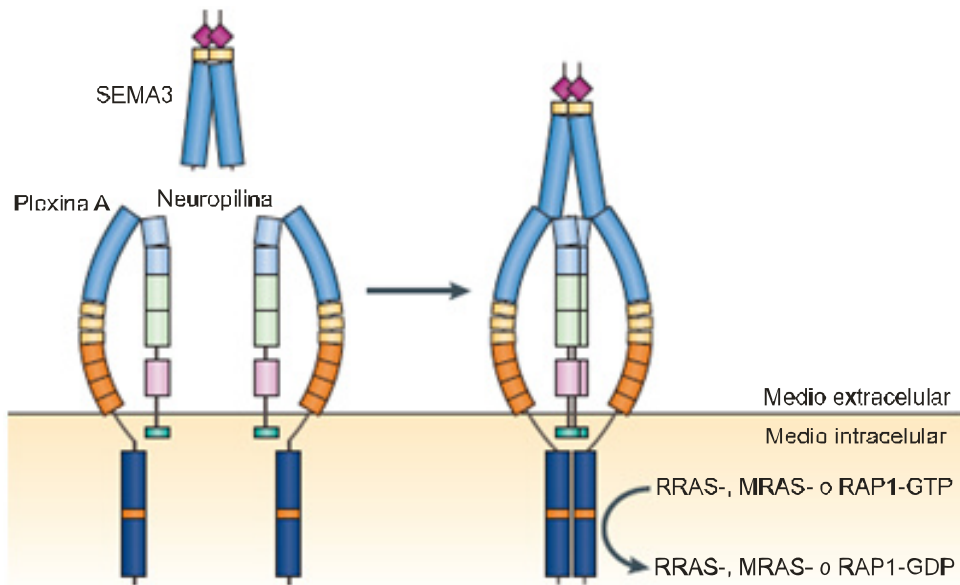


Figura 5. Formación del complejo receptor Sema3/Neuropilina/Plexina A. El homodímero de SEMA3 se une a su complejo receptor Neuropilina/Plexina A, induciendo la heterodimerización de dos moléculas de Plexina A estabilizadas por Neuropilina, resultando en la activación de la señalización río abajo mediada por Plexina A. Adaptada de Worzfeld y Offermanns³⁵.

De las PlxA descritas, se ha reportado que PlxA1, PlxA2 y PlxA4 median la señalización de Sema3A con Nrp-1, pero no así PlxA3³⁸, cuyo papel principal tiene que ver más con la señalización pro-apoptótica inducida por Sema3A³⁹; asimismo, el receptor Nrp-1 se une preferencialmente –pero no exclusivamente- con PlxA4 en neuronas sensoriales de GRD⁴⁰. PlxA4 tiene un papel importante en la propagación de la actividad de Sema3A y en la regulación del guiado axonal en GRD⁴¹, siendo quizás la plexina A con mayor afinidad por Sema3A. La asociación de PlxA4 con PlxA2 incrementa la afinidad de PlxA2 a la Nrp-1 y esto permite la formación de los complejos receptores funcionales de señalización; no obstante, el

nivel y los cambios en la expresión de las distintas PlxA pueden generar distintas respuestas en células en migración que se encuentren con los gradientes de semaforinas⁴².

Aunque los efectos de colapso de la Sema3A son bien conocidos, las vías de señalización intracelular que conducen a los eventos celulares de colapso aún continúan en investigación. Las CRMP (collapsin-response-mediator protein) o proteínas mediadoras de la respuesta a colapsina (como originalmente se denominó a las semaforinas), son una familia de fosfoproteínas citosólicas que tienen un papel crucial en la transducción de señal del complejo Sema3A/Nrp-1/PlxA mediante la fosforilación de ciertos residuos y cambios conformacionales en su estructura, las cuales activan vías de señalización de proteínas G pequeñas. Particularmente, la unión de PlxA4 a GTPasas pequeñas es crítica para la estimulación del colapso del cono de crecimiento, a través de la unión del dominio H/RBD de PlxA4 a GTPasas pequeñas⁴³, las cuales tienen que ver con la modulación de la dinámica del citoesqueleto y con la endocitosis durante el colapso del cono de crecimiento^{44,45} (Figura 6).

La endocitosis resultado del efecto de colapso inducido por Sema3A, es mediada por L1 CAM, una molécula de adhesión de la súper familia Ig CAM. La molécula L1 CAM media la internalización de Nrp-1 durante la exposición a Sema3A, sugiriendo un papel funcional en la señalización de Sema3A, la cual, a su vez, se relaciona con la regulación de la adhesión a la matriz extracelular, ya que Nrp-1 es co-internalizado junto con proteínas de adhesión, como integrinas, de manera temporal y coordinada cuando ocurre la activación de la señalización mediada por Sema3A⁴⁶.

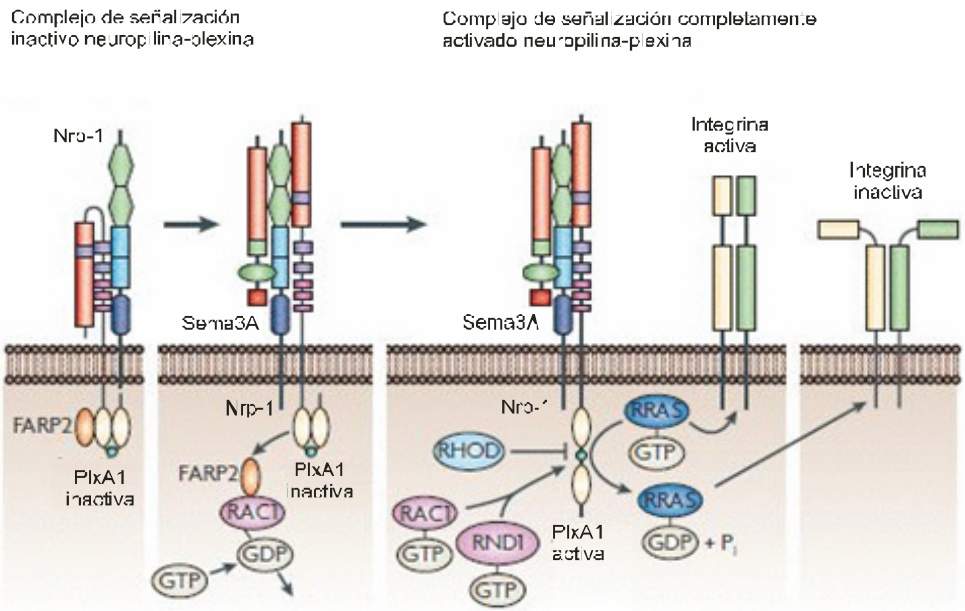


Figura 6. Mecanismo molecular por el cual semaforina 3A (Sema3A) inhibe la adhesión celular a la matriz extracelular. Antes de que Sema3A se una al complejo receptor, el dominio Sema de PlexinaA1 (PlxA1) auto-inhibe la activación espontánea de la señalización; la unión de Sema3A a Neuropilina-1 (Nrp-1) induce un cambio conformacional en la PlxA1 que libera esta auto-inhibición. Después de la unión de Sema3A con Nrp-1, FARP2 (asociado con PlxA1) se disocia y promueve la unión de GTP a RAC1 (GTPasa pequeña). RAC1 activada es reclutada por PlxA1 y promueve el reclutamiento de la RND1 (GTPasa pequeña) activada, esto induce la activación del dominio GAP de PlxA1, que resulta en el reclutamiento de RRAS (GTPasa pequeña) activada. El dominio GAP de PlxA1 activa la función intrínseca de GTPasa de RRAS resultando en su inactivación, ya que RRAS es un regulador de la función de integrinas, su inactivación conduce a la inactivación de integrinas, lo cual induce la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular. La interacción de RND1 con PlxA1 puede inhibir a RHOD (GTPasa pequeña) que se une al mismo sitio de unión de PlxA1, mientras que FARP libre se asocia con la PIP5K (fosfatidilinositol-4-fosfato 5 cinasa) e inhibe su interacción con la proteína de adhesión focal talina, lo cual lleva a la supresión de la función de integrina y al desensamblaje de las adhesiones focales. Adaptada de Neufeld y Kessler³⁰.

Nrp-1 interactúa físicamente con la integrina $\alpha 5 \beta 1$, formando un complejo integrina $\alpha 5 \beta 1$ -Nrp-1 que es rápidamente internalizado mediante la formación de endosomas. La integrina $\alpha 5 \beta 1$ regresa nuevamente a la membrana, para favorecer la formación de nuevos sitios de adhesión pero Nrp-1 se queda vacuolizado en el citoplasma, listo para volver a la membrana, este “reciclaje” podría estar dirigido por proteínas de adhesión ya que Nrp-1 tiene un dominio

extracelular que interactúa con la integrina $\alpha 5\beta 1$, pero también tiene un dominio citoplasmático, en el extremo C-terminal, de unión a la proteína adaptadora endocítica 1 (GIPC1), la cual, a su vez, se relaciona con proteínas requeridas para estimular la adhesión celular mediante los complejos de adhesión, la internalización de integrinas y la motilidad de las vesículas⁴⁷.

1.6. La matriz extracelular y el impacto de sus propiedades físicas en el comportamiento celular

Un aspecto importante que ha sido poco abordado en el campo de la proyección axonal, es el estudio de los componentes de matriz extracelular que forman parte del medio extracelular que mantiene y circunda a las células o que se encuentran distribuidos a lo largo de las vías de proyección de axones⁴⁸⁻⁵⁰. La matriz extracelular no solamente forma parte del soporte en el que se dividen y mantienen las neuronas, sino que tiene por sí misma un papel relevante en la señalización y determinación de los procesos de diferenciación, migración y elongación de las neuritas⁵¹⁻⁵³. Además de la composición química de la matriz extracelular, actualmente ha aumentado el interés por el estudio del papel que tienen las propiedades físicas del sustrato en el que se encuentran las células, tales como la topografía y la rigidez.

Estudios recientes han evidenciado que la topografía y la rigidez del sustrato determinan procesos celulares como diferenciación, proliferación y migración⁵⁴⁻⁵⁶. Particularmente, el trabajo de Engler y cols. (2006) demostró por primera vez que la rigidez del sustrato en el cual se cultivan *in vitro* células troncales puede modular su diferenciación hacia diferentes tipos celulares como hueso, músculo, o neuronas⁵⁷. Otro trabajo, realizado por Eroshenko y cols. (2013) demostró que la rigidez del sustrato afecta la proliferación de células troncales humanas embrionarias del linaje mesodérmico, no así la propagación celular o la adhesión al sustrato; concluyendo que la rigidez del sustrato es una variable importante que

debe ser considerada en el desarrollo de protocolos de proliferación y diferenciación de células troncales⁵⁸.

Quizá, lo más abordado ha sido el papel de la rigidez en la elongación de las neuritas; por ejemplo, Flanagan, et al. (2002), reportaron que al crecer neuronas primarias de espina dorsal de ratón (E13.5) en matrices con poca rigidez, cercana a la encontrada en el cerebro, la elongación de las neuritas fue mayor. Sin embargo, existen divergencias en los datos y modelos utilizados^{55,56,59}, ya que también se ha reportado que en sustratos más blandos, células de la línea celular PC12 muestran pocas neuritas, relativamente cortas y no ramificadas, mientras que en sustratos más rígidos, las neuritas de neuronas y astrocitos de rata (E17-E19) resultan ser más largas y ramificadas. Se ha sugerido también que el proceso de elongación de neuritas, tiene que ver con la migración de células tales como los fibroblastos, evidenciando que esta elongación del cono de crecimiento axonal, además de responder al estímulo mecánico que ejerce el sustrato, también se ve alterado por la presencia e interacción de unas células con otras^{60,61}.

Respecto al efecto que ejercen las características físicas del sustrato en el cual se encuentran las células, Yang y cols. (2014) encontraron que células troncales mesenquimales humanas guardan la información mecánica del ambiente en el que están, lo cual llaman "dosificación mecánica", y que esto puede influir en el destino de diferenciación de las células a través de una "memoria mecánica". Un aspecto importante es que esta "memoria mecánica" se regula a nivel genómico mediante la activación de coactivadores transcripcionales relacionados con el proceso de diferenciación de las células troncales hacia tipos celulares específicos; por ejemplo YAP/TAZ, en este caso⁶², lo cual plantea nuevas interrogantes acerca del proceso de mecanotransducción celular y evidencia que las propiedades del sustrato pueden tener un efecto también sobre la regulación de la expresión génica celular.

1.7. Antecedentes directos

Previamente, Ríos (2010) utilizó el modelo de hidrogeles de acrilamida-bisacrilamida (HAB) para estudiar el papel de la rigidez en la proyección neuronal de GRD y su impacto en la respuesta a semaforinas. Los HAB son un modelo experimental ampliamente aceptado y caracterizado como un sistema que permite el cultivo celular y la observación microscópica de la células, sobre sustratos que varían en sus propiedades físicas, de acuerdo con el grado de entrecruzamiento de la acrilamida; en los cuales se puede mantener la composición química o variarla dependiendo de la funcionalización de la acrilamida con diversos componentes de matriz extracelular⁶³⁻⁶⁵. Mediante este modelo se observó la repuesta de los axones de neuronas provenientes de GRD a la proteína quimiotrópica Sema3A, mostrando que la respuesta de retracción de axones ante la Sema3A es modulada dependiendo de la rigidez del sustrato⁶⁶.

Se demostró que en sustratos blandos, cercanos a la rigidez del cerebro, el efecto de colapso del cono de crecimiento mediado por la Sema3A –y medido como la disminución del número de filopodios y del área del cono de crecimiento- se ve inhibido, por lo que el cono de crecimiento tiene incluso mayor número de filopodios cuando se encuentra en un sustrato blando; mientras que, conforme aumenta la rigidez del sustrato aumenta nuevamente el efecto de colapso mediado por Sema3A. Estos resultados pueden tener importantes repercusiones en la comprensión de la acción de factores implicados en la proyección de axones y la modulación de la morfología del cono de crecimiento, ya que al parecer su efecto puede estar determinado por el sustrato en el que se encuentran las neuronas y, por tanto, podría variar dependiendo de las propiedades de la matriz circundante; por ejemplo, si se tratase de tejido normal (intacto) o de una cicatriz glial (que ocurre cuando tras una lesión del SNC, como forma de reparación, existe una proliferación de astrocitos que depositan colágena y forman una barrera conocida como “cicatriz glial”)⁵⁴.

Por lo anterior en el presente trabajo se pretende estudiar el efecto de la rigidez del sustrato sobre la modulación de la morfología y distribución del citoesqueleto del cono de crecimiento de neuronas de GRD, también estudiar el efecto de la rigidez del sustrato sobre la expresión y distribución de los receptores a la proteína quimiorrepelente Sema3A, en neuronas GRD, ya que se ha reportado que es una de las señales extracelulares que impiden una adecuada regeneración en los sitios de lesión medular. Lo anterior, para tratar de aportar evidencias que permitan aprovechar los efectos de la rigidez del sustrato para proponer su uso como parte de tratamientos neurorregenerativos en padecimientos de alta incidencia, tales como lesiones medulares, provocadas principalmente por traumatismo (accidentes automovilísticos, caídas, heridas por armas de fuego, etc.), pero también por diferentes enfermedades (tuberculosis vertebral, atrofia espinal, entre otras).

2. Justificación

El cerebro es uno de los tejidos más blandos del cuerpo humano (~0.1-1 kPa). El estudio del comportamiento de neuronas o células precursoras neurales en sustratos que simulan las propiedades físicas que se encuentran en el cerebro, puede proveer información valiosa y más cercana al ambiente o nicho en el que las células se encuentran *in vivo*; por otra parte la comprensión de los mecanismos biológicos que rigen los fenómenos celulares observados sobre sustratos con rigidez variable, son determinantes para entender procesos como el crecimiento axonal y para, en un futuro, no sólo diseñar sustratos biocompatibles que mimeticen el tejido y potencialicen así la regeneración y la proyección axonal, sino también conocer la respuesta de los receptores a Sema3A ante el estímulo mecánico del medio y aprovechar estas respuestas, junto con las propiedades ya reportadas de moléculas como la Sema3A para la elaboración de posibles tratamientos terapéuticos en casos de daño de la red neural, como es el caso de las lesiones medulares.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la incidencia mundial de lesiones medulares oscila entre 40 y 80 casos por cada millón de habitantes, la mayor parte de estas lesiones son debidas a accidentes de tránsito, caídas o hechos violentos⁶⁷. En México, no se tienen datos recientes de la incidencia de lesiones medulares, sin embargo, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reporta que la prevalencia de discapacidad en México para 2014 fue del 6% y de este segmento, el 15% corresponde a discapacidad originada por lesiones consecuencia de algún accidente⁶⁸; estas lesiones afectan principalmente a la población en edad productiva (16-30 años)⁶⁹, representando un foco de atención importante para la salud pública debido al alto costo asociado a la atención subsecuente que implica consecuencias sociales y laborales importantes⁷⁰.

Actualmente, los estudios para el tratamiento de las lesiones medulares se encaminan a la búsqueda de alternativas que reparen el daño mediante la reconstitución de las poblaciones celulares afectadas, para lo cual el foco de atención se ha centrado en la investigación para la terapia con células troncales (conocidas también como células madre). Sin embargo, es necesario también llevar a cabo la investigación básica para conocer el microambiente en el cual se encuentran las células ya diferenciadas y conocer los factores que dirigen o inhiben el crecimiento y elongación neuronal que favorezcan su regeneración después de una lesión, de manera que el enfoque ya no sólo se limite a evitar el daño, si no a intentar su reparación efectiva⁷¹.

Otro de los padecimientos relacionados y que podrían ser impactados por este estudio, es el dolor neuropático, ya que se ha demostrado que una lesión en la espina dorsal resulta en un incremento del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) el cual actúa incrementando la expresión de neuropéptidos y el crecimiento de axones nociceptivos, por lo que se genera una exacerbada respuesta de dolor⁷². Investigaciones en este campo han sentado las bases para el uso de la proteína quimiorrepelente Sema3A de manera terapéutica, para reducir el crecimiento aberrante de las neuritas producido por los altos niveles de NGF en la espina dorsal y que son los que originan el dolor agudo⁷³.

Recientemente, se ha reportado el papel de Sema3A como un potencial blanco terapéutico en enfermedades como isquemia, retinopatía diabética, enfermedad neurotrópica corneal y daño en la médula espinal, ya que se ha visto que al inhibir ya sea la producción o la acción de Sema3A en animales de experimentación, se ha logrado una mejora en el daño provocado por estas enfermedades, ya sea preservando las microvesículas en ratas con retinopatía inducida, reduciendo el deterioro de la retina inducido por la diabetes, promoviendo la regeneración de nervios periféricos corneales e incluso promoviendo la regeneración después de una lesión espinal, respectivamente³⁵. Por lo que, es importante centrar la

atención en las propiedades físicas y químicas que rodean a la célula y que repercuten directamente en la respuesta a la proteína Sema3A.

Se espera que los resultados obtenidos en el presente proyecto contribuyan a la comprensión del efecto de la rigidez del sustrato sobre la modulación de la respuesta a Sema3A, que faciliten a futuro considerar esta propiedad mecánica del sustrato como una alternativa para su posible aplicación en padecimientos de alta incidencia o con pocas alternativas terapéuticas, en las que la regeneración de la red neuronal se vea comprometida.

3. Hipótesis de Investigación

Los sustratos con rigidez variable regulan la expresión y distribución de los receptores Nrp-1 y PlxA4 y la distribución del citoesqueleto en neuronas de GRD.

4. Objetivo general

Estudiar el efecto de la rigidez del sustrato en la regulación de la morfología neuronal, la distribución del citoesqueleto y la expresión de receptores a Sema3A en neuronas de GRD.

4.1. Objetivos específicos

- 4.1.1. Analizar si la morfología de neuronas de GRD varía dependiendo de la rigidez del sustrato sobre el cual son cultivadas.
- 4.1.2. Analizar si existen cambios en la distribución del citoesqueleto de β III-tubulina y de actina en los conos de crecimiento de neuronas GRD crecidas sobre sustratos con rigidez variable.
- 4.1.3. Analizar si la expresión y distribución de los receptores a Sema3A, Nrp-1 y PlxA4, varía dependiendo de la rigidez del sustrato.

5. Material y Métodos

El presente proyecto es un estudio de tipo experimental cuantitativo. La parte experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo Celular del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana (UV), así como en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias Biológicas de la UV.

La unidad de estudio fueron neuronas de GRD de rata Wistar de 14.5 días de gestación (E14.5). Los animales utilizados para este estudio fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina (campus Xalapa) de la Universidad Veracruzana (UV).

5.1. Variables de estudio

VARIABLES DEPENDIENTES					
VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	CUANTIFICACIÓN
Modulación de la morfología	Morfología se refiere a la forma y tamaño de la célula.	Cambios en el área y número de filopodios del cono de crecimiento, así como también en la longitud axonal y el número de ramificaciones secundarias al axón.	Continua	Cuantitativa de razón, medida en μm^2 , μm y ordinal	Cuantificación del área del cono de crecimiento y el conteo del número de filopodios (midiendo $10\mu\text{m}$ desde el extremo distal del cono de crecimiento hacia el soma), así como la longitud axonal y el número de ramificaciones; al menos 10 conos de crecimiento por cada cubreobjetos con gel HAB de cada rigidez.
Expresión de los receptores	Receptor es una proteína o glicoproteína que permite la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular.	Expresión del ARN mensajero de los receptores neuropilina-1 (Nrp-1) y Plexina A4 (PlxA4) en neuronas de GRD, al crecer sobre sustratos con diferente rigidez.	Continua	Cuantitativa de razón, medida en % de cambio relativo	Cuantificación de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), 1 experimento por triplicado para cada condición.
Distribución de los receptores		Presencia del receptor neuropilina-1 (Nrp-1) en neuronas de GRD, al crecer sobre sustratos con diferente rigidez.	Continua	Cualitativa	Análisis de la presencia del receptor Nrp-1 en las neuronas de GRD mediante inmunofluorescencia, al menos 10 conos de crecimiento por cubreobjetos con gel HAB de cada condición.
Modulación del citoesqueleto	Es la conformación de los filamentos de actina y de microtúbulos que le dan forma a la célula, intervienen en el anclaje al sustrato, participan en el proceso de endocitosis de las células.	Cambios en las estructuras del citoesqueleto, presencia diferencial de filamentos de actina y microtúbulos en neuronas de GRD sembradas sobre sustratos con diferente rigidez.	Continua	Cuantitativa de razón, medida en: μm^2	Cuantificación de la diferencia de áreas correspondientes a actina y β -III tubulina, midiendo $10\mu\text{m}$ desde el extremo distal del cono de crecimiento hacia el soma; al menos 10 conos de crecimiento por cada cubreobjetos con gel HAB de cada rigidez.

5.2. Cultivo de neuronas de GRD

Se utilizó el cultivo *in vitro* de neuronas GRD provenientes de embriones de rata Wistar en etapa de desarrollo (E) de 14.5 días de gestación. Este modelo es el más estudiado para analizar el efecto de colapso y retracción de axones ejercido por la Sema3A³¹, mismo que ha sido adaptado para cultivar neuronas de GRD sobre geles HAB de diferente rigidez cubiertos con colágena⁶⁶. Este protocolo se divide en dos etapas, en la primera etapa se elaboran los hidrogeles HAB y en la segunda etapa se lleva a cabo la obtención y disgregación de los GRD y se cultivan las células sobre los HAB para después de 24 h, realizar los análisis correspondientes.

5.2.1. Elaboración de hidrogeles de acrilamida/bisacrilamida (HAB)

Protocolo para la preparación de cubreobjetos redondos con HAB de diferente rigidez recubiertos con colágena.

a) Preparación de cubreobjetos redondos de 10mm amino-silanizados:

1. Se tomó el cubreobjetos redondo de 0.7mm de diámetro y se calentó en una placa calefactora a una temperatura de 80°C durante 15 s, se adicionaron 30 µl de NaOH 0.1N y se dejó secar hasta observar una capa blanquecina semi-transparente en la superficie de cada cubreobjetos.
2. Se añadieron 30 µl de (3-Aminopropil)trióxysilano (APTES) a cada cubreobjetos para funcionalizar la superficie y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente; después de este tiempo los cubreobjetos se lavaron con agua destilada, dejándolos 5 min en agitación constante en cada lavado.
3. Se dejó secar los cubreobjetos colocándolos de manera inclinada sobre toallas de papel.

Una vez secos los cubreobjetos, se adicionaron 100 µl de glutaraldehído (Glu) al 0.5% en PBS1X a cada cubreobjetos y se incubaron por 30 min a temperatura

ambiente; pasado este tiempo, se aspiró el exceso de Glu y se dejaron secar de forma inclinada sobre toallas de papel.

b) Preparación de cubreobjetos cuadrados (12mm x 12mm) cloro-silanizados para la elaboración de los HAB:

1. Se añadieron 100 μ l de diclorodimetil-silano (DCDMS, por sus siglas en inglés) a cada cubreobjetos cuadrado de 12mmx12mm, asegurándose de cubrir toda la superficie; se incubaron por 5 min a temperatura ambiente.
2. Se removió el exceso de DCDMS y se lavaron por 1 min con agua destilada. Se dejaron secar inclinados sobre toallas de papel y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.
 - El DCDMS en el cubreobjetos cuadrado de 12mmx12mm hace una cubierta hidrofóbica permitiendo que al colocar la mezcla de gel HAB, ésta no se pegue y sólo quede adherido a la superficie tratada del cubreobjetos redondo previamente aminosilanizado.

c) Preparación de HAB de diferente rigidez.

1. Se elaboraron 4 mezclas de acrilamida-bisacrilamida para la obtención de geles con diferente rigidez. En la Tabla 1 se especifica la cantidad necesaria de reactivos para la elaboración de los geles HAB de cada rigidez utilizada según la metodología reportada y ampliada mediante comunicación personal con Grinnell y Ho (2013)⁷⁴.

Tabla 1. Cantidad de reactivos requeridos para la elaboración de geles de poliacrilamida con diferente rigidez.

	<i>Rigidez</i>			
	0.15 KPa	0.32 KPa	3.43 KPa	40.4 KPa
<i>Reactivos</i>	μ l			
Acilamida (al 40%)	75	100	100	200
Bisacrilamida (al 1.5%)	20	20	100	320
Agua destilada	905	880	800	480
APS 10%	10	10	10	10
TEMED	1	1	1	1

2. En un matraz kitasato se mezclaron la acrilamida (al 40%), bisacrilamida (al 1.5%) y el agua, la mezcla se desgasificó durante 15 min; posteriormente

se añadieron las cantidades señaladas de Persulfato de Amonio (APS) al 10% y de Tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0.1%, se mezcló muy bien mediante agitación manual del matraz por unos segundos. Se tomaron 19 μ l de la mezcla y se adicionaron al cubreobjetos cuadrado, inmediatamente después, se colocó la cara tratada (aminosilanizada) del cubreobjetos redondo sobre la mezcla y se dejó polimerizar por 30 min.

3. Pasados 30 min se removió cuidadosamente el cubreobjetos redondo con el gel HAB, deslizando el cubreobjetos redondo y tomándolo con pinzas finas de manera que el gel no se rasgara o dañara, se colocó un gel/pozo en caja de cultivo de 24 pozos y se lavaron 2 veces con 500 μ l c/u de agua destilada (H_2O_{dd}), durante 5 min cada lavado y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

d) Adición de matriz extracelular.

1. Los cubreobjetos redondos con HAB se colocaron en una placa de 48 pozos, a cada gel se añadieron 250 μ l de una solución de Sulfo-SANPAH 1mM (sulfosuccinimidil-6-[4'-azido-2'-nitrofenilamino]hexanoato) en HEPES 50mM (ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanesulfónico) pH8.5, para su fotoactivación se expusieron a luz UV (365 nm a una distancia mínima de 8 cm) por 8 min, al término de este tiempo el Sulfo-SANPAH se tornó de color café oscuro y se retiró, se añadió nueva solución de Sulfo-SANPAH 1mM/50mM HEPES por 8 min para repetir el paso anterior. A partir de este paso, los cubreobjetos se manejaron bajo condiciones de esterilidad.
2. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces por 5 min c/u con 500 μ l de HEPES 50mM (pH8.5). En caso de que el color oscuro persistiera, se realizaron 2 lavados más.
 - El Sulfo-SANPAH es un agente de entrecruzamiento que al fotoactivarse con luz UV deja expuestos grupos éster NHS que permiten su unión con los grupos amino de las proteínas de Matriz Extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) utilizadas.

3. Después de lavar los cubreobjetos funcionalizados, se incubaron durante toda la noche con 270 μ l de una solución de poli-L-ornitina (PLO, 0.1 mg/ml) en HEPES 50 mM (pH 8.5) a 37°C/5% CO₂.
4. Se retiró la solución de PLO y se realizaron 3 lavados de 5 min con 500 μ l HEPES 50mM; al 4º lavado se dejaron incubar durante 45 min a 37°C/5% CO₂.
5. Se desechó la solución de HEPES e inmediatamente se adicionaron 200 μ L de colágena (0.2 mg/ml) en HEPES 50mM a cada cubreobjetos, estos se incubaron 37°C/5% CO₂ durante 1 h.
6. Se retiró el HEPES 50mM y se realizó un lavado de 5 min, con 500 μ l PBS1X.
7. Se retiró el PBS1X y se agregaron 350 μ l de medio de cultivo para GRD y se incubó nuevamente a 37°C durante 1 h o hasta la siembra de las células.
8. El medio de cultivo GRD se retiró y se realizó la siembra de células (neuronas de GRD) a razón de 5.5×10^4 células/cubreobjetos de 0.7 mm.

5.2.2. Cultivo de neuronas de GRD sobre HAB

El protocolo para la obtención y disgregación de GRD fue el siguiente:

1. Se sacrificó la hembra gestante mediante sobredosis de éter, siguiendo las indicaciones para eutanasia aprobadas en la NOM-062-ZOO-1999⁷⁵, para posteriormente realizar su disección y extraer los embriones (E14.5), mismos que se mantuvieron en hielo hasta su disección. Antes del proceso de disección, cada embrión se decapitó y su cuerpo se colocó en una caja petri con base de silicón y se fijó dorso-lateralmente con agujas; con pinzas de microdisección se disecó el tejido para exponer los GRD, se separó cada GRD liberándolo de la médula espinal. Los ganglios se colocaron en un tubo eppendorf con 500 μ L de solución salina de Hank's (Gibco, Cat. 24020) y se mantuvieron en frío hasta colectar todos los ganglios.

2. Los GRD en la solución salina de Hank's se transfirieron a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1000 rpm por 3 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de tripsina-EDTA (0.25 mg/ml) previamente incubada a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 min, dando golpecitos al tubo cada 3 min para ayudar a la disgregación del tejido.
3. Se inactivó la tripsina agregando 3 ml de medio de cultivo GRD y la mezcla se resuspendió una vez con pipeta serológica.
4. Se centrifugó a 2500 rpm por 3 min, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se añadieron 2 ml de medio de cultivo GRD, se resuspendió una vez con pipeta serológica y tres veces más con pipeta pasteur.
5. Se centrifugó nuevamente a 2500 rpm por 3 min; se retiró el sobrenadante y se agregaron 2 ml de medio de cultivo GRD, la pastilla se resuspendió dos veces con pipeta serológica y tres veces más con micropipeta de 1000 μ l.
6. Se tomó una alícuota de 10 μ l de la suspensión celular y se diluyó con 10 μ l de azul de tripano para realizar el conteo de células viables en la cámara Neubauer.
7. Se adicionó NGF a la suspensión celular, a una concentración final de 15 ng/ml, se resuspendió dos veces con pipeta serológica y cuatro veces más con micropipeta de 1000 μ l.
8. Se llevó a cabo la siembra de las células a razón de 5.5×10^4 células/cubreobjetos redondo de 0.7 mm de diámetro. Se incubaron a 37°C/5% CO₂ durante 24 horas. Después de este tiempo, se llevó a cabo la captura de micrografías en contraste de fases, los ensayos de inmunocitoquímica y/o la extracción de RNA mensajero, según fue el caso.

Para el registro morfológico de neuronas de GRD se utilizó un microscopio de contraste de fases Nikon eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Japón), con una cámara CCD acoplada, y el programa RSIimage v1.9.2 (Roper Scientific GmbH,

Alemania). Para el conteo y medición de las células neuronales se utilizó el programa ImageJ v1.47 (Wane Rasband, National Institutes of Health, USA).

Se cuantificó el área del cono de crecimiento y se contó el número de filopodios tomando en cuenta 10 μ m desde el extremo distal del cono de crecimiento hacia el soma, así como también se midió la longitud axonal y se contó el número de ramificaciones neuronales; al menos 10 conos de crecimiento por cada cubreobjetos con gel HAB de cada rigidez.

5.3. Inmunocitoquímica

Se llevaron a cabo inmunotinciones contra β III-tubulina, para observar microtúbulos en las células neuronales de GRD; asimismo, se analizó la presencia y distribución del receptor a semaforinas, Nrp-1, adicionalmente se tiñó la actina polimerizada utilizando la toxina faloidina acoplada a rodamina.

a) Inmunofluorescencia de cultivos de neuronas de GRD.

- 24 horas posteriores a la realización de la siembra de neuronas de GDR, los cultivos se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3.5% y se almacenaron a 4°C hasta su uso.
1. Los cubreobjetos con geles HAB fijados en PFA 3.5% se colocaron en una caja petri plástica recubierta con parafilm (Parafilm® M, Sigma-Aldrich, Inc.).
 2. Se realizaron 4 lavados con PBS1X por 5 min cada lavado, utilizando una pipeta Pasteur plástica y depositando la solución cuidadosamente sobre el portaobjetos para no dañar las muestras.
 3. Las muestras se bloquearon utilizando suero de caballo al 5% en PBS1X (HS 5%/PBS1X), para la inmunotinción con anti-Nrp-1, y con suero de cabra al 10% en PBS1X (GS10%/PBS1X) para la inmunotinción de β III-tubulina; se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Posteriormente, se retiró el suero con el uso de una pipeta plástica y se llevó a cabo un lavado con PBS1X durante 5 min.
5. Se agregó la dilución de anticuerpo a probar en cada muestra, el anticuerpo anti-Nrp-1 se utilizó en una dilución 1:1000 en Triton X-100 0.5% en HS 5% (Mouse/Rat Neuropilin-1 Antibody, polyclonal goat IgG, cat. AF566, R&D Systems®), mientras que el anticuerpo anti- β -III tubulina se utilizó en una concentración 1:500 en Triton X-100 0.5% en GS1% (Neuronal Class III β -Tubulin (TUJ1) Rabbit Monoclonal Antibody, cat. MRB-435P, Covance®). Además se incluyó un control negativo en cada caso, que consistió en no agregar el anticuerpo primario (se utilizó HS 5%/Triton X-100 0.5% en PBS1X o GS 1% /Triton X-100 0.5% en PBS 1X), se dejó incubar toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
6. Al siguiente día, las muestras se lavaron 4 veces con PBS1X, durante 5 min cada uno, a temperatura ambiente.
7. Las muestras se incubaron durante 1 h, a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario en una dilución 1:600 (Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG, cat. A11001, Life Technologies™ y Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG, cat. A11055, Life Technologies™). A partir de este paso, las muestras se protegieron de la luz.
8. Al término de la incubación, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 5 lavados con PBS1X, durante 5 min cada uno.

Se eliminó el exceso de PBS1X y se procedió a hacer la tinción con faloidina rodaminada y Hoechst.

b) Tinción de filamentos de actina con faloidina rodaminada y tinción de núcleos con Hoechst.

- Después de realizar los lavados del anticuerpo secundario, se llevó a cabo la tinción con faloidina rodaminada y con Hoechst para la tinción de núcleos.

1. Las muestras se incubaron por 45 min con faloidina (Alexa Fluor® 546 phalloidin, cat. A22283, Molecular Probes® Invitrogen) a una concentración 1:100 en PBS1X.
2. Se retiró cuidadosamente la solución de faloidina y se desechó en toallas de papel que fueron debidamente dispuestas como residuos peligrosos biológico-infecciosos.
3. Se agregó Hoechst (Hoescht 33342, cat. H1399, Molecular Probes® Invitrogen) para la tinción de núcleos en una dilución 1:1000 en PBS1X y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.
4. Se retiró y desechó la solución de Hoechst sobre toallas de papel que fueron debidamente dispuestas como residuos peligrosos biológico-infecciosos, y se realizó un lavado con PBS1X por 5 min.
5. Los cubreobjetos se colocaron en una caja de 4 pozos (1ml) con PBS1X y se almacenaron a 4°C.
6. Para el registro de inmunofluorescencias, los cubreobjetos con los HAB fueron montados sobre cubreobjetos de 24x60mm (se utilizaron cubreobjetos para disminuir la distancia focal entre la muestra y el objetivo del microscopio y poder observar correctamente las células) al momento de observarse en el microscopio confocal (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Alemania), utilizando una gota de medio de glicerol al 90% (J. T. Baker® Chemicals, cat. 2136-01) conteniendo el reactivo 1,4-diazobis[2.2.2]octano (DABCO®, Sigma Aldrich Inc., cat. 290734) para evitar una rápida pérdida de la fluorescencia (ver anexo 1). Se tomaron micrografías de al menos 10 campos por cada gel HAB utilizando el programa Leica LAS AF v2.6.3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Para la medición de las células neuronales se utilizó el programa ImageJ v1.47 (Wane Rasband, National Institutes of Health, USA). Para la superposición de imágenes se utilizó el programa Adobe Photoshop CS6 v13.0 (Adobe Systems Incorporated, E.U.A.). Se realizaron al menos 10 mediciones por cubreobjetos con HAB de cada condición, para el registro morfológico se midió el área del cono de

crecimiento y se cuantificó el número de filopodios considerando 10 μm desde el extremo distal del cono de crecimiento hacia el soma. Para obtener la diferencia de áreas actina/ β III-tubulina mediante inmunocitoquímica, se consideró 10 μm desde el extremo distal del cono de crecimiento hacia el soma para cuantificar cada área y posteriormente se obtuvo la diferente de áreas.

5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).

La expresión diferencial de ARN mensajero (ARNm) para los receptores a Sema3A, Nrp-1 y PlxA4 se analizó mediante qRT-PCR. Para lo cual se purificó el ARN total de neuronas de GRD (E14.5) cultivadas por 24h sobre geles HAB con diferente rigidez, así como sobre vidrio (control) y de ganglios sin previa disgregación y cultivo. Debido al bajo número de células obtenido en cada preparación de neuronas de GRD, se reunió el RNA total obtenido de 5 experimentos para cada condición (vidrio n=17, 0.15 kPa, 0.32 kPa, 3.43 kPa y 40.4 kPa n=20 geles HAB cultivados).

El protocolo para la purificación de ARN total y amplificación de ADN complementario (ADNc) a partir del cultivo de neuronas GRD E14.5 fue el siguiente:

a) Purificación de ARN total

1. Pasadas 24 h de incubación a 37°C/5% CO₂ del cultivo primario de neuronas de GRD, se retiró el medio de cultivo a cada pozo y se realizaron 2 lavados con 500 μl de PBS1X.
2. Se agregaron 250 μl de TRIsure™ (Bioline Reagents Ltd., cat. BIO-38033) por pozo (para hacer un total de 1ml de TRIsure™ por cada 4 pozos) y se dieron movimientos circulares suaves a la caja de cultivo para ayudar a la lisis celular.
3. La suspensión se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó cloroformo a la mezcla en relación de 0.2 ml de cloroformo (Sigma Aldrich

Inc., cat. C2432) por cada ml de TRIsure™; se mezcló con vortex por 30 s y se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C.

4. Se retiró la fase acuosa incolora (donde se encuentra el ARN), extrayéndola con micropipeta y por la pared del tubo sin inclinar, cuidando de no llevarse la interfase y el solvente orgánico, y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml
5. El ARN se precipitó de la fase acuosa agregando 0.5 ml de isopropanol (grado biología molecular, Sigma Aldrich Inc., cat. F9516) al 100% por cada ml de TRIsure™. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.
6. Posterior a la incubación, se centrifugó a 12 000 x g durante 10 min a 4°C.
7. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente, dejando únicamente el pellet.
8. El pellet se lavó con etanol (grado biología molecular, Sigma Aldrich Inc., cat. F9516) al 75% en H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato, libre de ARNasas) (1 ml de etanol por cada 1 ml de TRIsure™ utilizado), se agitó en vortex por 15 s y se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min a 4°C.
9. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar durante 15-20 min.
10. Una vez que el tubo se secó, se agregaron 20 µl de H₂O DEPC, se dejó reposar por 30 s y la pastilla se resuspendió varias veces. Los tubos, se almacenaron a -20°C hasta su uso.
11. El RNA total se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.)

b) Síntesis de ADNc

1. En un tubo eppendorf se agregó: 1µl de random hexamers 50µM (Promega, cat. C1181), 380 ng de ARN total, 1µl de dNTPs 10mM (Promega, cat. U1515) y se agregó H₂O DEPC hasta un volumen de 12µl.
2. La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo durante 3 min.
3. Se centrifugó 15 s y se agregó: 4µl de amortiguador "First-Strand" 5X, 2µl de M DTT (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., cat. 28025-013) y 1µl

de DNAsa (DNase I, Cat. AM2222, Ambion Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.). Se mezcló con vortex y se incubó a 32°C por 2 min.

4. Se agregó 0.5 µl (100 unidades) de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., cat. 28025-013), se pipeteó gentilmente y se incubó a 37°C durante 50 min.
5. Se incubó a 70°C durante 15 min para inactivar la enzima.
6. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

c) PCR de punto final:

1. A cada tubo se agregó 6 µl de mezcla de reacción 2X (GoTaq® Green Master Mix, 2X, Promega, cat. M7122), 1µl del cebador de amplificación sentido (10µM), 1µl de cebador de amplificación antisentido (10µM) (ver Tabla 2), 1µl de ADNc, 1.8 µl de agua DEPC estéril y 1.2 µl de DMSO (para una concentración final del 10%).
2. Se mezcló gentilmente y los tubos se colocaron en el termociclador para llevar a cabo la reacción, bajo las siguientes condiciones de amplificación:
 - a) 95°C por 4 min para desnaturalizar el ADNc.
 - b) 40 ciclos de PCR con las siguientes temperaturas:
 - 95°C por 30 s (desnaturalización)
 - 60°C por 30 s (hibridación)
 - 72°C por 1 min (extensión).
 - c) Extensión final a 72°C por 10 min.

Los cebadores no reportados previamente y que fueron utilizados tanto para PCR de punto final como para qRT-PCR, se diseñaron con el programa Primer 3 v.0.4.0 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, E.U.A.); la concentración de trabajo para todos los cebadores fue de 10µM (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para el ensayo de qRT-PCR, tamaño del fragmento amplificado, número de acceso en GeneBank y referencia.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Número de acceso	Referencia
Nrp-1	F: GGAGCTACTGGGCTGTGAAG R: ATGTCGGGA ACTCTGATTGG	202	XM_006255825.1	--
PlxA4	F: TTGTCCAGCTGCAACTCAAG R: ATGTCTTGGGGTCATGGGTA	168	XM_008762859.1	--
ACTB	F: AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT R: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	201	NM_031144.3	*
GAPDH	F: CTCATGACCACAGTCCATGC R: ACATTGGGGGTAGGAACAC	199	NM_017008.4	*
Ywhaz	F: TTGAGCAGAAGACGGAAGGT R: GAAGCATTGGGGATCAAGAA	136	NM_013011.3	Bonefeld, et al., 2008 ⁷⁶

*Donación Dr. Juan D. Santiago García, IIB, UV.

- Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar los productos amplificados.

A partir del ADNc obtenido, se llevó a cabo la reacción de PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (qRT-PCR) para cuantificar la expresión de los receptores Nrp-1 y PlxA4; las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) con capacidad para placas de 96 pocillos.

a) Reacción de qRT-PCR:

La expresión del ARNm de los receptores Nrp-1 y PlxA4 se evaluó por medio de PCR en tiempo real, bajo las siguientes condiciones:

- Para cada reacción se emplearon 5.5 µl de mezcla de reacción 2x SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix (Bioline Reagents Ltd., cat. BIO-94005), 0.5 µl del cebador de amplificación sentido (10µM), 0.5µl de cebador de amplificación antisentido (10µM), 1µl de ADNc, 2.4 µl de agua MilliQ estéril y 1.1 µl de DMSO (para una concentración final del 10%).
- Se selló la placa (MicroAmp®, Thermo Fisher Scientific Inc., cat. N8010560) y se colocó en el termociclador (7500 Real-Time PCR System, Applied

Biosystems™) para llevar a cabo la reacción, bajo las siguientes condiciones de amplificación:

- a) Etapa 1: 95°C por 2 min.
- b) Etapa 2: 40 ciclos
 - o 95°C por 15 s
 - o 60°C por 1 min
- c) Etapa 3 (análisis de desnaturalización): un ciclo de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min y 95°C por 15 s.

El análisis de los datos y obtención de los C_p (crossing points) o C_T (ciclo umbral) se llevó a cabo utilizando el programa 7300 System SDS v1.4 (Applied Biosystems, California E.U.A.). Posteriormente, se determinó la eficiencia de amplificación de cada muestra con el programa LinRegPCR (Heart Value Research Center, Amsterdam, Holanda), el cual calcula la eficiencia de amplificación mediante un análisis de regresión lineal de los datos de fluorescencia en la fase exponencial de la amplificación.

Se seleccionaron 3 candidatos a genes de referencia (genes cuya expresión es constitutiva); estos fueron: β -actina (ACTB), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y Tirocín 2-monooxigenasa/triptófano proteína de activación 5-monooxigenasa polipéptido Z (Ywhaz). Se utilizó la hoja de cálculo BestKeeper® de Pfaffi, et al. (2004) para determinar qué gen de referencia era el adecuado para llevar a cabo la cuantificación relativa de los genes de interés⁷⁷.

Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés (Nrp-1 y PlxA4) en neuronas de GRD cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez, para lo cual se calculó el porcentaje de cambio relativo, de acuerdo a la ecuación propuesta por Pfaffi, et al. (2001)⁷⁸.

5.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos primero se analizó la distribución de los datos con la prueba Kolmogorov-Smirnov, posteriormente se utilizó la prueba ANOVA de una vía (en el caso de datos con una distribución normal) o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (en el caso de datos que no cumplieron con la distribución normal) para el contraste de medianas. La diferencia entre las condiciones experimentales se determinó utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o de Mann-Whitney (para medianas) con la corrección Bonferroni, según fue el caso. Se consideraron significativas las diferencias con un valor p menor a 0.05; todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa informático IBM SPSS Statistics v.20.0.0 (International Business Machines, E.U.A.).

6. Resultados

6.1. Modulación de la morfología de neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez

Como parte del primer objetivo de este trabajo, se llevó a cabo la obtención y el cultivo de neuronas de GRD, a partir de la disección de embriones de E14.5. Las células obtenidas se sembraron sobre geles HAB con diferente rigidez (0.15, 0.32, 3.43 y 40.4 kPa) o sobre vidrio (condición control). Se observó el crecimiento de neuronas cultivadas sobre los geles con diferente rigidez en todas las condiciones a las 24 h post-siembra. Las células crecidas sobre los sustratos más blandos (0.15 kPa y 0.32 kPa) presentaron una morfología más redondeada y los conos de crecimiento fueron poco evidentes, conforme se aumentó la rigidez del sustrato las células se observaron más extendidas y con neuritas más largas y conos de crecimiento más evidentes (3.43 kPa y 40.4 kPa), estas últimas con una morfología parecida a la de los cultivos sobre vidrio (control) (Figura 7).

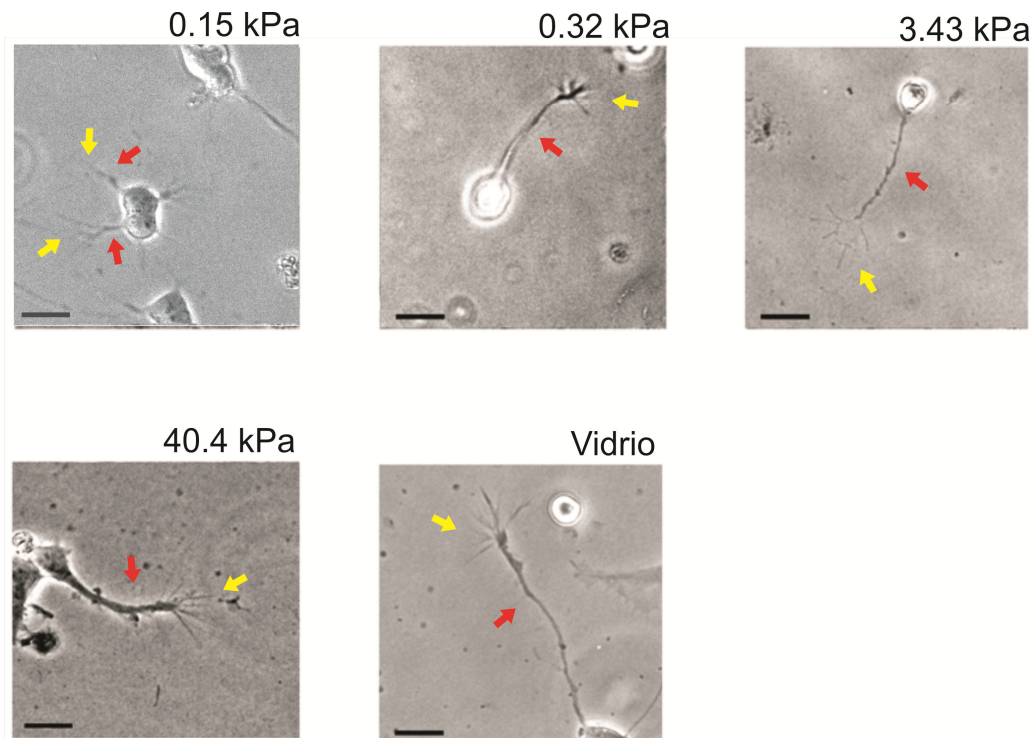
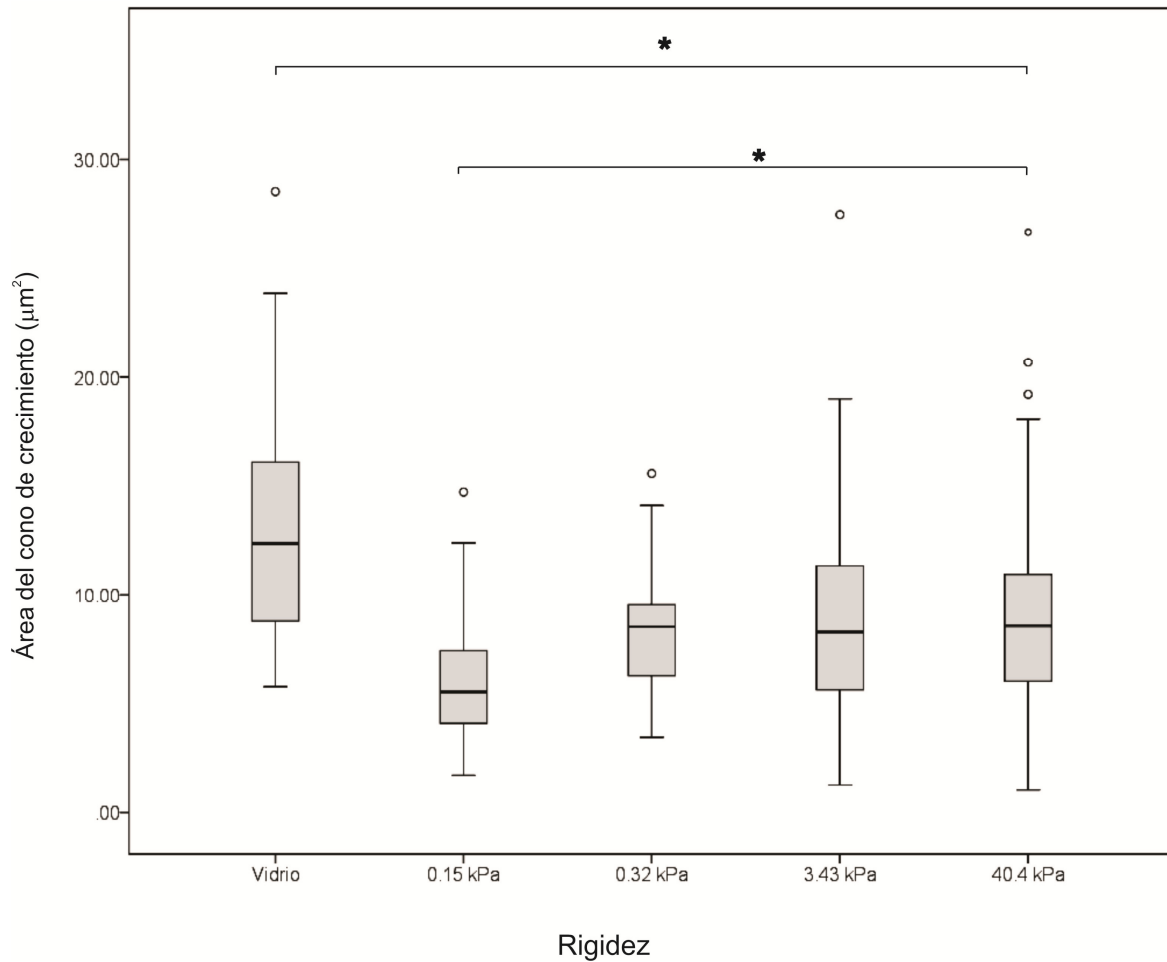


Figura 7. Micrografías de neuronas de GRD (E14.5) cultivadas sobre HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2 mg/ml). En sustratos con menor rigidez las células mostraron axones más cortos y con menor número de filopodios; tanto los conos de crecimiento (flechas amarillas) como los axones (flechas rojas) aumentaron de tamaño conforme aumentó la rigidez de los geles, hasta tener una morfología muy parecida a las neuronas de la condición control (vidrio). Objetivo de 20X. Barra de calibración 10 μ m.

Para cuantificar las diferencias morfológicas observadas en las neuronas cultivadas por 24 h, se seleccionaron conos de crecimiento con morfología característica y evidente en la que se apreciaran claramente los filopodios y que no estuviera en contacto con ninguna otra célula o proyección neuronal, y se realizó la medición del área del cono de crecimiento, longitud axonal y conteo de filopodios en cada condición, adicionalmente se cuantificaron las ramificaciones de cada neurona observada.

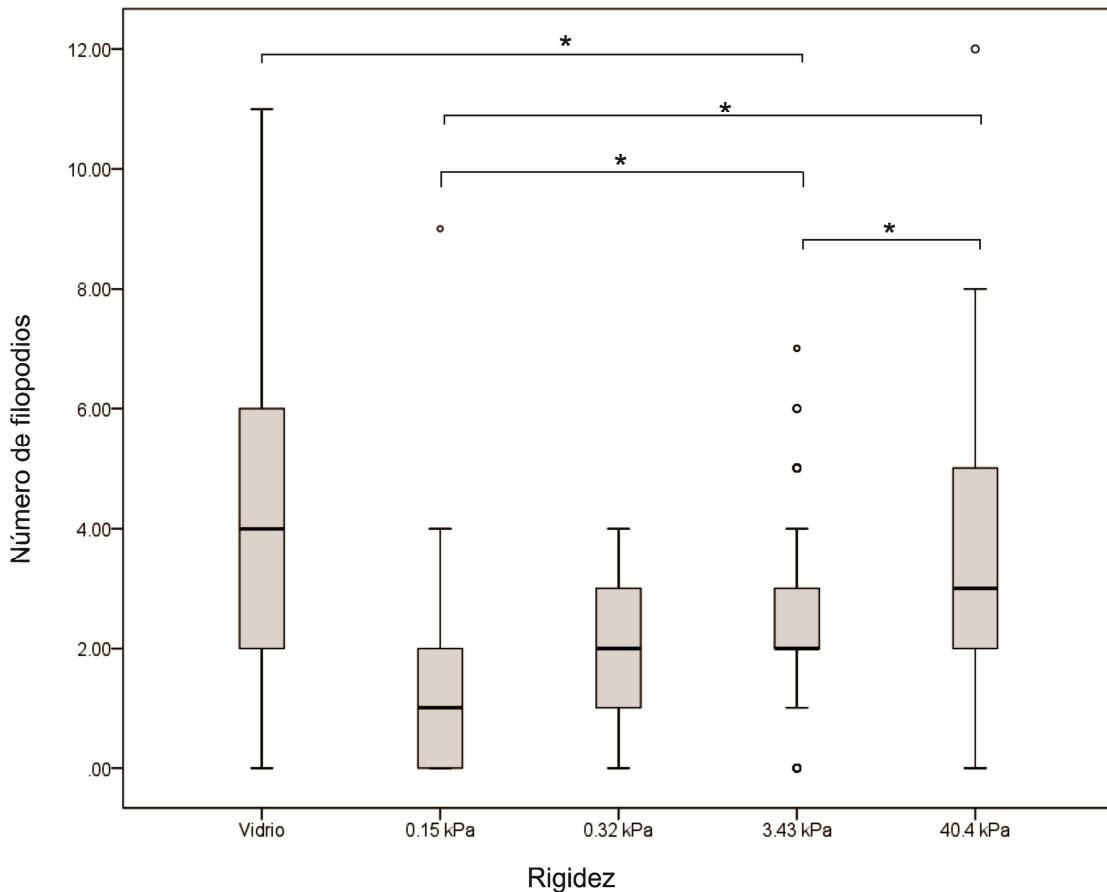
El análisis estadístico de las mediciones mostró que existe diferencia significativa en el área de los conos de crecimiento de neuronas cultivadas sobre geles HAB en comparación con aquellas sembradas sobre vidrio, siendo menor el área del cono

de crecimiento en las neuronas sembradas sobre los geles. Por otra parte, las neuronas crecidas en el gel más blando (0.15kPa) mostraron una menor área del cono de crecimiento en comparación con los demás geles (Gráfica 1).



Gráfica 1. Área del cono de crecimiento de neuronas de GRD (E14.5) al crecer sobre HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml). El área del cono de crecimiento de neuronas cultivadas sobre los geles con diferente rigidez es menor respecto al área del cono de crecimiento de neuronas GRD crecidas sobre vidrio; asimismo, el área en neuronas cultivadas sobre el gel más blando (0.15 kPa) fue significativamente menor al área registrada en los demás geles (0.32 kPa, 3.43 kPa y 40.4 kPa). * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis; vidrio $n=37$, 0.15 kPa $n=51$, 0.32 kPa $n=35$, 3.43 kPa $n=81$, 40.4 kPa $n=77$ (n obtenida de un total de 3 experimentos por condición). La gráfica muestra las medianas con sus respectivos cuartiles, las cajas representan el rango intercuartílico (RQ=Q1-Q3).

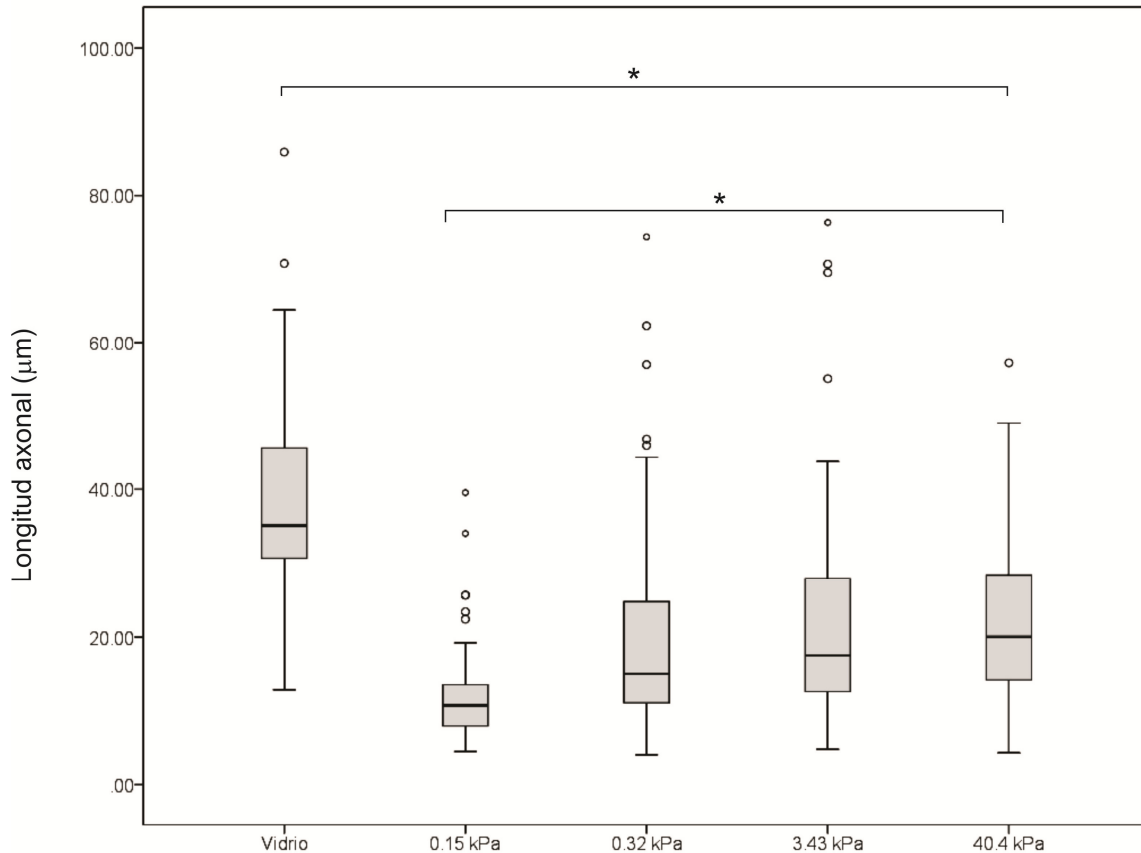
En cuanto al número de filopodios, también se observaron diferencias en neuronas cultivadas sobre el sustrato blando (0.15 kPa) en comparación con las neuronas cultivadas sobre los geles más rígidos (3.43 kPa y 40.4 kPa), así como sobre vidrio, siendo mayor el número de filopodios en los sustratos más rígidos (Gráfica 2). De igual manera, se registró un menor número de filopodios en la condición con rigidez de 3.43 kPa en comparación con el gel más rígido (40.4 kPa).



Gráfica 2. Número de filopodios en el cono de crecimiento de neuronas de GRD (E14.5) al crecer sobre HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml). El sustrato blando ejerce un efecto de inhibición en la formación del número de filopodios, es decir, el número de filopodios es estadísticamente menor en los geles 0.15, 0.32 y 3.43 kPa respecto a las condiciones más rígidas (40.4 kPa y vidrio). Las neuronas cultivadas sobre el sustrato blando (0.15 kPa), presentaron el menor número de filopodios en comparación con los geles rígidos (3.43 y 40.4 kPa), no así con la otra condición blanda (0.32 kPa). Asimismo, el número de filopodios en los geles rígidos es diferente entre ellos (3.43 kPa y 40.4 kPa). * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis; vidrio $n=37$, 0.15 kPa $n=51$, 0.32 kPa $n=35$, 3.43 kPa $n=81$, 40.4 kPa $n=77$ (n obtenida de un total de 3 experimentos por condición). La gráfica muestra las medianas con sus respectivos cuartiles, las cajas representa el rango intercuartílico (RQ=Q1-Q3)

Respecto a la proyección axonal, se observó que las neuronas cultivadas sobre el sustrato blando (0.15 kPa) mostraron una menor longitud axonal, en comparación con las neuronas cultivadas sobre los otros sustratos. De igual manera, las neuronas cultivadas sobre el vidrio presentaron los axones más largos en comparación con los axones de las neuronas cultivadas sobre los geles con diferente rigidez (Gráfica 3). Se llevó a cabo la cuantificación de las ramificaciones de las neuronas cultivadas sobre las diferentes rigideces sin embargo, el valor de p obtenido fue de 0.52, por lo cual no se pudo considerar que existiera una diferencia estadísticamente significativa en el número de ramificaciones presentadas en las células cultivadas sobre las diferentes rigideces.

La rigidez del sustrato sobre el cual se cultivan las neuronas impacta tanto en la morfología del cono de crecimiento como en la proyección axonal. En la rigidez de 0.15kPa (la más parecida a la que tendría el tejido *in situ*), las neuronas presentaron menor área del cono de crecimiento, menor número de filopodios y axones más cortos, al contrario de las neuronas cultivadas sobre los sustratos más rígidos.



Rigidez

Gráfica 3. Longitud axonal de neuronas de GRD (E14.5) al crecer sobre geles HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml), medida desde el extremo del cono de crecimiento hasta el comienzo del soma celular. Las neuronas cultivadas sobre el sustrato blando (0.15 kPa) presentaron axones más cortos respecto a las cultivadas sobre las demás rigideces. Las neuronas cultivadas sobre la condición más rígida (vidrio) presentaron axones significativamente más largos que las neuronas cultivadas sobre los geles. * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis; vidrio $n=37$, 0.15 kPa $n=51$, 0.32 kPa $n=35$, 3.43 kPa $n=81$, 40.4 kPa $n=77$ (n obtenida de un total de 3 experimentos por condición). La gráfica muestra las medianas con sus respectivos cuartiles, las cajas representan el rango intercuartílico (RQ=Q1-Q3)

6.2. Cambios en la distribución del citoesqueleto en los conos de crecimiento de neuronas de GRD cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez

A continuación se analizó si las diferencias morfológicas observadas en los conos de crecimiento podrían reflejarse en cambios a nivel del citoesqueleto de las células. Se analizó la distribución de los filamentos de actina y los microtúbulos inmunoteñidos en el cono de crecimiento de neuronas de GRD cultivadas sobre geles con diferente rigidez. Para el análisis cuantitativo, se obtuvo la diferencia de áreas actina- β III-tubulina, para lo cual se midieron 10 μ m desde el extremo del cono de crecimiento hacia el axón.

El análisis cualitativo de las imágenes mostró que conforme aumenta la rigidez del sustrato sobre el cual se cultivan las células, la distribución de áreas actina- β III-tubulina se delimita, mientras que en los sustratos menos rígidos (0.15 kPa y 0.32 kPa), la distribución es muy semejante, es decir, se puede observar que los microtúbulos abarcan hasta la parte más externa del cono de crecimiento, llegando al dominio periférico, a la par que el citoesqueleto de actina, mientras que en los sustratos más rígidos, se puede observar que los microtúbulos se localizan principalmente en la parte correspondiente al dominio central del cono de crecimiento y los filamentos de actina se sitúan en la zona de transición y el dominio periférico del cono de crecimiento (Figura 8).

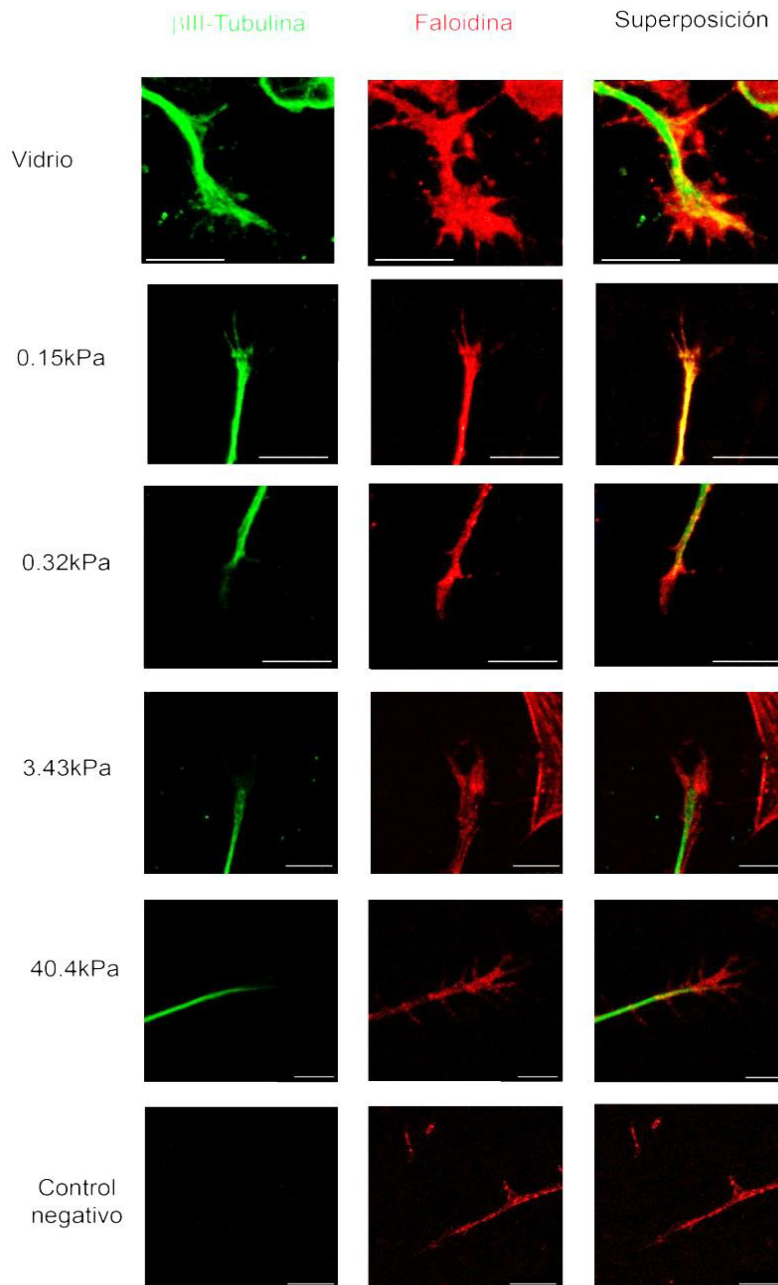
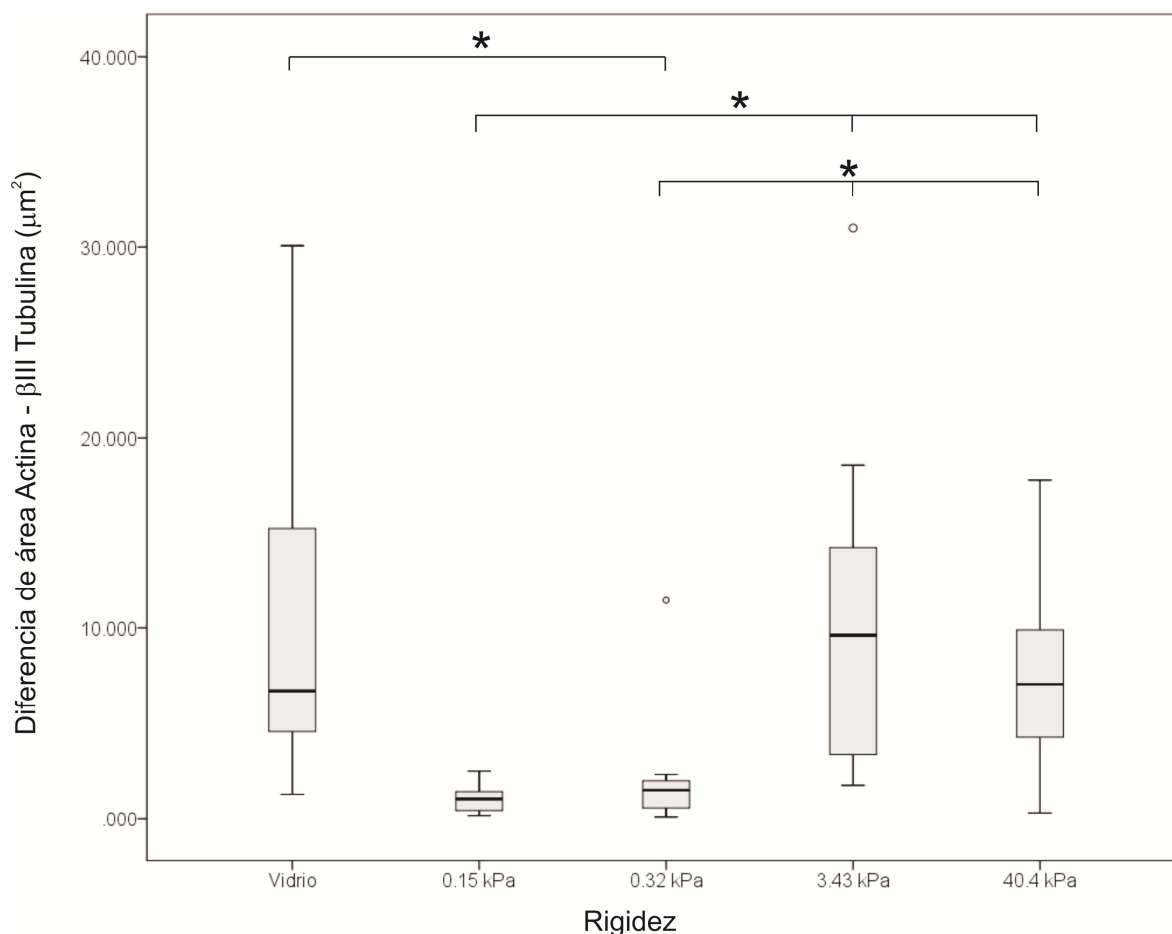


Figura 8. Distribución de actina polimerizada y β III-tubulina en el cono de crecimiento de neuronas de GRD al crecer sobre geles HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml). Se observa la presencia de actina polimerizada (rojo) y de los microtúbulos (verde) conformando el citoesqueleto del cono de crecimiento. En las condiciones más rígidas (3.43 kPa, 40.4 kPa y vidrio), se observa a los microtúbulos únicamente en el dominio central del cono de crecimiento y a los filamentos de actina en la zona de transición y el dominio periférico del cono de crecimiento, al contrario de las condiciones menos rígidas (0.15 kPa y 0.32 kPa), donde puede observarse a los microtúbulos distribuidos hasta el dominio periférico del cono de crecimiento, a la par del citoesqueleto de actina. Objetivo 63X. Barra de escala: 0.15 kPa, 0.32 kPa y control negativo = 10 μ m, vidrio y 3.43 kPa = 7.5 μ m y 40.4 kPa = 5 μ m

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la distribución actina- β III-tubulina en las neuronas cultivadas sobre los geles con menor rigidez, siendo la diferencia entre el área con actina y β III-tubulina menor en comparación con la diferencia de área ocupada por actina y β III-tubulina en las neuronas cultivadas sobre los sustratos más rígidos (3.43 kPa, 40.4 kPa y vidrio) (Gráfica 5).



Gráfica 4. Distribución de actina polimerizada- β III-tubulina en el cono de crecimiento de neuronas GRD cultivadas *in vitro* sobre geles HAB de diferente rigidez. En las condiciones de mayor rigidez vidrio, 3.43 kPa y 40.4 kPa, la diferencia entre las áreas actina positiva y β III tubulina positiva es significativamente mayor en comparación con la diferencia de áreas en neuronas cultivadas sobre las condiciones menos rígidas (0.15 kPa y 0.32 kPa, en donde β III-tubulina abarca casi la misma área que actina). * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis; vidrio $n=19$, 0.15 kPa $n=8$, 0.32 kPa $n=16$, 3.43 kPa $n=22$, 40.4 kPa $n=20$ (n obtenida de un total de 3 experimentos por condición). La gráfica muestra las medianas con sus respectivos cuartiles, las cajas representan el rango intercuartílico (RQ=Q1-Q3)

6.3. Expresión de ARN mensajero de los receptores a Sema3A, Nrp-1 y PlxA4 en neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez

A partir del ARN total se sintetizó ADNc, el cual se empleó para llevar a cabo reacciones de PCR de punto final para verificar la especificidad de los cebadores. Los resultados muestran las bandas correspondientes a los productos de PCR amplificados de los receptores Nrp-1, PlxA4 y el gen de referencia Ywhaz (fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases, Figura 9). En este caso, se empleó como control ADNc obtenido de GRD, para comparar con la expresión del ARNm de los receptores en el tejido. Se puede observar que en condiciones de menor rigidez del sustrato (0.15 kPa y 0.32 kPa) no se detecta el mensajero para PlxA4, mientras que para Nrp-1 la intensidad de los fragmentos fue menor en comparación con las demás condiciones. En las condiciones más rígidas y el control, si hubo amplificación de PlxA4, al igual que para Nrp-1; lo cual podría sugerir que existe una modulación en la expresión de los receptores debida a la rigidez del sustrato, por lo cual se llevó a cabo el experimento de PCR en tiempo real.

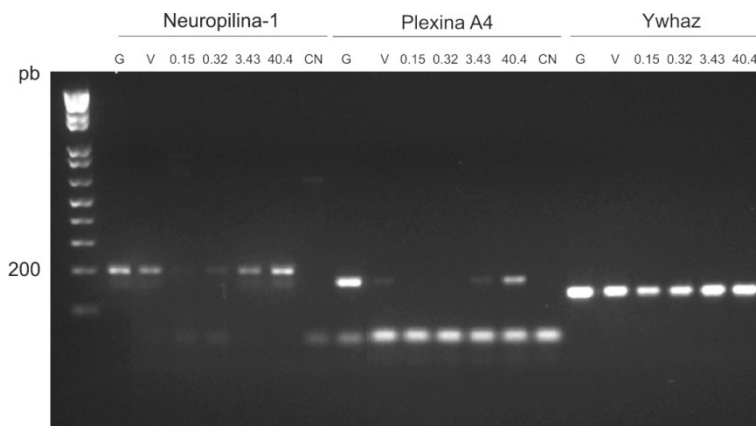
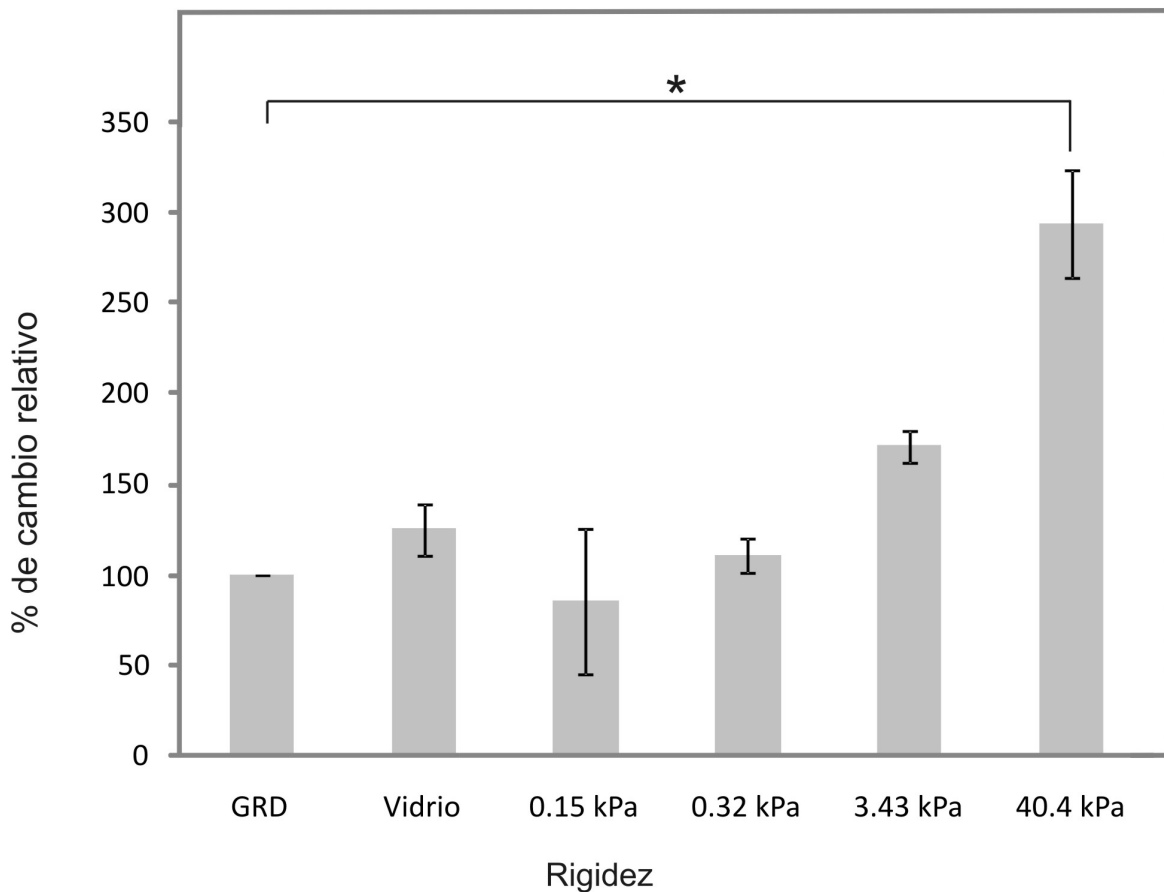


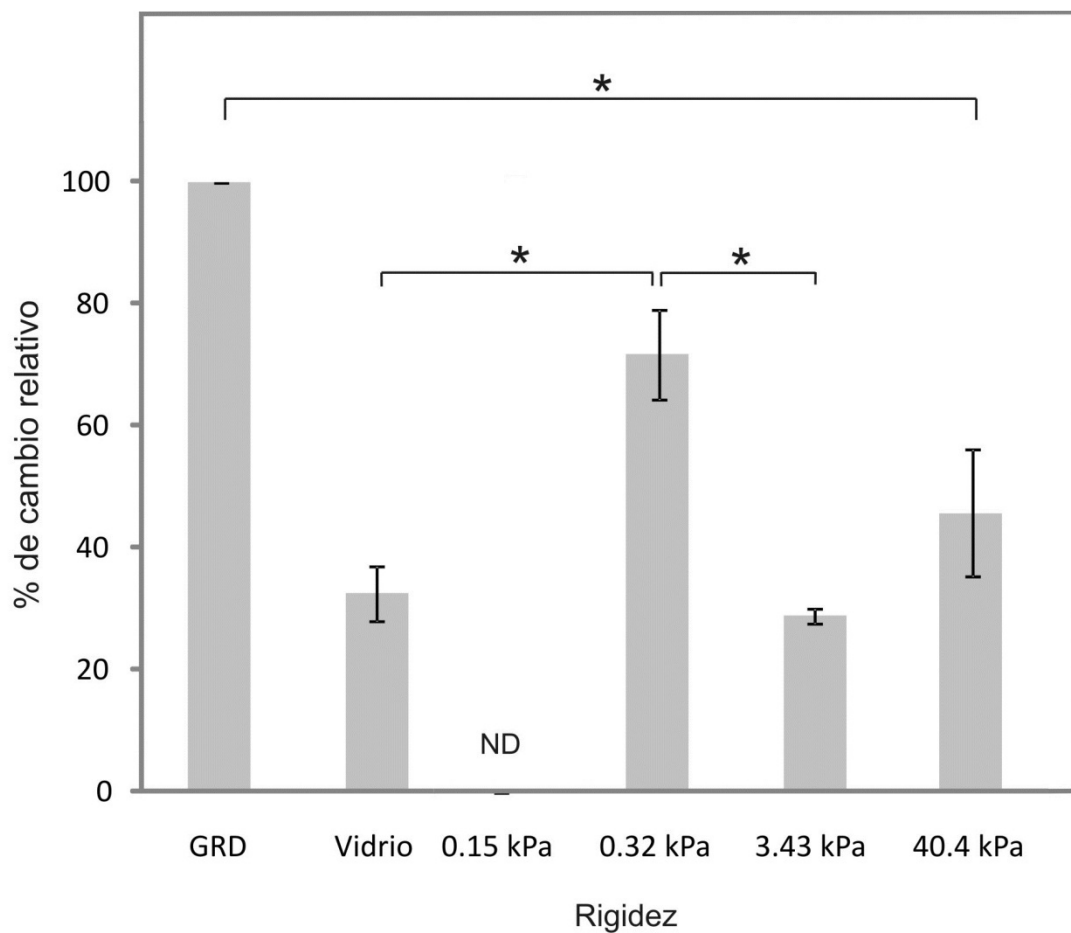
Figura 9. Electroforesis de los productos de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados de Neuropilina-1, Plexina-A4 y Ywhaz como control positivo (gen constitutivo), a partir de ADNc obtenido de neuronas de GRD (E.14.5) cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez (0.15 kPa, 0.32 kPa, 3.43 kPa, 40.4 kPa, sobre vidrio (V), o directamente de tejido de GRD como control (G). Marcador de pares de bases (1 Kb plus, Invitrogen™); los productos obtenidos fueron de aproximadamente 200 pb. CN= control negativo (con todos los reactivos pero sin ADNc).

En el análisis de expresión relativa de los receptores no se observó cambio en la expresión de Nrp-1 en las neuronas cultivadas sobre geles HAB de diferente rigidez con respecto a la expresión presente en los GRD, con excepción de las neuronas cultivadas sobre el gel más rígido (40.4 kPa), en donde se observó un aumento de la expresión en comparación con las demás condiciones (Gráfica 6).



Gráfica 5. Expresión relativa del ARNm del receptor Nrp-1 en neuronas de GRD cultivadas sobre HAB con diferente rigidez, recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2 mg/ml). La expresión relativa Nrp-1 aumenta conforme aumenta la rigidez del sustrato, existiendo una mayor expresión relativa del receptor en la condición rígida 40.4 kPa, la cual es estadísticamente significativa con respecto a las demás condiciones. * $p < 0.05$ ANOVA, $n=3$. La grafica representa las medias \pm EEM

Por otra parte, la expresión del receptor PlxA4 fue menor en neuronas crecidas sobre geles con mayor rigidez (40 kPa), comparado con las neuronas del tejido de GDR; no obstante, en geles más blandos (0.32 kPa) la expresión de PlxA4 se asemeja a la expresión en tejido de GRD, y es significativamente mayor que en los sustratos más rígidos (3.43 kPa y vidrio) (Gráfica 7). En este caso no se consideró la expresión para el gel de 0.15 kPa debido a que la muestra presentó una alta variación intrínseca (InVar), y de acuerdo al programa BestKeeper[®] no lo considera una medición confiable.



Gráfica 6. Expresión relativa de ARNm del receptor Plexina A4 (PlxA4) en neuronas de GRD cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez, recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2 mg/ml). La expresión relativa de PlxA4 en neuronas cultivadas sobre las diferentes rigideces es significativamente menor que la registrada en el tejido de GRD (control). La expresión relativa de PlxA4 en neuronas cultivadas sobre 0.32 kPa, es más alta en comparación con la expresión en las condiciones rígidas vidrio y 3.43 kPa y no fue diferente de la expresión en el tejido de GRD. *p<0.05 ANOVA, n=3, ND=No Detectado. La gráfica representa la media ± EEM

La expresión del ARNm de Nrp-1 no se ve alterada por los cambios en la rigidez del sustrato dentro de un intervalo relativamente amplio (0.15kPa - 3.43kPa), es decir se mantiene estable en las neuronas cultivadas sobre sustratos con baja y mediana rigidez, pero aumenta en sustratos más rígidos (40 kPa). En el caso de PlxA4, hay una mayor sensibilidad a los cambios en la rigidez del sustrato, y la expresión es menor en las células cultivadas sobre sustratos más rígidos, al contrario de lo que ocurre con Nrp-1.

6.4. Distribución del receptor a Sema3A, Nrp-1 en neuronas de GRD cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez

Para corroborar si los datos obtenidos en cuanto a la expresión relativa del ARNm para el receptor Nrp-1, concuerdan con la expresión de la proteína, se llevó a cabo la inmunotinción de la proteína utilizando un anticuerpo contra Nrp-1, y se identificó además los filamentos de actina utilizando faloidina rodaminada para distinguir los conos de crecimiento. La distribución del receptor Nrp-1 en las neuronas de GRD y específicamente en el cono de crecimiento de neuronas cultivadas sobre los geles con diferente rigidez, se pudo observar en todas las condiciones analizadas. El receptor está presente y se distribuye en todo el cono de crecimiento, concentrándose en el dominio central, aunque también se pueden observar receptores en los filopodios (dominio periférico), por lo que no hay un aparente cambio en la distribución, ni ausencia de la proteína en las neuronas cultivadas sobre los geles con diferente rigidez (Figura 10).

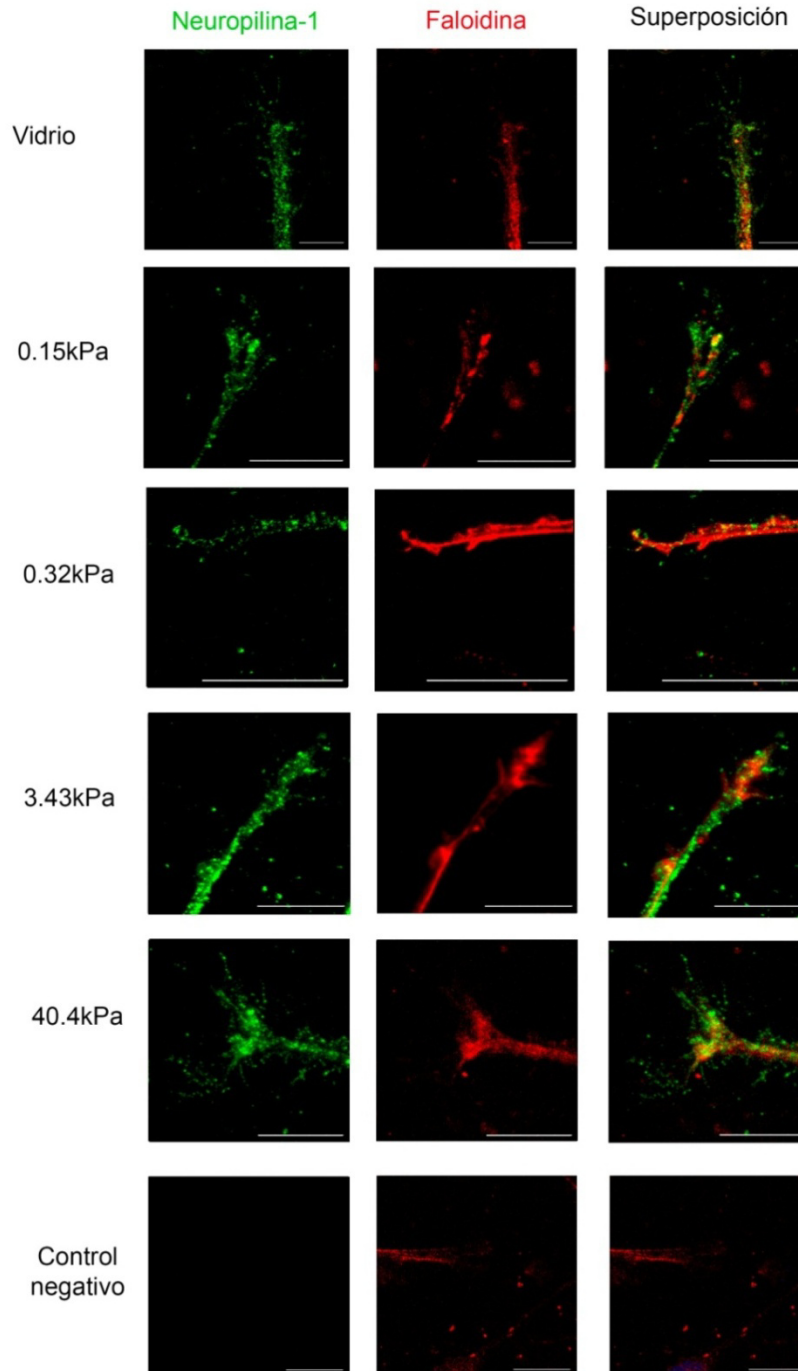


Figura 10. Inmunotinción del receptor Nrp-1 en neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2mg/ml). Se puede observar a Nrp-1 en todo el cono de crecimiento de la neurona, incluyendo en los filopodios y lamelipodios (verde). En rojo se observan los filamentos de actina (tinción con faloidina rodaminada). Objetivo 63X. Barras de escala: Vidrio 7.5 μm , 0.15 kPa, 3.43 kPa, 40.4 kPa y Control negativo 10 μm y 0.32 kPa 25 μm .

7. Discusión

Actualmente, entre las estrategias que buscan promover la regeneración neuronal tras un daño o lesión en el SNC se encuentra el diseño de biomateriales que favorezcan la sobrevivencia, diferenciación y proyección de neuronas. La rigidez del sustrato o material con el que interaccionan las células es un tema que comienza a cobrar importancia debido a que se ha reportado su papel tanto en la diferenciación, como en la proliferación y migración celular.

El módulo de elasticidad es una propiedad mecánica que indica la rigidez de un material. Cuando se aplica una fuerza externa a un material, éste se comprime internamente (se estresa) y subsecuentemente se deforma (se tensiona); esta propiedad es llamada módulo elástico de Young (E) y su unidad de medida es el Pascal (Pa)⁷⁹. La rigidez de los diversos tejidos del cuerpo humano varía desde los más blandos, como el cerebro, cuyo E varía de 0.5 a 1 kPa⁸⁰, hasta los más rígidos, como el hueso, cuyo E varía de 25 a 40 kPa, e intermedios como el músculo esquelético, cuyo E es de 8 a 17 kPa⁵⁷, de ahí que sea relevante considerar este parámetro físico como parte del diseño de biomateriales en el ámbito de la regeneración.

El presente trabajo tuvo como propósito estudiar el impacto de la rigidez del sustrato sobre algunos mecanismos celulares y moleculares que podrían modular la respuesta de axones de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (neuronas sensitivas) a estímulos quimiotrópicos como la proteína Sema3A. Se utilizó el modelo de hidrogeles de acrilamida/bisacrilamida inicialmente propuesto por Wang y Pelham (1998)⁶⁴ y se probaron 4 rigideces, dos cercanas a la reportada para el cerebro, que fueron 0.15 y 0.32 kPa, una cercana a la reportada para músculo, que fue 3.43 kPa, y una cercana a la reportada para hueso, que fue 40.4 kPa. Los resultados mostraron que en el sustrato más blando (0.15 kPa), el área del cono de crecimiento, la longitud axonal y el número de filopodios fue menor que en los sustratos más rígidos.

Al respecto, se ha reportado que la motilidad del cono de crecimiento de neuronas de SNC es mejor en sustratos más blandos, donde los conos de crecimiento generan fuerzas de tracción débiles debido a la baja rigidez elástica del sustrato, esto quizás asemejando la adaptación de la morfología del cono de crecimiento al tejido blando generado por las células gliales, mismas que proveen de un sustrato con un módulo elástico blando de 0.3 kPa⁸¹. No obstante, para otros tipos celulares como las células troncales mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés), los sustratos blandos (0.1 a 1 kPa) favorecen una mayor adherencia, mayor extensión celular y una morfología con mayor número de filopodios y ramificaciones, semejando a la morfología neural, mientras que en los sustratos con una rigidez media (8 a 17 kPa), las células son más alargadas y finalmente, en los sustratos más rígidos (25 a 40 kPa), las células presentan una forma poligonal, con menos ramificaciones, semejantes a la morfología de las células óseas. Por otro lado, se ha reportado que fibroblastos sembrados en sustratos rígidos presentan una morfología más extendida y aplanada, y generan mayor fuerza de tracción, mientras que en los sustratos blandos, son más dinámicos, tienen menos adhesiones, por lo que su morfología es redondeada y generan menor fuerza de tracción^{59, 82, 83}. Lo anterior indica que el impacto de la rigidez del sustrato en la morfología y adhesión depende no sólo de la mecánica que ejerza el sustrato sobre la célula, sino también del tipo celular.

Específicamente se ha reportado que neuronas primarias de la médula espinal presentan más ramificaciones en sustratos blandos que en los sustratos más rígidos⁵. También se reporta que MSCs presentan tres veces más ramificaciones en los sustratos blandos, al contrario de las cultivadas sobre sustratos más rígidos⁵⁹; no obstante, en el caso de neuronas de GRD, lo anterior no pudo ser corroborado con los datos obtenidos en este trabajo, aunque el valor obtenido en la prueba estadística sea cercano al valor significativo ($p=0.52$), por lo que sería interesante aumentar el número de muestra para corroborar si en este caso el efecto es similar a lo reportado.

La diferencia en la morfología del cono de crecimiento de las neuronas de GRD cultivadas sobre los geles con diferente rigidez, podría estar relacionada con tres procesos: los sitios de adhesión (adhesiones focales), la polimerización y el flujo retrógrado de F-actina y las fuerzas de tensión internas así como las fuerzas de tracción generadas sobre el sustrato.

La formación de complejos de adhesión celular (adhesiones focales o FAs, por sus siglas en inglés) median el anclaje de las células al sustrato e interaccionan con el citoesqueleto al interior de la célula; estas adhesiones están conformadas por varias proteínas, entre ellas las proteínas de unión a actina (Actin Binding Proteins o ABPs, por sus siglas en inglés) como Talina, Filamina, Tensina, α -actinina, que controlan el acoplamiento mecánico entre las FAs y el citoesqueleto de actina^{12,84}. En este acoplamiento, las integrinas también tienen un papel primordial ya que acoplan la actina del citoesqueleto a la matriz extracelular; se ha reportado la colocalización de actina polimerizada con integrinas $\beta 1$ principalmente en los bordes externos de fibroblastos en migración⁸⁵. Por otra parte se ha reportado que al disminuir la polimerización de actina con citocalasina D, se disminuye la densidad de integrinas $\beta 1$ activadas⁸⁵. De igual manera, el nivel de integrina $\beta 1$ activada disminuye conforme lo hace la rigidez del sustrato, lo cual podría reflejar cambios en la internalización de receptores y ligandos, así como en la señalización intracelular⁸⁶. Será relevante verificar a futuro si la presencia y distribución de proteínas de los complejos de FA, por ejemplo α -actinina, vinculina o talina, se expresan de manera diferencial en las neuronas de GRD cultivadas sobre los sustratos blandos o rígidos. Asimismo, será útil analizar si existen diferencias en la distribución y densidad de integrinas como $\alpha 5 \beta 1$ en el cono de crecimiento de neuronas de GRD cultivadas sobre diferentes rigideces, para poder establecer una relación clara entre el efecto del sustrato y la formación de complejos de adhesión, con la morfología del cono de crecimiento y las proyecciones colaterales de las neuronas en las diferentes condiciones de rigidez.

Por otra parte, el movimiento del cono de crecimiento involucra la polimerización de actina y la contracción de la red de filamentos de actina mediada por miosina II en el lamelipodio; para que se lleve a cabo este movimiento, existe una correlación directa entre la rigidez celular, las fuerzas de tensión internas y las fuerzas de tracción acopladas al sustrato⁸¹. La rigidez del sustrato influye en la dinámica del flujo retrógrado de F-actina, se reporta que menos de 1 kPa de diferencia en la rigidez del sustrato puede ocasionar que se produzca una falla repentina del acoplamiento de miosina al haz de filamentos de F-actina, provocando la pérdida de adherencia al sustrato (de 0.73 kPa a 1.3 kPa), mientras que en una rigidez por encima de 1.3 kPa, el flujo retrógrado de F-actina se vuelve insensible a la rigidez además, una rigidez menor a 0.08 kPa provoca la muerte de las células¹⁷. La morfología redondeada, filopodios más cortos y menor longitud axonal observada en las neuronas de GRD cultivadas sobre el gel más blando podría explicarse por un aumento en la tensión interna del cono de crecimiento que, a su vez, disminuye el flujo retrógrado de F-actina y la fuerza de tracción ejercida por la células sobre el sustrato¹⁷. Se sabe que en sustratos blandos, las células generan menor fuerza de tracción ya que las adhesiones focales que median la interacción con el sustrato son menores y no están vinculadas a los haces de fibras de actina polimerizada conocidos como fibras de estrés y que favorecen una mayor tracción sobre el sustrato. En estos sustratos, se cuantificó una menor cantidad de actina polimerizada⁸³, observándose también una mayor cantidad de actina monomérica⁸⁷.

Los resultados de la relación actina polimerizada/ β III-tubulina en el cono de crecimiento de las neuronas GDR cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez, muestran que el sustrato modula la distribución del citoesqueleto de actina- β III-tubulina de las neuronas, ya que en los sustratos con una rigidez cercana a la del cerebro (0.15 y 0.32 kPa), los microtúbulos no sólo se encontraron en el dominio central, sino que invaden el dominio periférico del cono de crecimiento, registrándose a la par del citoesqueleto de actina. Al respecto, se reporta que aunque los microtúbulos del dominio central pueden invadir la zona periférica del

cono de crecimiento, y esto es un factor clave en la determinación del direccionamiento axonal¹². Al inhibir la polimerización de actina en el cono de crecimiento con la toxina citocalasina B, la fuerza de tensión generada por el citoesqueleto de actina está ausente, dando paso a que una mayor proporción de microtúbulos invadan la región periférica¹³, por lo que no ocurre el efecto de “jale” de la actina; pero se registra elongación de las neuritas debido al transporte anterógrado de tubulina que ejerce una fuerza de “empuje” sin la necesidad de los contactos adhesivos mediados por actina¹³. De manera interesante, se ha mostrado que la supresión de la habilidad de girar del cono de crecimiento en presencia de un componente inhibitorio de la proyección axonal, como es el proteoglicano de condroitin sulfato, se impide al inhibir la polimerización de actina, y el consiguiente desplazamiento de los microtúbulos a la región periférica¹³, a semejanza de lo observado en las neuronas de GRD sobre sustratos blandos. Esto puede indicar que la inhibición de la respuesta de repulsión a Sema3A en sustratos blandos, previamente observada por Ríos, A. (2010) puede deberse en parte a la distribución diferencial de actina polimerizada/ β III-tubulina observada. Por otra parte, es posible que nuestros resultados muestren que en los sustratos blandos, al no haber fuerza de tracción suficiente ejercida por actina-miosina debido a la menor cantidad de actina polimerizada en las células cultivadas sobre los sustratos blandos, los microtúbulos avancen hacia la zona periférica impulsando de esta manera la elongación axonal y por tanto sea la responsable del efecto en el aumento en la proyección observada también por Ríos, A. (2010) en presencia de la Sema3A en sustratos blandos. Será importante, a futuro, verificar si existe efectivamente una disminución de la polimerización de actina en los sustratos blandos mediante la cuantificación de la cantidad de actina polimerizada a partir de lisados de las células cultivadas sobre las diferentes rigideces o la cuantificación mediante intensidad de fluorescencia de actina marcada, así como mediante la observación de la dinámica de los microtúbulos en los sustratos con diferente rigidez.

En el estudio llevado a cabo por Ríos, A. (2010) se concluyó que la retracción axonal ejercida por la proteína quimiorrepelente Sema3A es modulada por el sustrato, ya que en los sustratos blandos se registró un efecto inhibitorio de la acción de Sema3A⁶⁶; lo anterior nos llevó a preguntarnos si el sustrato podría estar modulando la expresión de los receptores a Sema3A. Nuestros resultados muestran que en un intervalo relativamente amplio de rigidez (0.15kPa - 3.4 kPa) no parece haber una disminución en la expresión del receptor Nrp-1, e incluso la expresión observada es parecida a la encontrada en el tejido completo de GRD, aunque conforme va aumentando la rigidez aumentó la expresión del receptor. Por otra parte las inmunotinciones contra la proteína muestran que el receptor Nrp-1 se expresa en las neuronas cultivadas en todas las condiciones de rigidez (geles y vidrio), así como en todo el cuerpo de la neurona (soma, axón y dendritas); aunque se requiere cuantificar esta expresión y corroborar que la expresión relativa de la proteína de Nrp-1 efectivamente se mantiene o aumenta conforme lo hace la rigidez sobre la cual se cultivan las células.

Al respecto, se ha reportado en células endoteliales, que el procesamiento de VEGF, otro ligando de Nrp-1 que podría competir con Sema3A, es modificado por la rigidez del sustrato, provocando un cambio en la internalización y la señalización intracelular a través de la disminución del número de integrinas $\beta 1$ y en la consecuente disminución de la internalización del ligando en los sustratos rígidos⁸⁶, lo cual había sido anteriormente propuesto por Gallo y Letourneau (2004), quienes sugirieron que el incremento en la actividad endocítica durante el colapso del cono de crecimiento podría reflejar la internalización de receptores unidos a los ligandos inductores del colapso⁸⁸, como Sema3A. Será interesante evaluar si existen modificaciones en la actividad endocítica de Nrp-1 en las neuronas de GRD sembradas sobre diferente rigidez.

Nrp-1 es un receptor que actúa durante el guiado axonal inducido por Sema3A durante etapas embrionarias^{89,90}, sin embargo, se ha demostrado que también tiene un papel importante en la angiogénesis y la invasión de células tumorales,

mediante la activación de su dominio extracelular por el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) que promueve, a su vez, la unión de $\alpha 5\beta 1$ integrinas a la matriz extracelular y produciendo a su vez, un remodelamiento de la matriz extracelular de fibronectina, haciéndola más rígida y promoviendo el crecimiento tumoral⁹¹. Asimismo, se comparó la expresión del ARNm de Nrp-1 en muestras de cáncer de hígado humano y los datos obtenidos mostraron que existe una relación directa con la sobrevida, ya que los pacientes con menor expresión del ARNm de Nrp-1 mostraron mayor sobrevida (cuantificada en meses)⁹¹. Lo anterior permite destacar que nuestros resultados sobre la modulación de la expresión de Nrp-1 por la rigidez del sustrato pudieran tener importantes repercusiones en la comprensión del papel del sustrato sobre la respuesta migratoria y de proliferación de células cancerosas mediada por agonistas como el VEGF.

En lo que respecta al receptor PlxA4, las células cultivadas sobre los geles o sobre vidrio, presentaron una expresión del mensajero a la baja respecto a la expresión en los GRD, lo cual nos podría indicar que el incremento en la rigidez del sustrato ejerce un efecto inhibitorio en la expresión, al contrario de lo registrado para el mensajero del receptor Nrp-1. La identificación del PlxA4, es relativamente reciente⁹², su expresión se ha descrito en el cerebro en desarrollo, así como también en tejido adulto; en ratones E14 se localiza en la zona marginal de la corteza cerebral, en GRD y en el ganglio del trigémino^{92,93}, mientras que en tejido adulto se ha descrito en neuronas del asta dorsal y mayormente en el asta ventral, en motoneuronas o interneuronas, donde también se expresa Nrp-1, asimismo, en neuronas de corteza e hipocampo, localizándose tanto en soma como en dendritas y en el axón⁹⁴. La expresión tanto de Nrp-1 como de PlxA4 en embriones varía de acuerdo al estadio de desarrollo en el que se encuentren, por ejemplo, Nrp-1 comienza a expresarse en GRD de ratón en el estadio E9, en E12.5 se expresa ya en GRD y se comienza a expresar en la médula espinal y su expresión va aumentando conforme el desarrollo hasta que en el estadio E15.5 su expresión en GRD y la médula espinal decrece rápidamente⁹⁰; por otra parte, PlxA4 aumenta

su expresión cuando las neuronas sensoriales comienzan a extender las colaterales en la sustancia gris de la médula espinal alrededor del estadio E12.5⁹⁵. Hasta la fecha no hay reportes en la literatura sobre si la expresión de Nrp-1 y/o PlxA4 en neuronas puede variar dependiendo de la rigidez del sustrato, sin embargo recientemente se ha reportado que el tejido embrionario varía su rigidez conforme avanza el desarrollo, así como también se reportan cambios en la rigidez neuronal durante el desarrollo embrionario, esto último directamente relacionado con la maduración del citoesqueleto de β III-tubulina (microtúbulos)⁹⁶, por lo que los resultados del presente trabajo representan una evidencia importante que muestra por primera vez que la expresión del ARNm de los receptores a Sema3A puede variar conforme cambian las condiciones mecánicas del medio extracelular, y que por lo tanto la rigidez del medio podría impactar en la respuesta de señalización mediada por Sema3A/Nrp-1/PlxA4. Al disminuir la expresión de uno de los receptores en los sustratos blandos, el efecto de colapso inducido por Sema3A podría modificarse, sería interesante analizar si el cambio del balance en el heterodímero formado por los receptores Nrp-1/PlxA4 podría, a su vez, cambiar el efecto de repulsión de Sema3A, reportado por Ríos, A. (2010).

Finalmente es necesario corroborar los datos de expresión relativa del ARNm de PlxA4, para las neuronas cultivadas sobre geles de 0.15kPa, ya que en el presente trabajo la cantidad de muestra obtenida no permitió su cuantificación, lo cual robustecería la hipótesis de que la expresión de PlxA4 es modulada a la baja al someter a las neuronas a condiciones de mayor rigidez.

Será conveniente también analizar la expresión de la proteína mediante inmunotinciones o western blot para corroborar esta expresión del ARNm para los receptores o establecer si hay algún cambio a nivel postraducciona que incida en la expresión de los receptores y su función en el colapso axonal inducido por Sema3A. De igual manera, se sugiere el análisis de la expresión de ARNm de las otras plexinas receptoras a Sema3A (PlxA1, PlxA2 y PlxA3) en neuronas de GRD cultivadas sobre los geles con diferente rigidez.

Los resultados obtenidos nos muestran que la rigidez del sustrato sobre el cual se encuentran las neuronas de GRD ejerce un efecto modulador tanto de la morfología celular, de la distribución del citoesqueleto y de la expresión de los receptores a Sema3A. Por lo anterior se puede sugerir el siguiente modelo: en las células cultivadas en los sustratos blandos, podría ocurrir una disminución de los sitios de adhesión o adhesiones focales, así como cambios en las cascadas de señalización mediadas por la adhesión, por ejemplo, la señalización mediada por vinculina y Gpc1 y Rac1. Asimismo, se esperaría una menor polimerización y flujo retrógrado de actina en el cono de crecimiento, lo cual podría involucrar el avance de los microtúbulos del dominio central hacia el dominio periférico del cono de crecimiento, modificando el mecanismo de respuesta a señales repelentes. Además se podría generar un cambio en la internalización de Sema3A debido a una menor transcripción de los mensajeros para sus receptores y por lo tanto, una menor respuesta de colapso del cono de crecimiento (Figura 11).

Los efectos de la rigidez del sustrato sobre la respuesta a proteínas quimiotrópicas, y la comprensión de los mecanismos biológicos implicados, podrán impactar a futuro el desarrollo de sustratos o biomateriales específicos que favorezcan o inhiban la respuesta de proyección o repulsión de neuronas para su uso en el campo de la neuroregeneración o en la terapéutica contra el cáncer.



Figura 11. Propuesta de modelo sobre el posible efecto de la rigidez del sustrato ejercido en las neuronas de GRD. En el modelo, el sustrato blando sobre el cual son cultivadas las neuronas de GRD ejerce un efecto modulador de la morfología celular, presentando cambios en la distribución del citoesqueleto de β III-tubulina/actina, con una posible disminución de actina polimerizada permitiendo que los microtúbulos invadan la zona periférica del cono de crecimiento, ejerciendo un efecto de avance en ausencia de polimerización de actina, también podría haber una disminución de las adhesiones focales y de la cantidad de β 1 integrinas; la rigidez del sustrato también modula la expresión de los receptores a Sema3A, donde hay una menor transcripción del ARNm de Nrp-1 y un aumento en el ARNm de PlxA4. Lo anterior tendría como resultado una disminución del efecto de colapso del cono de crecimiento ejercido por Sema3A en neuronas de GRD.

Conclusiones

- La rigidez del sustrato modula la morfología del cono de crecimiento y la proyección axonal en neuronas de GRD, a menor rigidez, hay un menor número de filopodios, menor área del cono de crecimiento y menor longitud axonal.
- La rigidez del sustrato ejerce un efecto diferencial en la distribución de los filamentos de actina y los microtúbulos en el cono de crecimiento de neuronas de GRD, a menor rigidez la diferencia de áreas entre actina polimerizada/ β III-tubulina es menor.
- Los receptores a Sema3A, Nrp-1 y PlxA4 se expresan en neuronas de GRD sembradas sobre sustratos con diferente rigidez y hay una modulación en la expresión de su ARNm de acuerdo a la rigidez del sustrato. La expresión del ARNm de Nrp-1 aumenta conforme aumenta la rigidez del sustrato; mientras que la expresión del ARNm de PlxA4 parece disminuir conforme aumenta la rigidez del sustrato, siendo en el sustrato blando donde la expresión es mayor respecto a los demás y similar a la expresión del mensajero en el tejido de GRD.

8. Perspectivas

A partir de los hallazgos presentados en este trabajo, se plantean las siguientes perspectivas:

- Cuantificar el número de ramificaciones secundarias al axón presentes en neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez.
- Analizar los sitios de adhesión focal en neuronas de GRD cultivadas sobre HAB con diferente rigidez, utilizando marcadores para proteínas como talina, vinculina, α -actinina o paxilina, para establecer si existe una modulación de estos sitios que pueda ser debida a la rigidez del sustrato.
- Cuantificar, mediante qRT-PCR, la expresión del ARNm de PlxA4 en células cultivadas sobre el gel HAB más blando (0.15 kPa) y compararla con la expresión del mensajero en las células cultivadas sobre las otras rigideces (0.32 kPa, 3.43 kPa, 40.4 kPa y vidrio), así como con la expresión del mensajero en el tejido in situ (GRD).
- Analizar si existe una expresión diferencial de las otras plexinas receptores a Sema3A, PlxA1, PlxA2 y PlxA3 debida a la rigidez del sustrato mediante la cuantificación de la expresión del ARNm.
- Analizar si existen cambios en el efecto de colapso ejercido por Sema3A en neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez, cuantificados a través de parámetros morfológicos y cambios en la distribución del citoesqueleto. Asimismo, cuantificar la expresión de los receptores a Sema3A (Nrp-1, PlxA1-A4) en neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez en presencia de Sema3A.

9. Consideraciones éticas y de bioseguridad

Para asegurar el bienestar de los animales de experimentación utilizados en este proyecto, se siguió lo estipulado en la Ley Federal de Sanidad Animal⁹⁷ y en la NOM-062-ZOO-1999, “para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”⁷⁵, los animales se mantuvieron en un espacio en el laboratorio de Neurotoxicología, especialmente acondicionado como estación de experimentación con temperatura y humedad controlada, ciclo de luz-oscuridad adecuado, que cumplió con las especificaciones de jaulas, alimento, agua, camas, pesajes, toma de muestras, etc., especificados en la norma oficial vigente.

Así mismo, se cumplió con lo estipulado en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, “Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo”⁹⁸ y en la NOM-005-STPS-1998, “relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas”⁹⁹, ya que todos los recipientes estuvieron debidamente identificados y los desechos fueron debidamente dispuestos; de igual manera, los cadáveres de los organismos sacrificados y demás material biológico fue almacenado a -20°C hasta su traslado para el seguimiento de disposición final, llevado a cabo por un prestador de servicios autorizado.

El sacrificio de animales, se llevó a cabo cumpliendo lo estipulado en la NOM-033-ZOO-1995, “Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres”¹⁰⁰, tratando de reducir al máximo el estrés y sufrimiento del animal. De igual manera, el transporte de los animales se llevó a cabo tratando de que el animal sufriera el menor estrés posible y tratando de no someterlo a movimientos bruscos que pudieran hacerle daño; así como también, fueron transportados en una jaula acorde a su tamaño, con alimento y agua ad libitum, de acuerdo a lo establecido en la NOM-051-ZOO-1995, “trato humanitario en la movilización de animales”¹⁰¹.

Referencias

1. Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*. 1995;376(6538):331-3.
2. Hendrickx M, Van XH, Leyns L. Anterior-posterior patterning of neural differentiated embryonic stem cells by canonical Wnts, Fgfs, Bmp4 and their respective antagonists. *Dev Growth Differ*. 2009;51(8):687-98.
3. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, et al. *Neuroscience*, Publisher. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA. ISBN 0-87893-725-0; 2004.
4. Cajal SR. À quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moëlle épinière du poulet? *Anat Anz*. 1890;21–22:609–39.
5. Keshishian H. Ross Harrison's "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement". *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2004;301(3):201-3.
6. Dent EW, Gertler FB. Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance. *Neuron*. 2003;40(2):209-27.
7. Grzywa EL, Lee AC, Lee GU, Suter DM. High-resolution analysis of neuronal growth cone morphology by comparative atomic force and optical microscopy. *J Neurobiol*. 2006;66(14):1529-43.
8. Jaeken L. A new list of functions of the cytoskeleton. *IUBMB Life*. 2007;59(3):127-33.
9. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *The Cytoskeleton: Components and Structural Functions*. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York: W. H. Freeman; 2004. p. 173-8.
10. Lowery LA, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):332-43.
11. Mellor H. The role of formins in filopodia formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2010;1803(2):191-200.
12. Challacombe JF, Snow DM, Letourneau PC. Role of the cytoskeleton in growth cone motility and axonal elongation. *Seminars in Neuroscience*. 1996;8(2):67-80.

13. Letourneau PC, Shattuck TA, Ressler AH. "Pull" and "push" in neurite elongation: observations on the effects of different concentrations of cytochalasin B and taxol. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1987;8(3):193-209.
14. Liu BP, Strittmatter SM. Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(5):619-26.
15. Medeiros NA, Burnette DT, Forscher P. Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol*. 2006;8(3):216-26.
16. Myers JP, Gomez TM. Focal adhesion kinase promotes integrin adhesion dynamics necessary for chemotropic turning of nerve growth cones. *J Neurosci*. 2011;31(38):13585-95.
17. Chan CE, Odde DJ. Traction Dynamics of Filopodia on Compliant Substrates. *Science*. 2008;322(5908):1687-91.
18. Zhou FQ, Waterman-Storer CM, Cohan CS. Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *J Cell Biol*. 2002;157(5):839-49.
19. López MP, Huber F, Grigoriev I, Steinmetz MO, Akhmanova A, Koenderink GH, et al. Actin–microtubule coordination at growing microtubule ends. *Nat Commun*. 2014;5.
20. Gruener G, Biller J. Spinal Cord Anatomy, Localization, and Overview of Spinal Cord Syndromes. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2008;14(3, Spinal Cord, Root, and Plexus Disorders):11-35.
21. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neural science*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000. p. 9, 320, 40-41, 413-4.
22. Wang G, Scott SA. Independent Development of Sensory and Motor Innervation Patterns in Embryonic Chick Hindlimbs. *Dev Biol*. 1999;208(2):324-36.
23. Jackman A, Fitzgerald M. Development of peripheral hindlimb and central spinal cord innervation by subpopulations of dorsal root ganglion cells in the embryonic rat. *J Comp Neurol*. 2000;418(3):281-98.
24. Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M. Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(6).

25. Yamamoto N, Tamada A, Murakami F. Wiring of the brain by a range of guidance cues. *Prog Neurobiol.* 2002;68(6):393-407.
26. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell.* 1999;97(5):551-2.
27. Pasterkamp RJ, Verhaagen J. Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1499-511.
28. Koncina E, Roth L, Gonthier B, Bagnard D. Role of semaphorins during axon growth and guidance. *Adv Exp Med Biol.* 2007;621:50-64.
29. Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:263-92.
30. Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):632-45.
31. Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell.* 1993;75(2):217-27.
32. Roth L, Koncina E, Satkauskas S, Cremel G, Aunis D, Bagnard D. The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(4):649-66.
33. Takegahara N, Kumanogoh A, Kikutani H. Semaphorins: a new class of immunoregulatory molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360(1461):1673-80.
34. Antipenko A, Himanen J-P, van Leyen K, Nardi-Dei V, Lesniak J, Barton WA, et al. Structure of the Semaphorin-3A Receptor Binding Module. *Neuron.* 2003;39(4):589-98.
35. Worzfeld T, Offermanns S. Semaphorins and plexins as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(8):603-21.
36. Negishi M, Oinuma I, Kato H. Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(12):1363-71.
37. Nakamura F, Kalb RG, Strittmatter SM. Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol.* 2000;44(2):219-29.

38. Togashi H, Schmidt EF, Strittmatter SM. RanBPM Contributes to Semaphorin3A Signaling through Plexin-A Receptors. *J Neurosci.* 2006;26(18):4961-9.
39. Ben-Zvi A, Manor O, Schachner M, Yaron A, Tessier-Lavigne M, Behar O. The Semaphorin receptor PlexinA3 mediates neuronal apoptosis during dorsal root ganglia development. *J Neurosci.* 2008;28(47):12427-32.
40. Yaron A, Huang PH, Cheng HJ, Tessier-Lavigne M. Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron.* 2005;45(4):513-23.
41. Suto F, Ito K, Uemura M, Shimizu M, Shinkawa Y, Sanbo M, et al. Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J Neurosci.* 2005;25(14):3628-37.
42. Sabag AD, Smolkin T, Mumblat Y, Ueffing M, Kessler O, Gloeckner CJ, et al. The role of the plexin-A2 receptor in Sema3A and Sema3B signal transduction. *J Cell Sci.* 2014;127(24):5240-52.
43. Mlechkovich G, Peng SS, Shacham V, Martinez E, Gokhman I, Minis A, et al. Distinct cytoplasmic domains in Plexin-A4 mediate diverse responses to semaphorin 3A in developing mammalian neurons. *Sci Signal.* 2014;7(316):ra24.
44. Fournier AE, Nakamura F, Kawamoto S, Goshima Y, Kalb RG, Strittmatter SM. Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *J Cell Biol.* 2000;149(2):411-22.
45. Schmidt EF, Strittmatter SM. The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007;600:1-11.
46. Castellani V, Falk J, Rougon G. Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2004;26(1):89-100.
47. Valdembri D, Caswell PT, Anderson KI, Schwarz JP, König I, Astanina E, et al. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates $\alpha 5\beta 1$ integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS biology.* 2009;7(1):e1000025.

48. Sanes JR. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci.* 1989;12:491-516.
49. Wojcik-Stanaszek L, Gregor A, Zalewska T. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2011;71(1):103-12.
50. Sanes JR, Schachner M, Covault J. Expression of several adhesive macromolecules (N-CAM, L1, J1, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan) in embryonic, adult, and denervated adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1986;102(2):420-31.
51. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009;326(5957):1216-9.
52. Plantman S, Patarroyo M, Fried K, Domogatskaya A, Tryggvason K, Hammarberg H, et al. Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro. *Mol Cell Neurosci.* 2008;39(1):50-62.
53. Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 1993;7(11):996-1003.
54. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005;310(5751):1139-43.
55. Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janmey PA. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophys J.* 2006;90(8):3012-8.
56. Moore SW, Sheetz MP. Biophysics of substrate interactions: influence on neural motility, differentiation and repair. *Dev Neurobiol.* 2011;71(11):1090-101.
57. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-89.
58. Eroshenko N, Ramachandran R, Yadavalli VK, Rao RR. Effect of substrate stiffness on early human embryonic stem cell differentiation. *J Biol Eng.* 2013;7(1):7.
59. Flanagan LA, Ju YE, Marg B, Osterfield M, Janmey PA. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport.* 2002;13(18):2411-5.

60. Leach JB, Brown XQ, Jacot JG, Dimilla PA, Wong JY. Neurite outgrowth and branching of PC12 cells on very soft substrates sharply decreases below a threshold of substrate rigidity. *J Neural Eng.* 2007;4(2):26-34.
61. Moore SW, Roca-Cusachs P, Sheetz MP. Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell.* 2010;19(2):194-206.
62. Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater.* 2014;13(6):645-52.
63. Tse JR, Engler AJ. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol.* 2010;Chapter 10:Unit 10 6.
64. Wang YL, Pelham RJ, Jr. Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods Enzymol.* 1998;298:489-96.
65. Gulrez SKH, Al-Assaf S. *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications* 2011 2011-08-01.
66. Ríos RAA. Evaluación del papel de la rigidez del sustrato en la respuesta de colapso de conos de crecimiento de neuronas de ganglios de la raíz dorsal inducidos por la semaforina 3A recombinante. Querétaro, Qro.: Universidad Autónoma de Querétaro; 2010.
67. OMS. Lesiones medulares. Nota descriptiva [Internet]. 2013; (no. 384). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs384/es/>.
68. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estadísticas a propósito del... día internacional de las personas con discapacidad (3 de Diciembre). Aguascalientes, México: INEGI; 2015; Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/discapacidad0.pdf>
69. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Discapacidad en México. México: INEGI; 2010; Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/discapacidad.aspx>.
70. Jiménez-Ávila JM, Calderón-Granados A, Bitar-Alatorre WE. Costo directo de las lesiones en la columna. *Cir Cir.* 2012;80(5):435-41.

71. Estrada-Mondaca S, Carreón-Rodríguez A, Parra-Cid MdC, León CI-Pd, Velasquillo-Martínez C, Vacanti CA, et al. Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública de México*. 2007;49:437-44.
72. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70(18):1630-5.
73. Tang XQ, Tanelian DL, Smith GM. Semaphorin3A inhibits nerve growth factor-induced sprouting of nociceptive afferents in adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 2004;24(4):819-27.
74. Grinnell F, Ho C-H. The effect of growth factor environment on fibroblast morphological response to substrate stiffness. *Biomaterials*. 2013;34(4):965-74.
75. SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación; 22 de Agosto del 2001. p. 57.
76. Bonfeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse*. 2008;62(4):302-9.
77. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 2004;26(6):509-15.
78. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45-e.
79. Wen JH, Taylor-Weiner H, Fuhrmann A, Engler AJ. Cell Mechanics on Surfaces. *Biomaterials Surface Science: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2013. p. 511-37.
80. Leipzig ND, Shoichet MS. The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. *Biomaterials*. 2009;30(36):6867-78.
81. Betz T, Koch D, Lu YB, Franze K, Kas JA. Growth cones as soft and weak force generators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13420-5.
82. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*. 2000;79(1):144-52.

83. Solon J, Levental I, Sengupta K, Georges PC, Janmey PA. Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates. *Biophysical Journal*. 2007;93(12):4453-61.
84. Ciobanasu C, Faivre B, Le Clairche C. Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur J Cell Biol*. 2013;92(10-11):339-48.
85. Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA. Polymerizing Actin Fibers Position Integrins Primed to Probe for Adhesion Sites. *Science*. 2007;315(5814):992.
86. Sack KD, Teran M, Nugent MA. Extracellular Matrix Stiffness Controls VEGF Signaling and Processing in Endothelial Cells. *J Cell Physiol*. 2016;231(9):2026-39.
87. Engler A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher D. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J*. 2004;86(1 Pt 1):617-28.
88. Gallo G, Letourneau PC. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol*. 2004;58(1):92-102.
89. Kawasaki T, Bekku Y, Suto F, Kitsukawa T, Taniguchi M, Nagatsu I, et al. Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development*. 2002;129(3):671-80.
90. Kawakami A, Kitsukawa T, Takagi S, Fujisawa H. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J Neurobiol*. 1996;29(1):1-17.
91. Yaqoob U, Cao S, Shergill U, Jagavelu K, Geng Z, Yin M, et al. Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2012;72(16):4047-59.
92. Suto F, Murakami Y, Nakamura F, Goshima Y, Fujisawa H. Identification and characterization of a novel mouse plexin, plexin-A4. *Mech Dev*. 2003;120(3):385-96.
93. Perala NM, Immonen T, Sariola H. The expression of plexins during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*. 2005;5(3):355-62.

94. Gutekunst CA, Stewart EN, Gross RE. Immunohistochemical Distribution of PlexinA4 in the Adult Rat Central Nervous System. *Front Neuroanat.* 2010;4.
95. Mauti O, Sadhu R, Gemayel J, Gesemann M, Stoeckli ET. Expression patterns of plexins and neuropilins are consistent with cooperative and separate functions during neural development. *BMC Dev Biol.* 2006;6(1):1-13.
96. Iwashita M, Kataoka N, Toida K, Kosodo Y. Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain. *Development.* 2014;141(19):3793-8.
97. H. Congreso de la Unión. Ley Federal de Sanidad Animal. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación; 25 de julio de 2007, Última Reforma DOF 07-06-2012.
98. SEMARNAT. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación; 17 de febrero de 2003. p. 11.
99. STPS. Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas. Diario Oficial de la Federación; 02 de Febrero de 1999. p. 11.
100. SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación; 16 de Julio de 1996. p. 19.
101. SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, trato humanitario en la movilización de animales. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación; 23 de Marzo de 1998. p. 21.

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución de los elementos del citoesqueleto en el cono de crecimiento	5
Figura 2. Distribución y dinámica de los elementos del citoesqueleto en el cono de crecimiento.....	6
Figura 3. Etapas de formación de un nuevo segmento axonal.	8
Figura 4. Esquema de las diferentes clases de semaforinas y sus características estructurales.	13
Figura 5. Formación del complejo receptor Sema3/Neuropilina/Plexina A.....	14
Figura 6. Mecanismo molecular por el cual semaforina 3A (Sema3A) inhibe la adhesión celular a la matriz extracelular	16
Figura 7. Micrografías de neuronas de GRD (E14.5) cultivadas sobre HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2 mg/ml).....	42
Figura 8. Distribución de actina polimerizada y β III-tubulina en el cono de crecimiento de neuronas de GRD al crecer sobre geles HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml)	48
Figura 9. Electroforesis de los productos de PCR	50
Figura 10. Inmunotinción del receptor Nrp-1 en neuronas de GRD cultivadas sobre geles HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2mg/ml)	54
Figura 11. Propuesta de modelo sobre el posible efecto de la rigidez del sustrato ejercido en las neuronas de GRD	64

Índice de gráficas

Gráfica 1. Área del cono de crecimiento de neuronas de GRD (E14.5) al crecer sobre HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml).....	43
Gráfica 2. Número de filopodios en el cono de crecimiento de neuronas de GRD (E14.5) al crecer sobre HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml).	44
Gráfica 3. Longitud axonal de neuronas de GRD (E14.5) al crecer sobre geles HAB con diferente rigidez recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml - 0.2 mg/ml)	46
Gráfica 4. Distribución de actina polimerizada- β III-tubulina en el cono de crecimiento de neuronas GRD cultivadas <i>in vitro</i> sobre geles HAB de diferente rigidez.....	49
Gráfica 5. Expresión relativa del ARNm del receptor Nrp-1 en neuronas de GRD cultivadas sobre HAB con diferente rigidez, recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2 mg/ml) ..	51
Gráfica 6. Expresión relativa de ARNm del receptor Plexina A4 (PlxA4) en neuronas de GRD cultivadas sobre sustratos con diferente rigidez, recubiertos con PLO-colágena (0.1mg/ml-0.2 mg/ml).....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Cantidad de reactivos requeridos para la elaboración de geles de poli(acrilamida con diferente rigidez.....	28
Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para el ensayo de qRT-PCR, tamaño del fragmento amplificado, número de acceso en GeneBank y referencia.	38

Anexo 1

Soluciones

a) PBS 10X

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

b) PFA 3.5%

Reactivo	Para 1 L
Paraformaldehído	35 g
PBS 1X	1000 ml
NaOH 5N	1 ml

c) Colágena (0.2 mg/ml)

Reactivo	Para 1 ml
Colágena tipo I (4mg/ml)	50 µl
DMEM	950 µl
MEM 10X	1.5 µl
NaOH 0.1N	1.5 µl

d) Medio de montaje DABCO

Reactivo	Para 10 ml
1,4-diazabicyclo[2.2.2] octano (DABCO)	0.233 g
Tris-HCl 1M pH8	200 µl
Glicerol	9 ml
Agua MilliQ estéril	800 µl

Medio de cultivo

Medio GRD

Reactivo	Para 50 mL
DMEM F12	12.5 ml
Opti-MEM	34.5 ml
Glutamina (200mM)	0.5 ml
Penicilina/Estreptomicina (10,000µg/ml)	0.5 ml
SFB inactivado	0.25 ml
Glucosa 1M	1.75 ml

Anexo 2



El Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Ciencias de la Salud (CICUAL-ICS) ha revisado el protocolo denominado:

Papel de las Propiedades físicas del sustrato
sobre la proyección axonal inducida por
semaforina 3A

No. de registro ante CICUAL-ICS: 2015-0004

El cual fue sometido para su evaluación por:

(Responsable) Elisa H. Tamariz Domínguez
(Suplente) Ana Monserrat Vela Alcántara

En la fecha
(dd/mm/aa) 31/10/14

y en base a los lineamientos expuestos en la NOM-062-ZOO-1999, denominada "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio", y a las atribuciones de este comité, se ha resuelto (aprobar/ no aprobar) Aprobar el protocolo.

Av. Luis Castelazo
Ayala s/n
Col. Industrial Animas
Kilómetro 3.5
Carretera
Xalapa-Las Trancas
C.P. 91190

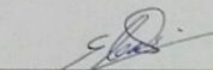
Xalapa, Veracruz,
Mexico

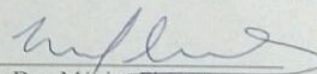
Teléfono
(228) 8 41 89 25

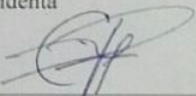
Fax
(228) 8 41 89 26

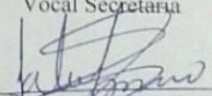
Correo
ics@uv.mx

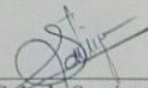
Miembros del CICUAL-ICS


Dra. Elisa H. Tamariz Domínguez
Presidenta


Dra. Mónica Flores Muñoz
Vocal Secretaria


MVZ, Dr. Genaro Alfonso Coria Avila
Vocal


Dr. Fabio Alfredo García García
Vocal


M. en C. Isela Santiago Roque
Vocal

Fecha: (dd/mm/aa) 28/01/15

c.c.p. Archivo CICUAL-ICS
c.c.p. Responsable del protocolo