

Desarrollo de una herramienta nanotecnológica en cultivos neuronales que permita aislar el compartimento axonal del somático para realizar tratamientos diferenciales.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas.



Tesinista: Sami Jalil

Firma

Director: Dr. Nicolás Unsain

Firma

Co-Director: Dr. Mariano Grasselli

Firma

Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra
INIMEC-CONICET-UNC

Año 2017

Desarrollo de una herramienta nanotecnológica en cultivos neuronales que permita aislar el compartimento axonal del somático para realizar tratamientos diferenciales.

Tribunal Examinador:

Apellido y Nombre: Dra. Suarez, Marta M.

Firma

Apellido y Nombre: Dr. Garcia, Daniel A.

Firma

Apellido y Nombre: Dr. Guidobaldi, Alejandro

Firma

Calificación:

Fecha:

Índice

Resumen	4
Introducción	5
Dispositivos para cultivo compartimentarizado	6
Modelo de estudio neuronal	10
Necesidad de un nuevo sistema de cultivo neuronal.....	11
Nuestra propuesta.....	11
Hipótesis	15
Objetivos	15
Materiales y métodos	16
Resultados	21
1) Análisis de toxicidad.....	21
2) Análisis de difusión.....	26
3) Caracterización del crecimiento axonal a ambos lados de la membrana:.....	29
4) Análisis de difusión en cultivo neuronal.....	33
5) Demostración de la efectividad del sistema en modelos de degeneración axonal local	35
Conclusión	38
Discusión	39
Bibliografía	40

Tabla de abreviaturas

DRG	Ganglio de la Raiz Dorsal
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
MPs	Micropartículas
PEI	Polietilenimina

“Desarrollo de una herramienta nanotecnológica en cultivos neuronales que permita aislar el compartimento axonal del somático para realizar tratamientos diferenciales.”

Palabras Clave:

Axón, Neurona, Ganglio de la Raíz Dorsal, Privación Local, Cultivo Celular, Micropartículas, Nanotecnología.

Resumen

Las neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG) son células altamente polarizadas y constituyen la base del flujo de información del Sistema Nervioso Periférico Aferente. Las mismas poseen dos dominios celulares claramente diferenciados morfológica y funcionalmente: el somático y el axonal. En el cuerpo humano, estos dos dominios se encuentran en microentornos que difieren significativamente el uno del otro.

Para poder estudiar neuronas en cultivo *in vitro* de forma tal que recree la heterogeneidad del microentorno *in vivo*, ideamos una estrategia de cultivo en dos compartimentos separados para evitar la difusión de moléculas entre el compartimento superior (donde se encuentran los cuerpos neuronales) y el compartimento inferior (donde solo crecen axones). Los mismos se encuentran separados por una membrana con poros perfectos (track-etched) de 1 μm de diámetro. La estrategia se basa en el bloqueo de los poros *luego* del crecimiento axonal, empleando Micropartículas poliméricas (MPs) diseñadas *ad hoc* que interaccionan con dichos poros de forma electroestática y lo taponan.

En el presente trabajo, hemos determinado que la mejor combinación para lograr un bloqueo significativo se obtiene usando MPs de 800 nm y sulfonadas (carga negativa) en membranas track-etched tratadas con Polietilenimina (carga positiva). También hemos podido comprobar que se produce un bloqueo significativo de la difusión de anticuerpos durante 24h en condiciones de cultivo. Así mismo hemos descartado la toxicidad de las MPs tanto en cultivos de líneas celulares (HEK293T) como en cultivos primarios neuronales. Por último, utilizamos esta nueva estrategia para realizar una privación local de factor trófico (NGF) en neuronas sensoriales demostrando la funcionalidad de la herramienta desarrollada.

Introducción

El Sistema Nervioso es el conjunto de órganos y estructuras más complejo del cuerpo humano. Sus componentes, principalmente neuronas y glía, se encuentran entre las células más plásticas y energéticamente activas del cuerpo humano. Sus innumerables funciones van desde las más básicas, como mantener nuestra respiración y pulso cardíaco, hasta las más elevadas, como contener nuestras memorias, formar nuestra conciencia y constituir la base biológica de nuestros pensamientos.

Las neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG), piezas claves en este sistema, son células altamente polarizadas. Morfológica y funcionalmente constan de dos dominios celulares claramente diferenciados (Fig. 1):

- **El dominio somático:** Consta del cuerpo celular (soma) y el Segmento Inicial del Axón (que representa una transición con el dominio siguiente).
- **El dominio axonal:** Formado por el axón que se define como un proceso largo que se proyecta desde el soma y finaliza en una Terminal Axonal.

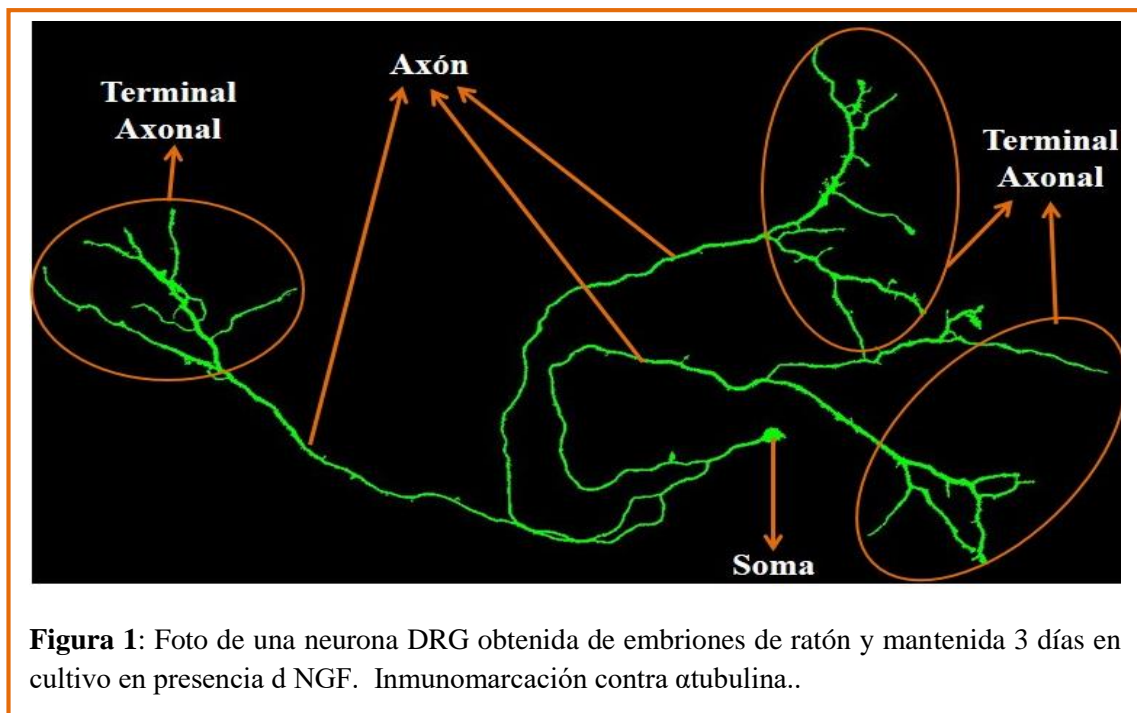


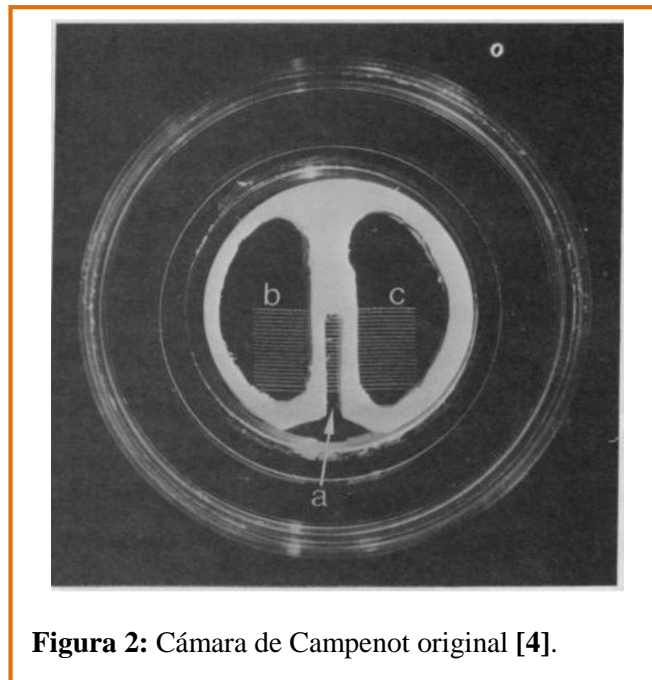
Figura 1: Foto de una neurona DRG obtenida de embriones de ratón y mantenida 3 días en cultivo en presencia d NGF. Inmunomarcación contra α tubulina..

Los dominios somático y axonal no solamente son funcional y estructuralmente distintos sino que también responden de manera particular a señales extracelulares y sufren procesos diferentes durante el desarrollo y la degeneración neuronal. Además, en su ambiente natural dentro del cuerpo humano, cada uno de ellos interacciona con un micro entorno exclusivo y está expuesto a estímulos diferentes [1, 2, 3].

Debido a esta polarización, actualmente muchas técnicas de cultivo neuronal intentan recrear un sistema que permita someter a cada dominio a estímulos diferentes para así poder tratarlos de forma diferenciada. Entre los métodos de cultivo más sofisticados se encuentran las “Cámaras de Campenot” creadas en la década de los ‘70 [4] y los “Dispositivos Microfluídicos” ideados en los años 2000 [5]. Ambas técnicas son muy efectivas en cuanto al bloqueo de la difusión de moléculas entre los compartimentos axonal y somático, sin embargo son bastante costosas y permiten cultivar un número de neuronas relativamente bajo. Por otro lado, el tipo celular que estas técnicas permiten cultivar es muy restringido, ya que las neuronas deben poseer procesos largos para sortear las barreras físicas que estos sistemas imponen.

Dispositivos para cultivo compartimentarizado

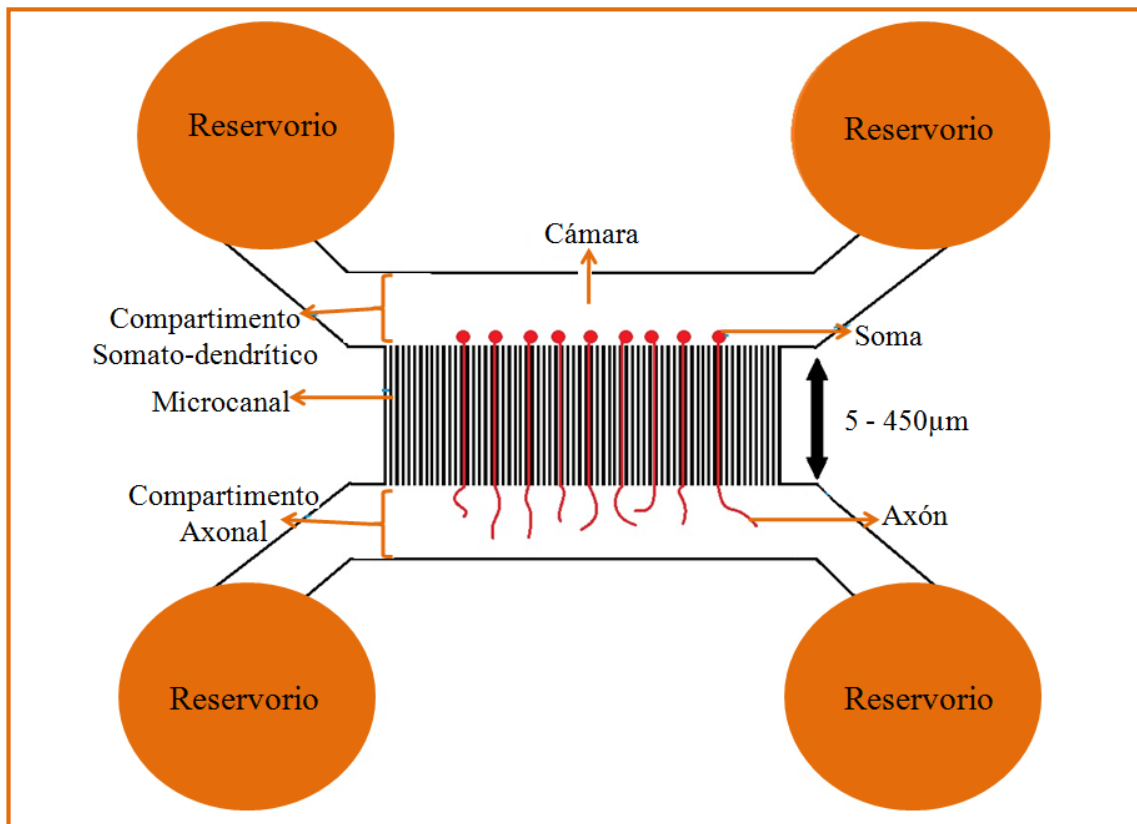
Cámara de Campenot



Una Cámara de Campenot (Fig. 2) está formada por una placa de Petri dividida en 3 cámaras mediante una estructura de Teflón que se adhiere a la placa mediante una sustancia grasa siliconada. El piso de la placa (que está en contacto con las neuronas) presenta una cobertura de colágeno. Las neuronas son cultivadas en la cámara “a” y los axones se extienden hacia las cámaras “b” y “c” siguiendo una serie de estrías paralelas. Las 3 cámaras están herméticamente separadas y no intercambian fluidos entre ellas.

A diferencia de otras técnicas de cultivo utilizadas en la época, las Cámaras de Campenot, introducidas en 1977, brindaron al usuario la posibilidad de compartimentar neuronas DRG de rata para lograr una manipulación local de factores tróficos. Gracias a esta herramienta, pudo determinarse que el Nerve Growth Factor (NGF) incrementa el crecimiento local de neuritas. Además, este sistema ha sido y es ampliamente utilizado en estudios de transporte axonal, transducción de señales locales y co-cultivos con otros tipos celulares, entre otras aplicaciones.

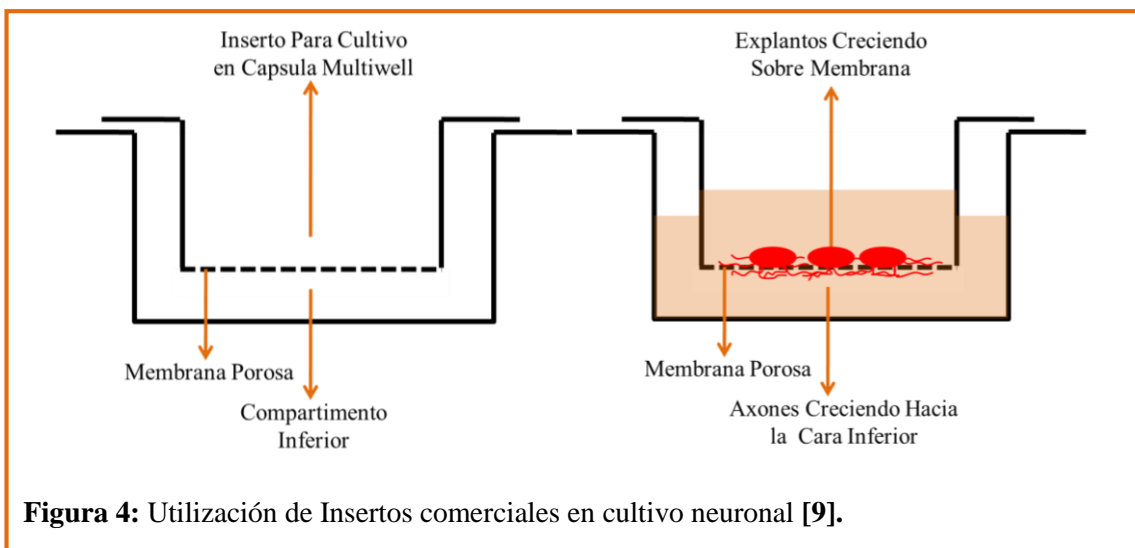
Dispositivo Microfluídico





Los dispositivos Microfluídicos (Fig. 3) están formados por dos cámaras idénticas de polímero elastomérico (PDMS) adheridas a un soporte de vidrio. Cada una de ellas está unida a 2 reservorios de medio de cultivo y están conectadas entre sí mediante microcanales muy angostos ($3\mu\text{m}$) cuya longitud va desde los $450\mu\text{m}$ a los 5mm. Debido a que los reservorios de una de las cámaras se llenan más que los de la otra y que el paso de líquido en los canales está muy restringido por su pequeño diámetro, se crea un gradiente de presión que impide la difusión de moléculas en una dirección. En el ejemplo de la figura 3, las moléculas del compartimento azul no difundirán hacia el compartimento rojo pero si existirá difusión en la dirección contraria.

Insertos de Cultivo



Otro sistema de separación física de axones y cuerpos neuronales es el de Insertos de Cultivo (Fig. 4). El dispositivo cuenta con una base formada por una membrana de poro perfecto (“track-etched”) cuyo diámetro es homogéneo. El operador coloca en la parte superior de la membrana las neuronas que desee cultivar, estas extienden axones y gran parte de ellos crece hacia la cara inferior de la membrana, penetrando por los poros. De esta forma se obtienen axones purificados en la cara inferior de la membrana. La desventaja de este método es que la difusión de moléculas entre ambos compartimentos es libre, ya que los poros no ocupados por los axones permiten el pasaje de solutos. [9, 10, 11]

Comparación entre los 3 dispositivos

	Cámaras de Campenot	Disp. Microfluídicos	Insertos de Cultivo
Posibilidad de aplicar un tratamiento diferencial	Muy bueno. La difusión entre ambos compartimentos queda completamente bloqueada.	Regular. La difusión puede ser bloqueada en una sola dirección.	No existe bloqueo de la difusión.
Crecimiento axonal.	Pobre. Pocos axones pasan el sello de grasa.	Regular.	Excelente.
Tiempo requerido por los axones para cruzar la barrera	7 días	4 días	1 día
Posibilidad de realizar estudios bioquímicos	Mala	Regular	Excelente
Video-microscopía	Regular	Buena	No es posible
Tipos neuronales aptos	Solo neuronas periféricas	Periféricas y algunas centrales (hipocampo)	Amplio rango de tipos neuronales
Dificultad del ensamblado y manipulación	Alta	Media	Nula
Costo	Bajo	Alto	Medio

Modelo de estudio neuronal

Para realizar el presente trabajo, utilizamos neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG), extraídas de embriones de ratones C57BL/6 de 13-14 días de gestación.

Las neuronas DRG son periféricas y transmiten impulsos sensoriales desde el cuerpo hacia el Sistema Nervios Central (SNC). Poseen axones largos y son pseudo-unipolares, es decir que su axón se ramifica en una rama distal que trae información desde la periferia y otra rama proximal que transmite el estímulo hacia el SNC.

Las ventajas de utilizar este tipo de neuronas en neurobiología son:

- Presentan un importante crecimiento axonal, rápido y robusto.
- Se puede generar una dependencia a NGF y al privarlas de tal factor trófico, se desencadena una degeneración que se utiliza como modelo de estudio para enfermedades neurodegenerativas.
- Su alta productividad de axones las hace buenos modelos para estudio de tráfico axonal y de degeneración axonal mediante axotomía.
- Su robusto y veloz crecimiento las hace ideales para estudios de citoesqueleto, dinámica de cono axonal y regeneración.
- Su obtención y mantenimiento en cultivo celular es más eficiente y sencillo que en otros tipos neuronales.
- Estas neuronas no desarrollan dendritas (prolongaciones del dominio somático que recibe impulsos nerviosos), por lo que los estudios son más específicos para biología axonal.

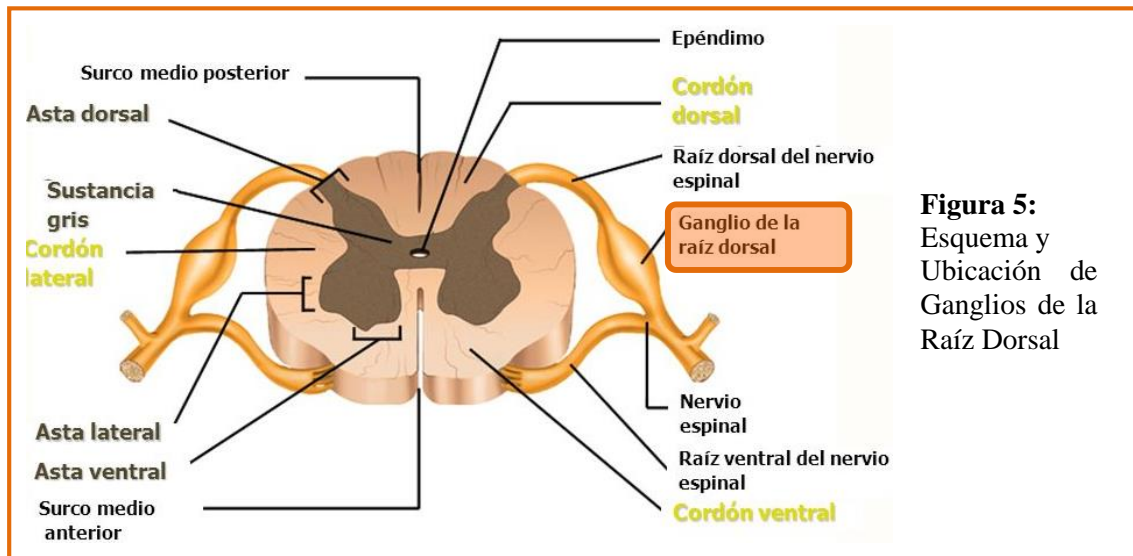


Figura 5: Esquema y Ubicación de Ganglios de la Raíz Dorsal

Los axones de las neuronas DRG (Fig. 5) se extienden desde el Ganglio (donde se encuentra el soma) ubicado al lado de la medula espinal hasta su órgano blanco ubicado en la periferia. De esta forma, la longitud axonal puede ser tan larga como la distancia entre la espalda y la punta de un dedo. Evidentemente, el microentorno que rodea al soma de estas neuronas es completamente diferente al de la terminal axonal. Es por ello que para poder estudiar *in vitro* su comportamiento es conveniente contar con un sistema de cultivo que permita recrear esta heterogeneidad en el microentorno en los dominios somático y axonal.

Necesidad de un nuevo sistema de cultivo neuronal

Debido a las razones expuestas anteriormente, surge la necesidad de crear y poner a punto un nuevo sistema de cultivo neuronal que permita:

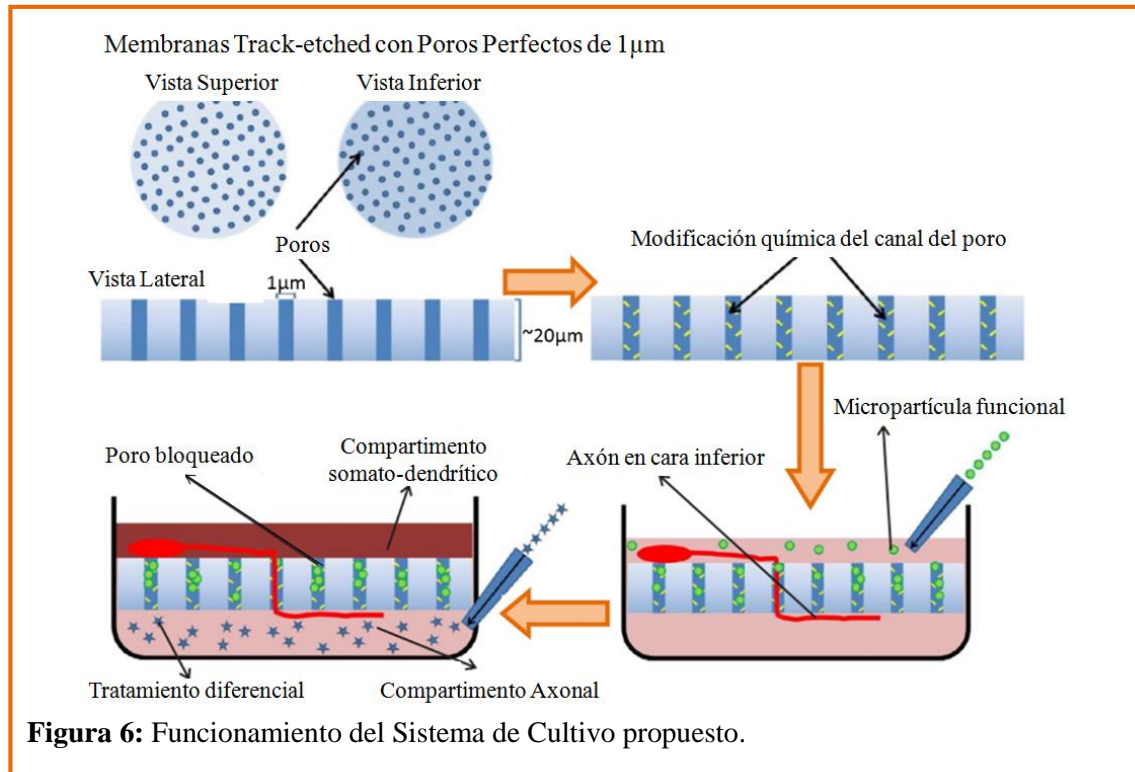
- Aplicar tratamientos de forma independiente en los dominios somático y axonal.
- Lograr un crecimiento axonal robusto y veloz.
- Generar una cantidad de material celular suficiente para realizar análisis bioquímicos.
- Cultivar distintos tipos neuronales (no solamente neuronas periféricas).
- Adaptarse de manera flexible a distintos modelos de estudio.
- Bajo costo y baja dificultad de ensamblado y manipulación.

Nuestra propuesta y puesta a punto del sistema

Al inicio de este proyecto nos propusimos modificar los poros (1 μm de diámetro) de membranas track-etched en insertos de cultivo comerciales con diferentes ligandos para hacerlos complementarios a Micropartículas (MPs) de metacrilato fabricadas *ad hoc* de acuerdo a los requerimientos del sistema. El objetivo es que en el momento deseado por el usuario, el agregado de las MPs bloquee los poros e impida el transporte de solutos a través de la membrana (Fig. 6).

Gracias a una colaboración con el Laboratorio de Materiales Biotecnológicos (LaMaBio) a cargo del Dr Mariano Grasselli ha sido posible generar y poner a punto el sistema propuesto.

Las MPs fueron generadas a través de síntesis radio inducida [12] y la superficie de las mismas fue derivatizada químicamente con grupos sulfónicos [13], de acuerdo a protocolos de LaMaBio [14]. De esta forma fue posible lograr una química complementaria entre las Micropartículas y los canales, lo que permite el bloqueo de los poros (Fig. 6).

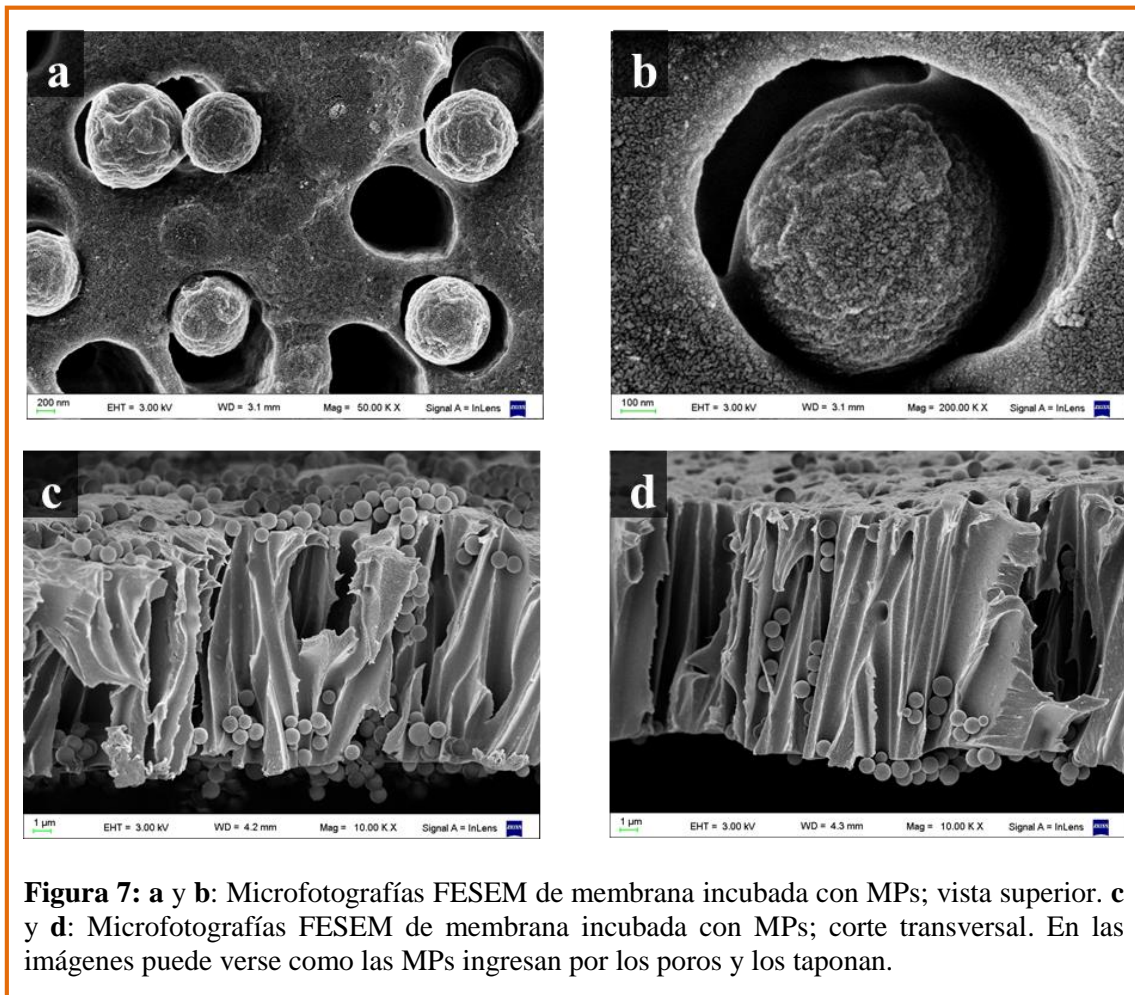


En un primer momento la membrana del inserto comercial de cultivo debe ser tratada con sustratos utilizados para el cultivo neuronal (Polietilenimina (PEI), Laminina y Colágeno). Luego se procede a cultivar del lado superior las neuronas (en nuestro caso explantos de DRG). Una vez alcanzados los 3 días in vitro, ya se observa un crecimiento axonal robusto en la cara inferior. En ese momento para lograr la impermeabilización de la membrana, el operador debe tratarla con una solución de MPs poliméricas. Estas, al estar cargadas negativamente, interactúan por complementariedad de cargas con los poros perfectos de la membrana que presenta carga positiva debido al tratamiento con PEI (Fig. 7).

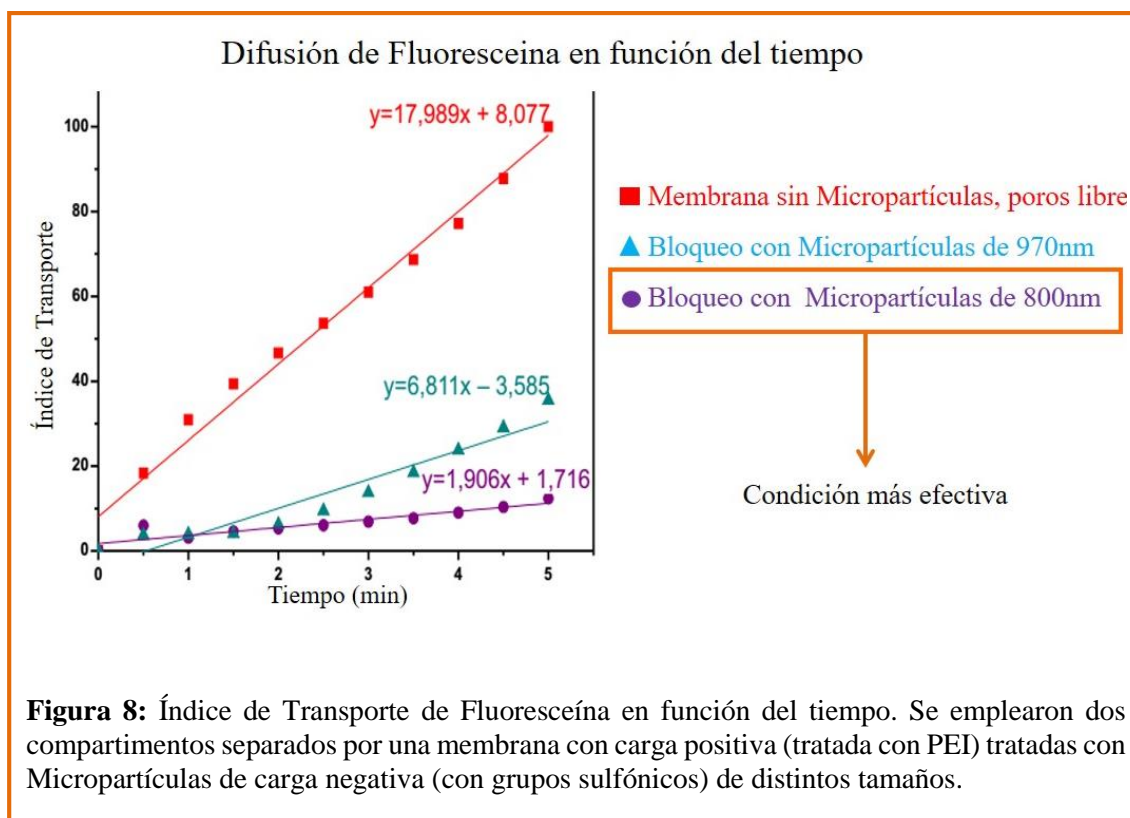
Debido a la fuerte interacción entre cargas eléctricas específicas, la unión es irreversible y mantiene los poros bloqueados impidiendo la difusión entre ambos compartimentos. En consecuencia, se logra un aislamiento fluido efectivo entre el compartimento superior (donde están ubicados los cuerpos celulares) y el inferior (donde

crecen los axones) (Fig. 6), lo que permite realizar tratamientos diferenciales a partir del momento del bloqueo.

Este sistema permite tratar diferencialmente con drogas y factores tróficos a los dominios somático y axonal. También posibilita el aislamiento bioquímico y físico de ambos dominios, lo cual es indispensable para estudios moleculares. Es importante subrayar que este sistema será de gran relevancia por imitar las condiciones del cuerpo humano, donde los axones están permanentemente expuestos a un microambiente diferente al de sus cuerpos celulares (soma).



De acuerdo las mediciones realizadas por nuestros colegas de la Universidad de Quilmes, fue posible comprobar que existe un bloqueo efectivo de la difusión de fluoresceína (molécula relativamente pequeña, 376 Dalton, y soluble) cuando la membrana es tratada con la solución de MPs. Por otro lado, se determinó que la combinación más efectiva para el bloqueo de los poros es la obtenida mediante micro partículas de 800 nm con cargas negativas y membranas con cargas positivas, en un buffer con 100 mM KCl (Fig. 8).



El desarrollo, puesta a punto y evaluación de las distintas combinaciones de MPs y membranas fue realizado por Florencia Richieri en el marco del Seminario de Grado de la carrera de Biotecnología. El mismo se titula “*Diseño de nuevos materiales para cultivo in-vitro de neuronas*” (Bernal, octubre 2016). Los datos expresados en esta introducción y las Fig. 7 y 8 pertenecen a dicha investigación.

Hipótesis

“El dispositivo propuesto se adapta a las necesidades del cultivo neuronal y permite aislar físicamente y bloquear la difusión entre dos compartimentos, el superior (somático) y el inferior (axonal), sin alterar el desarrollo y la fisiología normal de las neuronas. Además, este dispositivo permite recrear procesos de degeneración neuronal local”

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar y perfeccionar un nuevo sistema de cultivo que permita realizar tratamientos diferenciales en los compartimentos somático y axonal.

Objetivos Específicos

1. Comprobar que las Micropartículas utilizadas en el sistema en estudio no son tóxicas para células neuronales ni interfieren en su correcto desarrollo y fisiología.
2. Evaluar el bloqueo efectivo de la difusión de anticuerpos en condiciones de cultivo celular.
3. Caracterizar el desarrollo axonal a ambos lados de la membrana del inserto.
4. Probar el sistema de bloqueo de poros en insertos con neuronas.
5. Demostración de la efectividad del sistema en modelos de degeneración axonal local.

Materiales y métodos

Animales: Utilizamos embriones de 13,5 días de gestación, cepa experimental de ratón C57 provenientes del Bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET- UNC). Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el CICUAL del Instituto (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación). Intentamos reducir al mínimo el número de manipulaciones y los animales utilizados.

Anticuerpos y reactivos: Utilizamos anticuerpos dirigidos contra alfa tubulina (Millipore) y anticuerpos neutralizantes anti-NGF descritos en trabajos anteriores [15]. Para visualizar estructuras de actina filamentosa (F-Actina) empleamos faloidina marcada con Alexa Fluor (comercial). La faloidina es un péptido bicíclico perteneciente a una familia de toxinas aisladas a partir de *Amanita phalloides* y se asocia fuertemente a actina polimérica fibrilar. Para pruebas de difusión utilizamos un anticuerpo asociado a ATTO647.

Cultivo y tratamientos: Obtuvimos explantos ganglionares de la raíz dorsal (DRG) a partir de embriones de ratón E13.5 y los cultivamos en insertos para cultivo celular comerciales para 12 pocillos *GreinerBio-one* (diámetro de poro 1µm, densidad de poros 2x 10⁶cm⁻², número de catálogo 665610). La membrana del inserto fue previamente recubierta con Polietilenimina (Sigma -Aldrich, 20 µl/ml), Laminina (Sigma Aldrich, 10 mg/ml) y Colágeno (PureCol, Avance BioMatrix, 0,1 mg/ml).

Como medio de cultivo utilizamos Neurobasal (Invitrogen) suplementado con 2% de GS21 (Invitrogen), 1% de L-glutamina (Wisent), 1% de penicilina/estreptomina (Wisent) y 20 mM 5-fluoro- 2-desoxiuridina (FDU, Sigma -Aldrich). Durante los primeros tres días de crecimiento axonal, complementamos el medio con 50 ng/ml de NGF (Alomone). Para lograr la privación de NGF cambiamos el medio de los insertos por uno basal libre de NGF suplementado con anticuerpo anti-NGFRab1 (1 mg/ml). [16]

Diseción de Embriones: A partir de ratonas preñadas (cepa experimental C57BL/6), obtuvimos embriones de 13,5 días de gestación. Fueron rápidamente decapitados y diseccionados bajo lupa y en campana de flujo laminar. Todas las herramientas y recipientes

que utilizamos fueron previamente esterilizados y tomamos las precauciones necesarias para evitar la contaminación de los cultivos celulares.

La disección se llevó a cabo en placas con base siliconada negra y en buffer fosfato salino (PBS). El protocolo que seguimos se ilustra en la siguiente imagen:

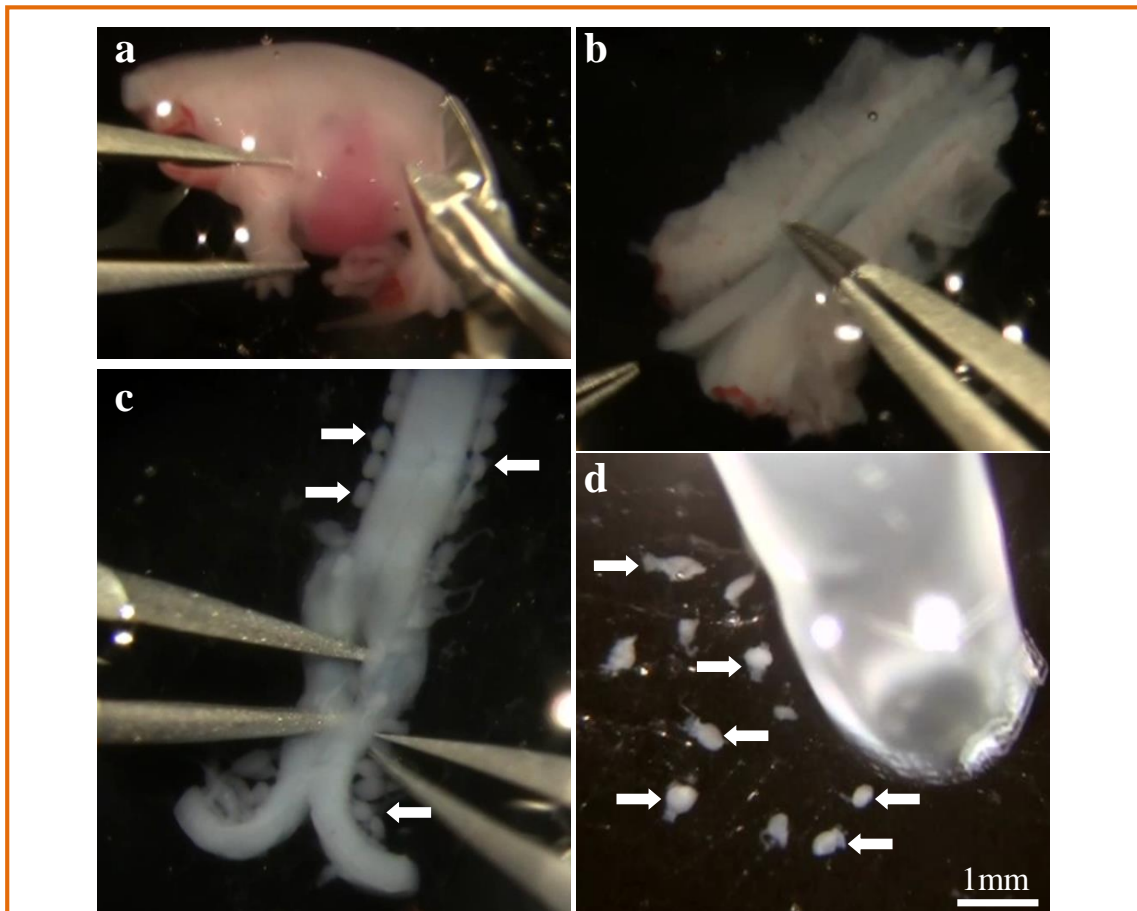


Figura 10: Obtención de Explantos Ganglios de la Raíz Dorsal a partir de embrión de ratón de 13,5 días de gestación. (a) Luego de decapitar el embrión, seccionamos y separamos la cintura pélvica. (b) Posteriormente extrajimos las vísceras dejando sólo la espalda, y con una tijera número 3 seccionamos la columna vertebral de forma longitudinal exponiendo la médula espinal (c) Utilizando dos pinzas extrajimos la médula espinal de la columna. De esta forma, la mayoría de los ganglios quedan adheridos a la médula, señalados por flechas. (d) Luego de despojar a los explantos del tejido conectivo circundante, los recogimos con una pipeta de 1000µl. Las flechas blancas marcan algunos de los ganglios disecados [16]

Inmunocitoquímica y cuantificación de la degeneración axonal: Fijamos los explantos de DRG cultivados en los filtros con 4% de para-formaldehído y 4% de sucrosa en buffer PBS (pH= 7,4) durante 15 min a temperatura ambiente. Después bloqueamos la muestra con solución de bloqueo (PBS, 5% Albumina Serica Bovina y 0,1% de Tritón X100).

Luego incubamos por 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos anti-tubulina, diluido 1:1000 en solución de bloqueo 1:5 en PBS. El anticuerpo secundario que usamos fue anti-ratón hecho en cabra conjugado con Alexa488 (Jackson Laboratory), y lo incubamos durante 1 h a temperatura ambiente. En este paso también añadimos la Faloidina-Alexa en dilución 1:1000

Posteriormente retiramos los filtros de los insertos y los montamos en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Scientific) con medio de montaje Mowiol. Para examinar la parte superior y la superficie inferior de los filtros realizamos cortes ópticos de 1,7 μm en un microscopio de disco giratorio DSU (Olympus IX81).

Realizamos el análisis de la degeneración axonal con un método de muestreo aleatorio sistemático, con cuatro imágenes por explanto, a 400 μm de distancia del centro del explanto y un total de 12-16 imágenes por filtro. Usando el software ImageJ NIH, determinamos el área axonal por el número total de píxeles detectados después de la binarización de la imagen utilizando la función de “threshold”. Para estimar el área ocupada por los píxeles de los axones “normales”, los axones degenerados y los fragmentos fueron excluidos por tamaño (definido como partículas pequeñas usando la función de “particle analysis”). Evaluamos al menos dos filtros por tratamiento y cada experimento se repitió al menos 3 veces.

Análisis de degeneración axonal: A partir de preparados inmunocitoquímicos, cuantificamos cambios en el citoesqueleto de actina y tubulina en axones y conos de crecimiento. Posteriormente analizamos dichos procesos de acuerdo a protocolos establecidos en bibliografía precedente [17].

Estimación de la muerte celular en HEK: Realizamos cultivos de la línea celular HEK293 vidrios tratados con PEI y Colágeno. Cuando los cultivos alcanzaron un 40% de confluencia (a las 24 h de ser repicados, aproximadamente) tratamos cada vidrio por 24 h con

vehículo (PB + NaCl 100 mM), concentración de uso de MPs ($4,5 \times 10^6$ Micropartículas disueltas en 50 μ l de buffer PB + NaCl 100mM) o una concentración 10 veces superior.

Posteriormente fijamos cada vidrio y lo teñimos con DAPI como marcador de núcleo (azul) y con Faloidina como marcador de actina (rojo). Estas tinciones nos sirvieron para contar el número total de células y el número de células no viables en proceso de muerte (núcleo condensado picnótico) a las 24 h del tratamiento. Con estos datos calculamos un porcentaje de muerte celular, es decir la cantidad de núcleos picnóticos dividida por el número de núcleos totales y llevada a porcentaje.

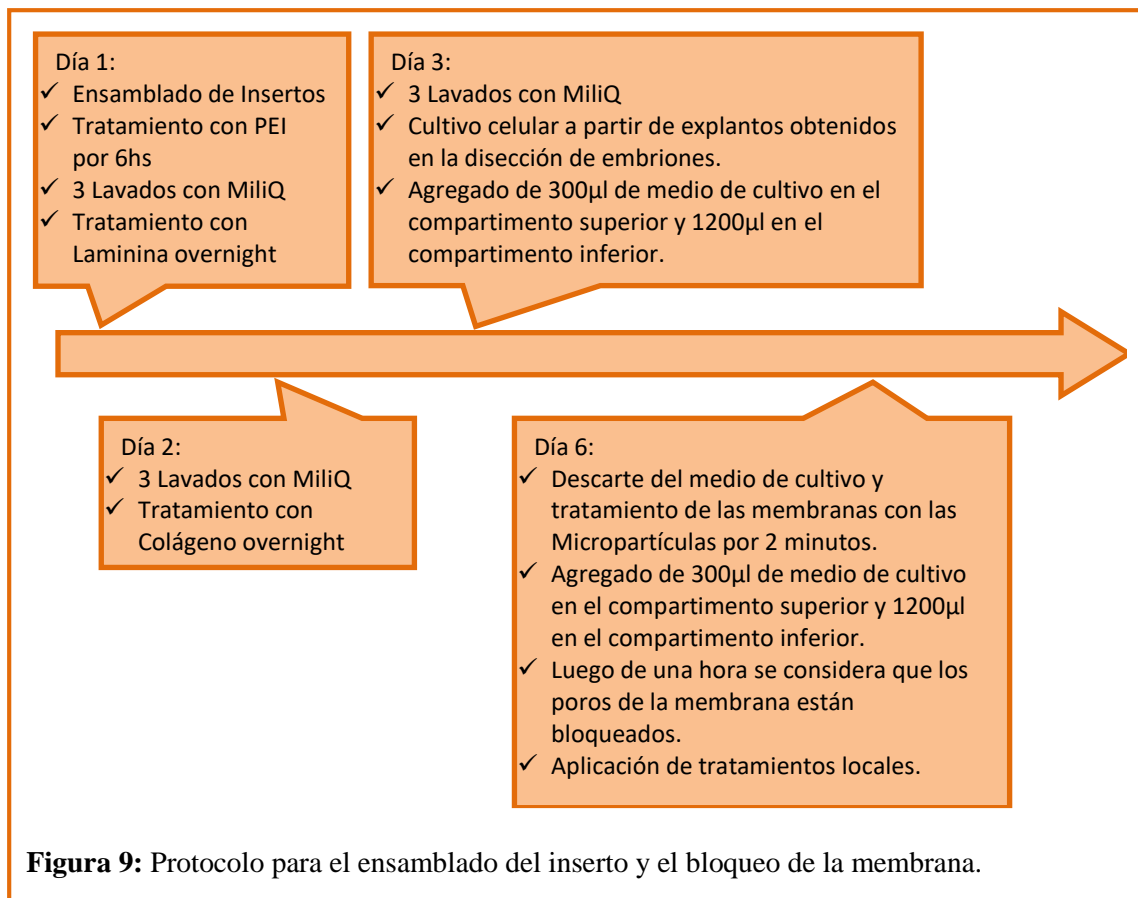
Evaluación de la difusión del anticuerpo: En distintos experimentos medimos el transporte del anticuerpo fluorescente Alexa Fluor 647 (AF647) desde el compartimento inferior hacia el superior del inserto y en condiciones de cultivo celular (medio Neurobasal, 37° C en incubadora). Para esto, colocamos el AF647 disuelto 1:1000 en medio de cultivo en el compartimento inferior, y luego del lapso temporal establecido en cada diseño experimental recuperamos muestras de ambos compartimentos.

Colocamos dichas muestras en cápsulas multi pocillo y las analizamos en Odyssey, un escáner que emite luz dentro del rango de excitación del fluoróforo y captura la luz emitida para formar una imagen. Luego medimos la intensidad de fluorescencia de cada pocillo mediante el software Image Studio.

Para calcular el índice de transporte (fracción del AF647 que difundió desde el compartimento inferior al superior), restamos la fluorescencia basal del blanco (medio sin AF647) y dividimos el valor obtenido en el compartimento superior por el obtenido en el inferior. Expresamos este índice en porcentaje.

Protocolo para la Utilización del Dispositivo de Cultivo Propuesto (Fig. 9):

- Tratar los insertos comerciales para 12 pocillos *GreinerBio-one* con los sustratos adecuados (PEI-laminina-colágeno). Luego cultivar los explantos de DRG por 3 días sobre la membrana del inserto. A lo largo de este período, muchos axones penetrarán los poros y crecerán sobre la cara inferior de la membrana.
- Al tercer día agregar $4,5 \times 10^6$ Micropartículas disueltas en $50 \mu\text{l}$ de buffer PB + NaCl 100mM. Esta solución debe ser añadida directamente sobre el cultivo celular sin medio de cultivo y por 2 min. Luego incorporar nuevamente el medio de cultivo.
- Pasada 1 h se considera que los poros de la membrana ya se encuentran bloqueados y se puede proceder a realizar tratamientos diferenciales en los compartimentos somático y axonal.



Resultados

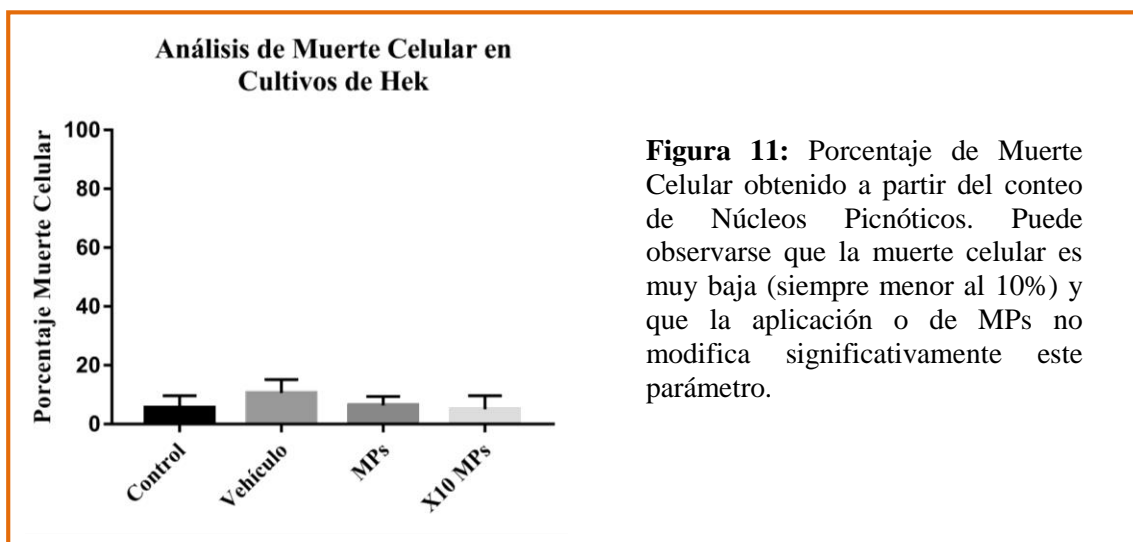
1) Análisis de toxicidad

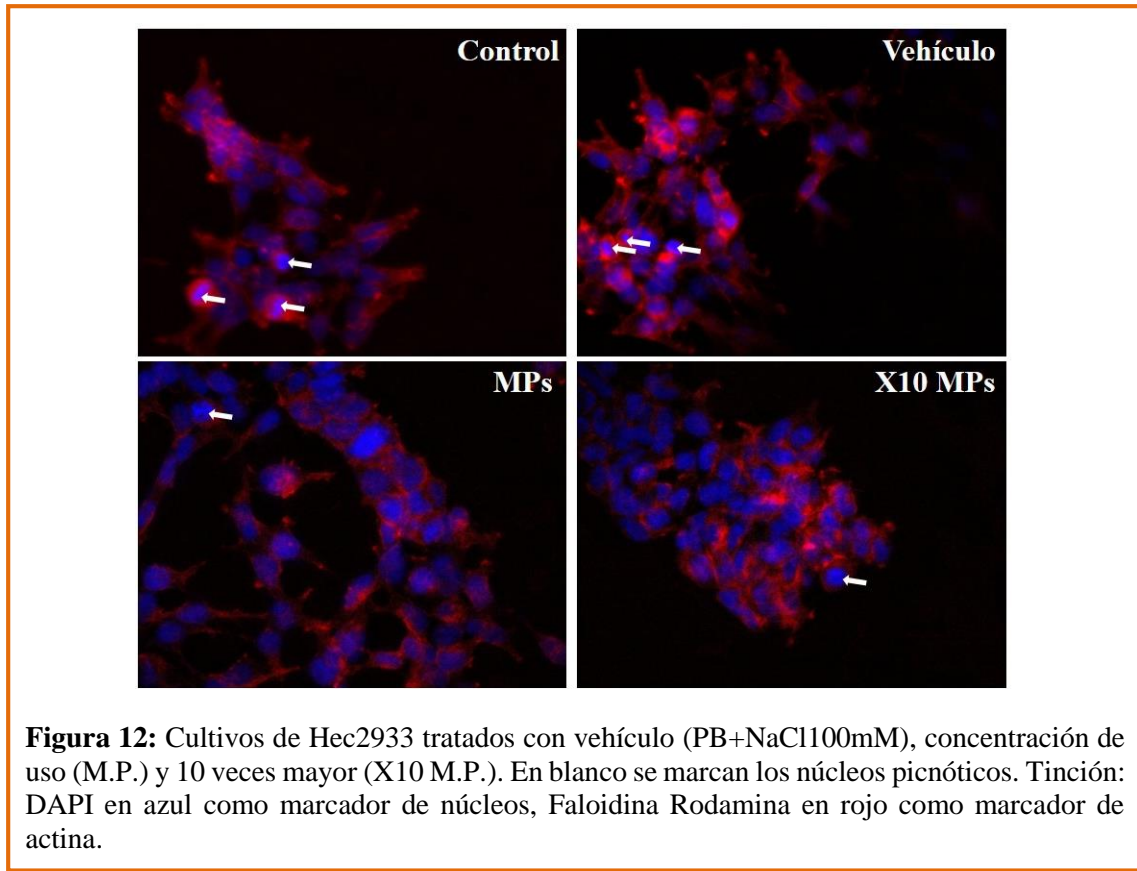
1.a) Toxicidad en células en cultivo

En un primer momento procedimos a evaluar la citotoxicidad de las MPs en cultivos de la línea celular HEK293T. Para ello utilizamos cultivos de dicha línea celular (realizados en vidrios tratados con PEI y Colágeno) que presentaban un 40% de confluencia y los tratamos por 24 h con:

- Sin tratamiento (Control)
- Vehículo (50µl Buffer PB + NaCl 100mM)
- Concentración de uso (MPs): $4,5 \times 10^6$ Micropartículas disueltas en 50µl de buffer PB + NaCl 100mM
- Concentración 10 veces superior a la misma (X10): $4,5 \times 10^7$ Micropartículas disueltas en 50µl de buffer PB + NaCl 100mM

El tratamiento con MP no afectó ni el número total de células ni el porcentaje de células con núcleo picnótico (Fig. 11 y 12), lo que indica que las MPs *per se* no son tóxicas para las células.





1.a) Toxicidad en procesos neuronales en cultivo

Posteriormente evaluamos si las MPs producen por sí mismas cambios morfológicos degenerativos en conos de crecimiento axonal y en axones. Los terminales axonales de neuronas sanas presentan una estructura rica en F-actina con forma de abanico, llamado cono de crecimiento axonal (CCA). Los CCA se retraen en presencia de señales inhibitorias en el medio o durante degeneración del axón. [12] Por ello, cuantificamos el porcentaje de terminales con CCA en las siguientes condiciones:

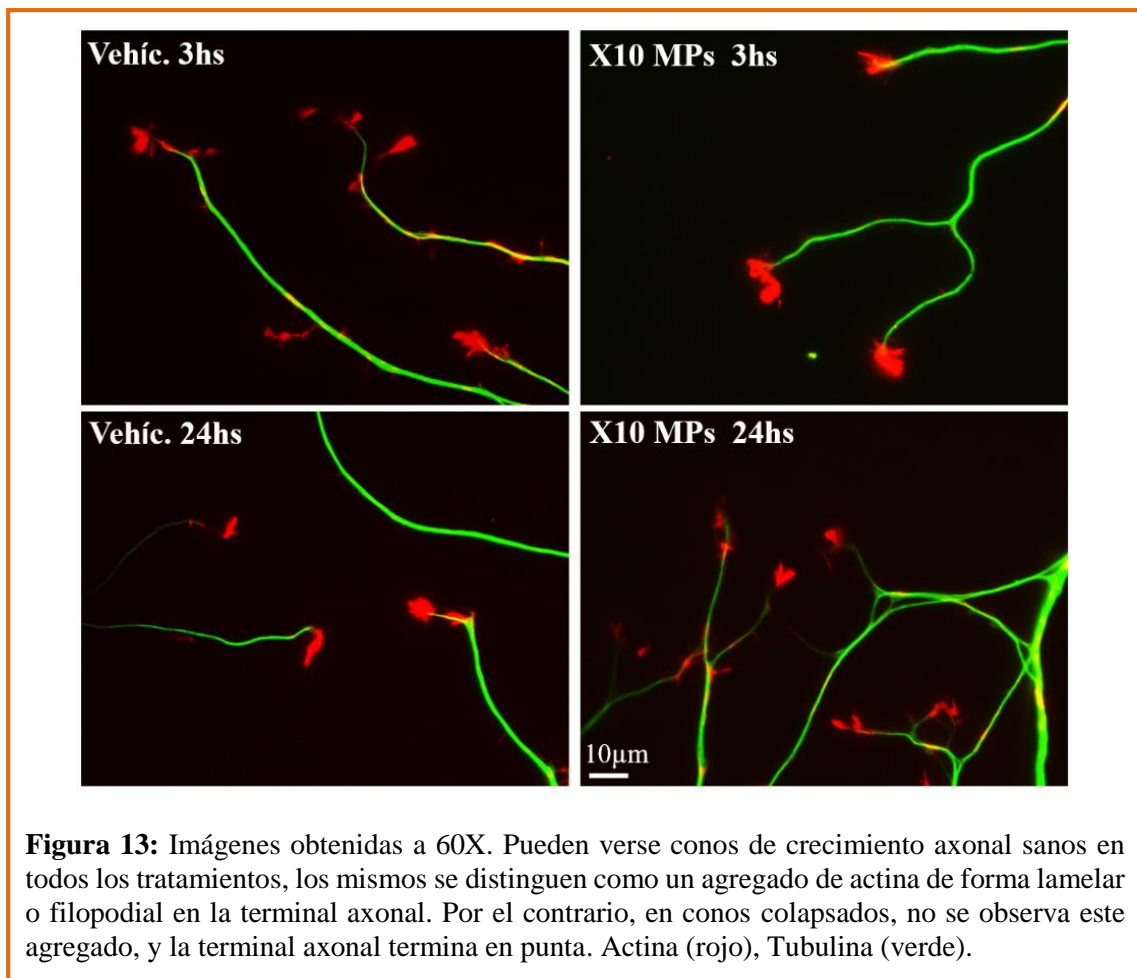
Para ello tomamos cultivos de explantos de DRG con 3 días in vitro realizados en vidrio con los sustratos adecuados (PEI-Laminina-Colágeno) y los tratamos por 2 min con:

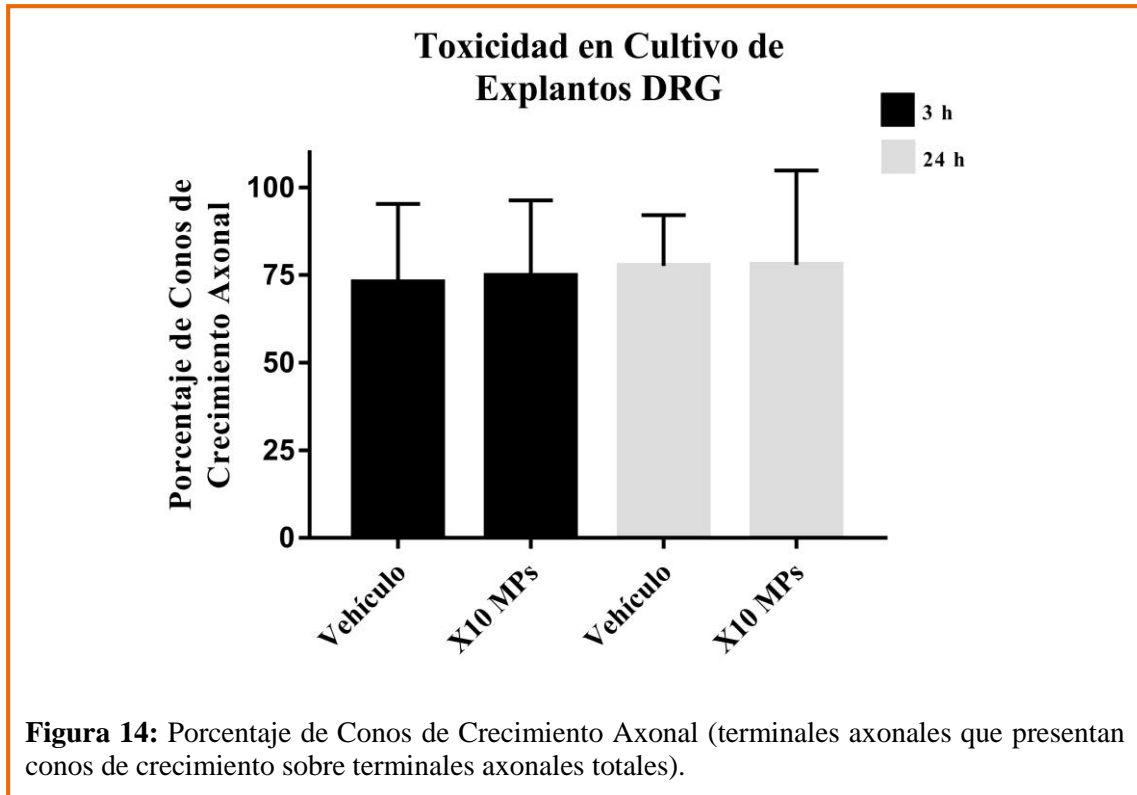
- Vehículo (50μl Buffer PB + NaCl 100mM)
- Concentración 10 veces superior a la de uso (X10 M.P): $4,5 \times 10^7$ Micropartículas disueltas en 50μl de buffer PB + NaCl 100mM

Luego adicionamos el medio de cultivo estándar y fijamos a 3 y 24 h. Seguidamente realizamos Inmunocitoquímica para marcar F-actina y tubulina (procedimiento explicado en Materiales y Métodos) y observamos las preparaciones en un microscopio de fluorescencia.

Para analizar la salud de las muestras contabilizamos los terminales axonales que presentaban conos de crecimiento (filopodiales o lamelares) y aquellas que no. La ausencia de conos de crecimiento axonal es una señal temprana de degeneración axonal [12], por lo que las muestras con un bajo “Porcentaje de Conos de Crecimiento Axonal” son consideradas afectadas por el tratamiento.

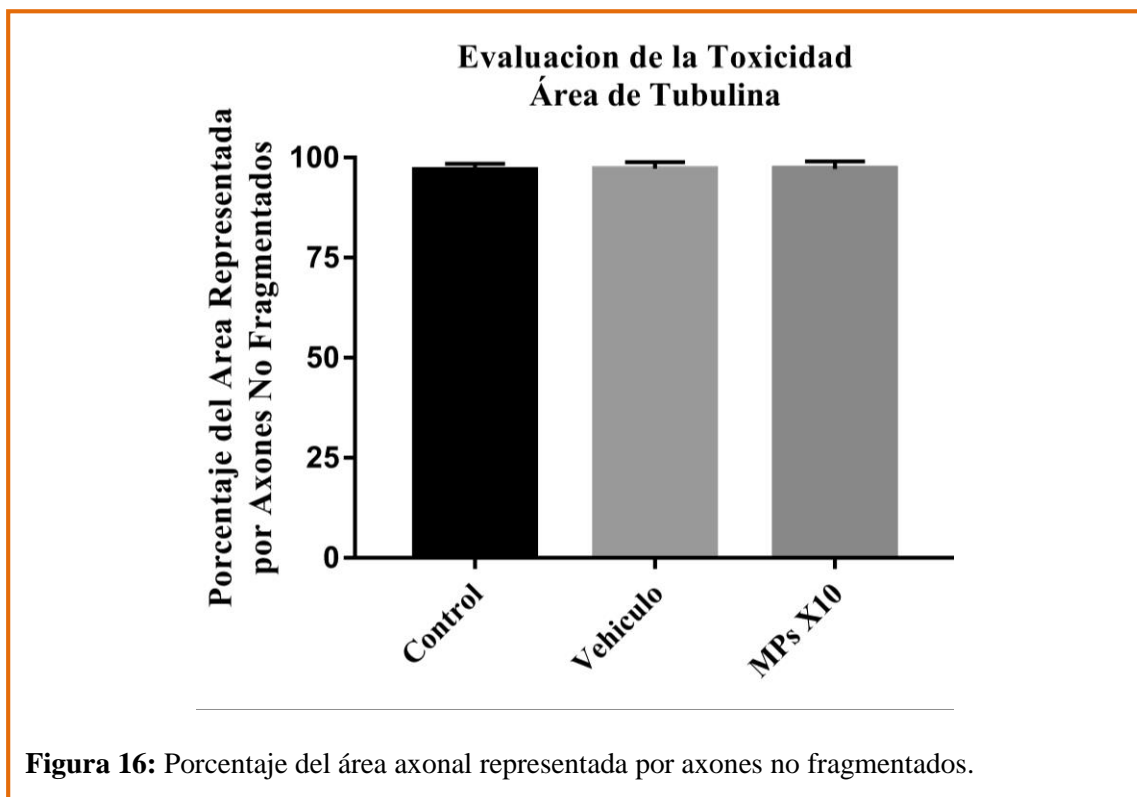
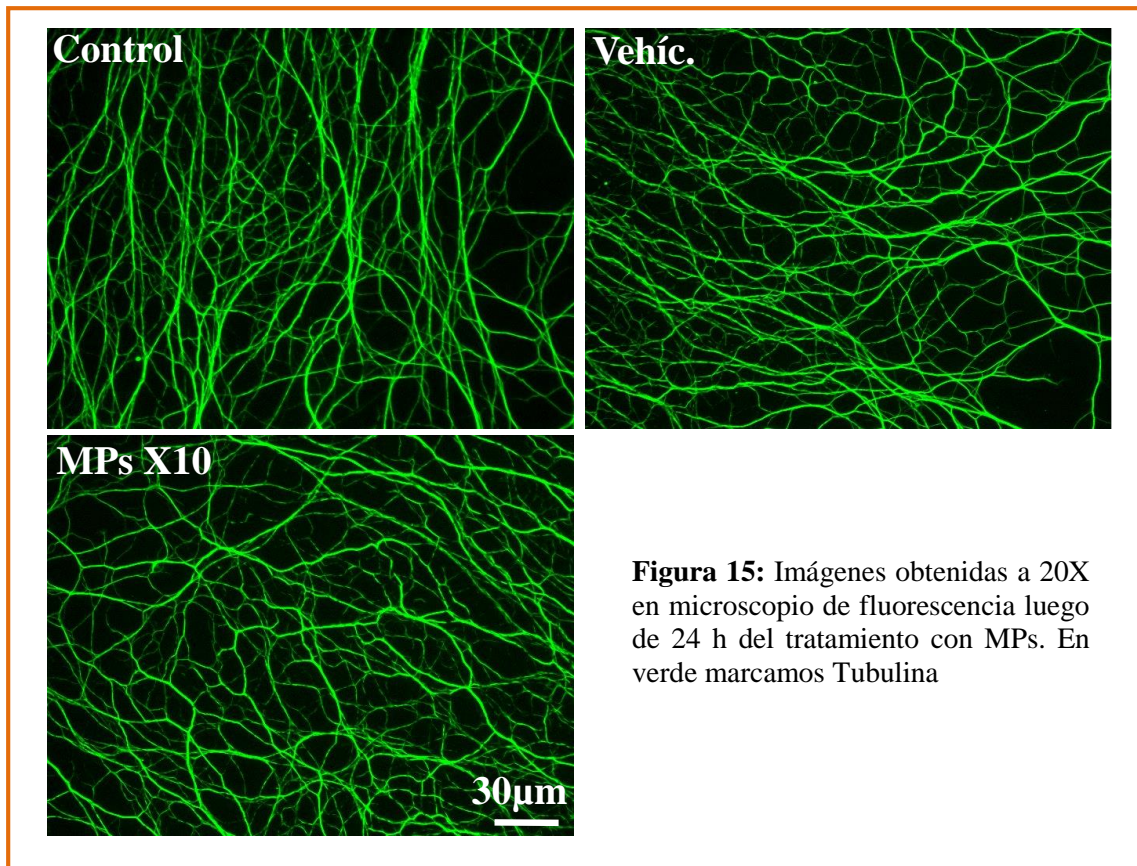
El resultado que arrojó este experimento fue el siguiente:





El porcentaje de CCA no se vio modificado por el agregado de las MPs, tanto a las 3 como a las 24 h (Fig. 13 y 14). Repetimos este experimento tres veces obteniendo resultados similares.

Como otra forma de cuantificar la salud axonal, aplicamos los tratamientos por 2 min y luego añadimos el medio de cultivo. 24 h después, las células fueron fijadas y teñidas por Inmunocitoquímica contra tubulina. Las fotografías fueron tomadas en la zona medial de los axones (a mitad de camino entre el cuerpo neuronal y los CCA) y se comparó el área ocupada por axones fragmentados y continuos entre los distintos tratamientos.



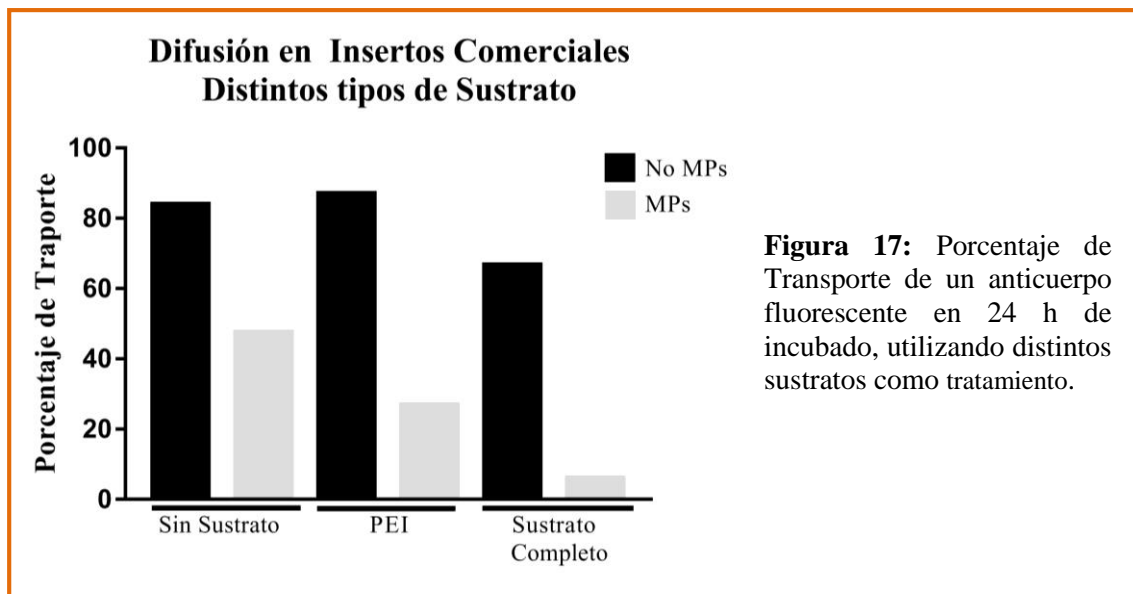
Los axones de los explantos en cultivo se mostraron en su mayoría no fragmentados y con una tinción de tubulina completa y continua (Fig. 15) y no observamos diferencias significativas entre el área ocupada por los axones entre los distintos tratamientos (Fig. 16). De esto pudimos concluir que el tratamiento no provocó una fragmentación axonal notable, lo cual hubiera indicado degeneración axonal. Repetimos este experimento dos veces, obteniendo resultados similares.

2) Análisis de difusión

Al iniciar los experimentos de bloqueo de difusión, quisimos saber cómo influía el sustrato de las membranas en la acción de las MPs. Para ello, medimos el transporte de un anticuerpo fluorescente (AF647) desde el compartimento inferior hacia el superior del inserto en un lapso de 24 h y en condiciones de cultivo celular (medio Neurobasal, 37° C en incubadora).

Las membranas fueron tratadas previamente con:

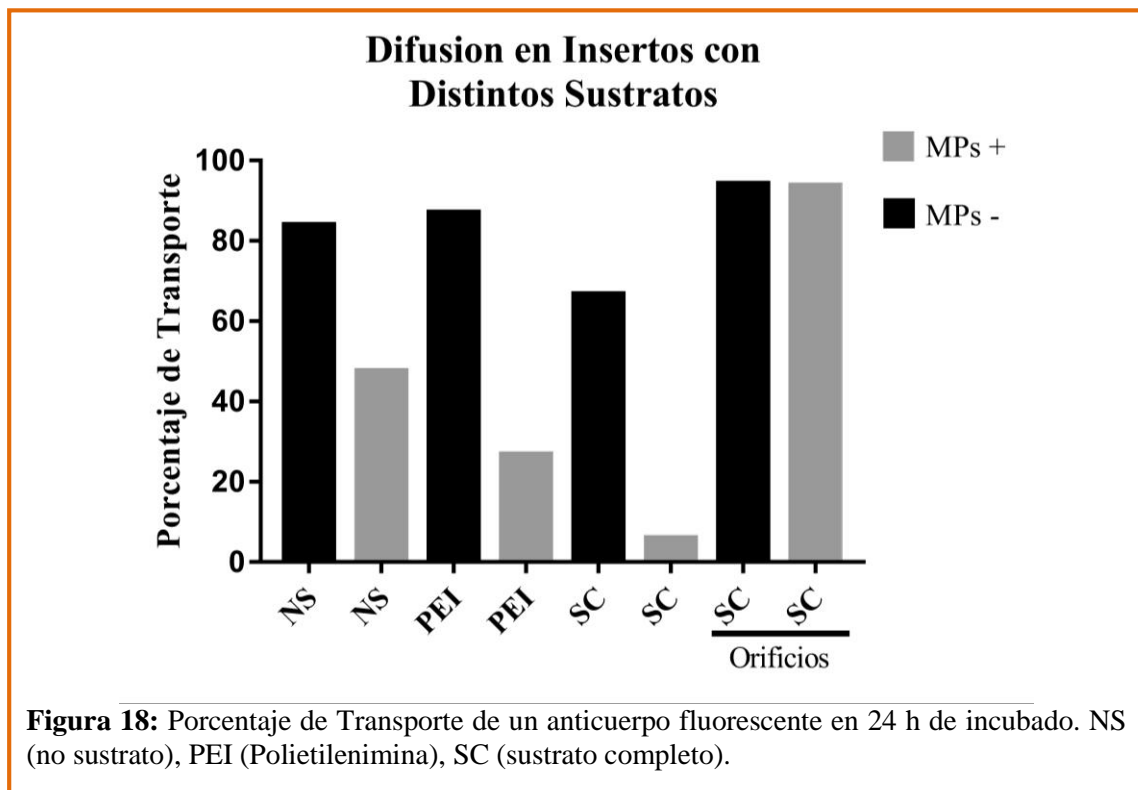
- Ningún tipo de sustrato: Sin Sustrato.
- Solo Polietilenimina: PEI.
- Sustrato completo: PEI + Laminina + Colágeno.



El hecho de tratar previamente a las membranas con el sustrato completo mejora el bloqueo del transporte de solutos, haciendo más efectivo el tratamiento con las MPs (Fig. 17)

Posteriormente, repetimos este experimento pero agregamos como control un inserto al que tratamos con el sustrato completo pero que también fue perforado para asegurar la libre difusión entre los compartimentos superior e inferior. Hicimos esto para demostrar que el sustrato completo no estaba interfiriendo por sí mismo con el anticuerpo (por ejemplo que lo mantenga del lado inferior por la sola absorción del mismo en un lado de la membrana). Nuevamente, tanto PEI solo como el sustrato completo incremente notablemente el efecto bloqueante de las MPs. Además, se pudo demostrar que aún con sustrato completo y en presencia de MPs, el anticuerpo puede difundir libremente por orificios hechos a posteriori con un alfiler (Fig. 18).

Debido a que encontramos en dos experimentos independientes el agregado del sustrato completo aumentó notablemente el bloqueo con MPs y a que para nuestro cultivo celular el sustrato completo es altamente ventajoso, no repetimos estos experimentos y a partir de este momento decidimos trabajar con el SC.



Por último, nos propusimos determinar si dejar las MPs sobre la membrana mejora su bloqueo, para decidir sobre el protocolo de uso de las MP más efectivo. Para eso, tomamos insertos adicionados con el sustrato completo y los tratamos de la siguiente forma:

- Control: Sin tratamiento.
- Vehículo: 50µl de buffer PB + NaCl 100µM por 2 min y luego se escurrió
- MPs Escurro: $4,5 \times 10^7$ Micropartículas disueltas 50µl de buffer PB + NaCl 100µM por 2 min y luego se escurrió.
- MPs No Escurro: $4,5 \times 10^7$ Micropartículas disueltas 50µl de buffer PB + NaCl 100µM por 2 min y no se escurrió (es decir que las MPs permanecieron con la membrana por las 24 h que duró la incubación con los anticuerpos).

Luego del tratamiento agregamos el medio de cultivo en el compartimento inferior y superior y el anticuerpo fluorescente solo en el inferior. Los insertos se dejaron incubando por 24 h a 37°C. Con este experimento pudimos mostrar que la mejor manera de usar las MPs era dejándolas en la membrana por la duración del experimento.

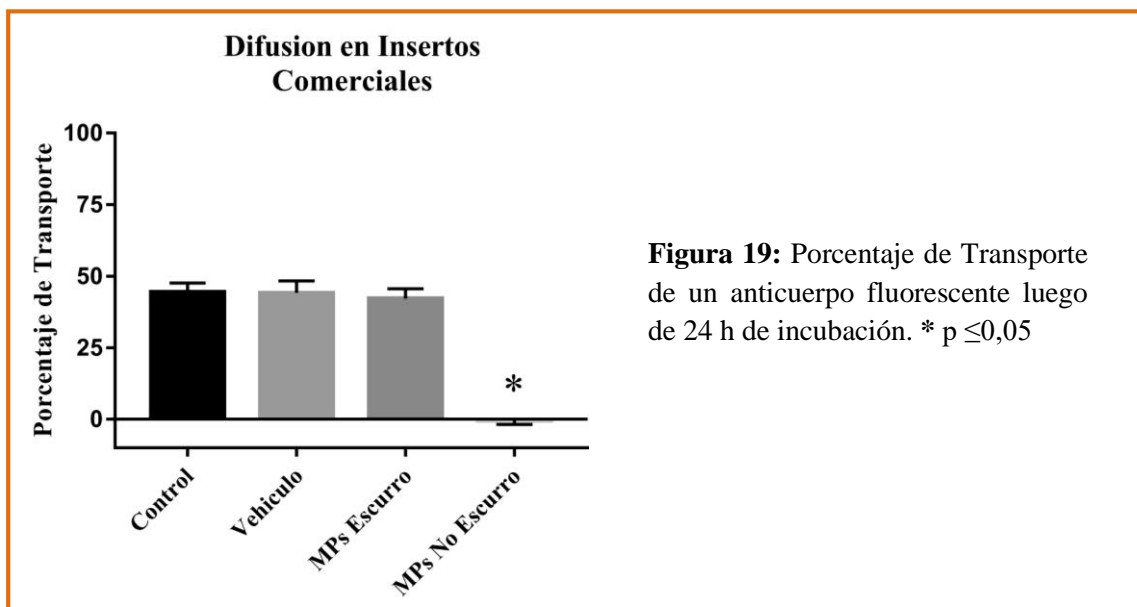


Figura 19: Porcentaje de Transporte de un anticuerpo fluorescente luego de 24 h de incubación. * $p \leq 0,05$

Al escurrir las Micropartículas el efecto de bloqueo de la difusión no se produce. Por otro lado, al dejar las Micropartículas en el inserto el efecto es marcado y significativo. (Fig.19)

3) Caracterización del crecimiento axonal a ambos lados de la membrana:

Para evaluar el crecimiento axonal en las membranas de los insertos, cultivamos explantos de DRG de acuerdo a los protocolos explicados en Materiales y Métodos. Al colocar los explantos en los insertos, agregamos el NGF necesario para la elongación axonal solamente en el compartimento inferior con el objetivo de incentivar a los axones a crecer de forma robusta en la cara inferior de la membrana. La difusión a través de las membranas no fue bloqueada con MPs en ningún momento, por lo que el NGF pudo difundir libremente entre los dos compartimentos.

Luego de 3 días de cultivo, los explantos fueron fijados y se realizó una tinción de tubulina. Para examinar la cara superior y la inferior de las membranas realizamos cortes ópticos de 1.7 micras en un microscopio confocal DSU (LSM710, Zeiss). Luego nos quedamos con las fotos de los planos superior e inferior por separado y mediante un análisis de “Máxima Proyección” obtuvimos una sola imagen del plano superior y una del inferior. Con esta metodología escaneamos la muestra desde el explanto hasta el final de los axones.

Obtuvimos las siguientes imágenes:

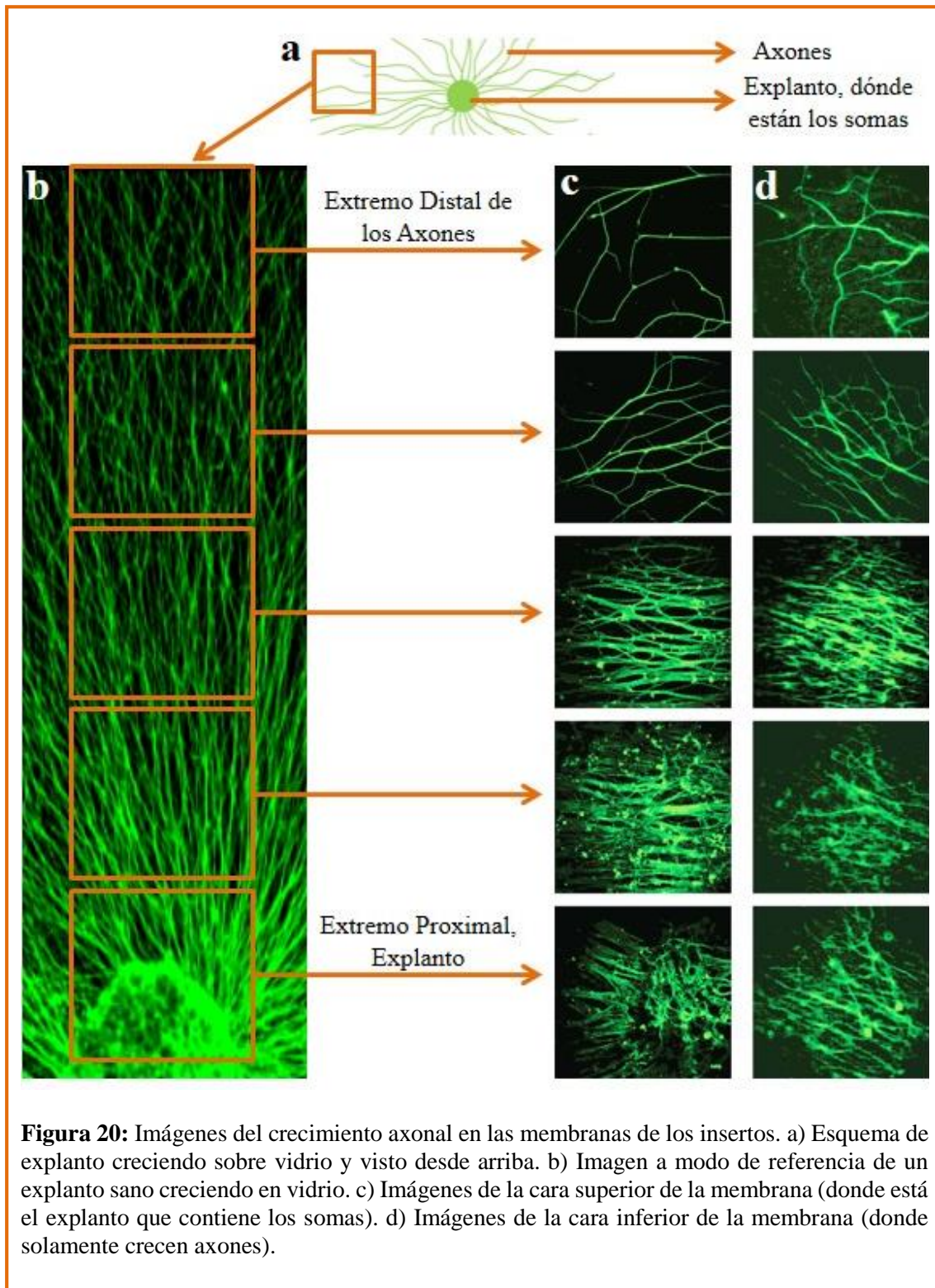
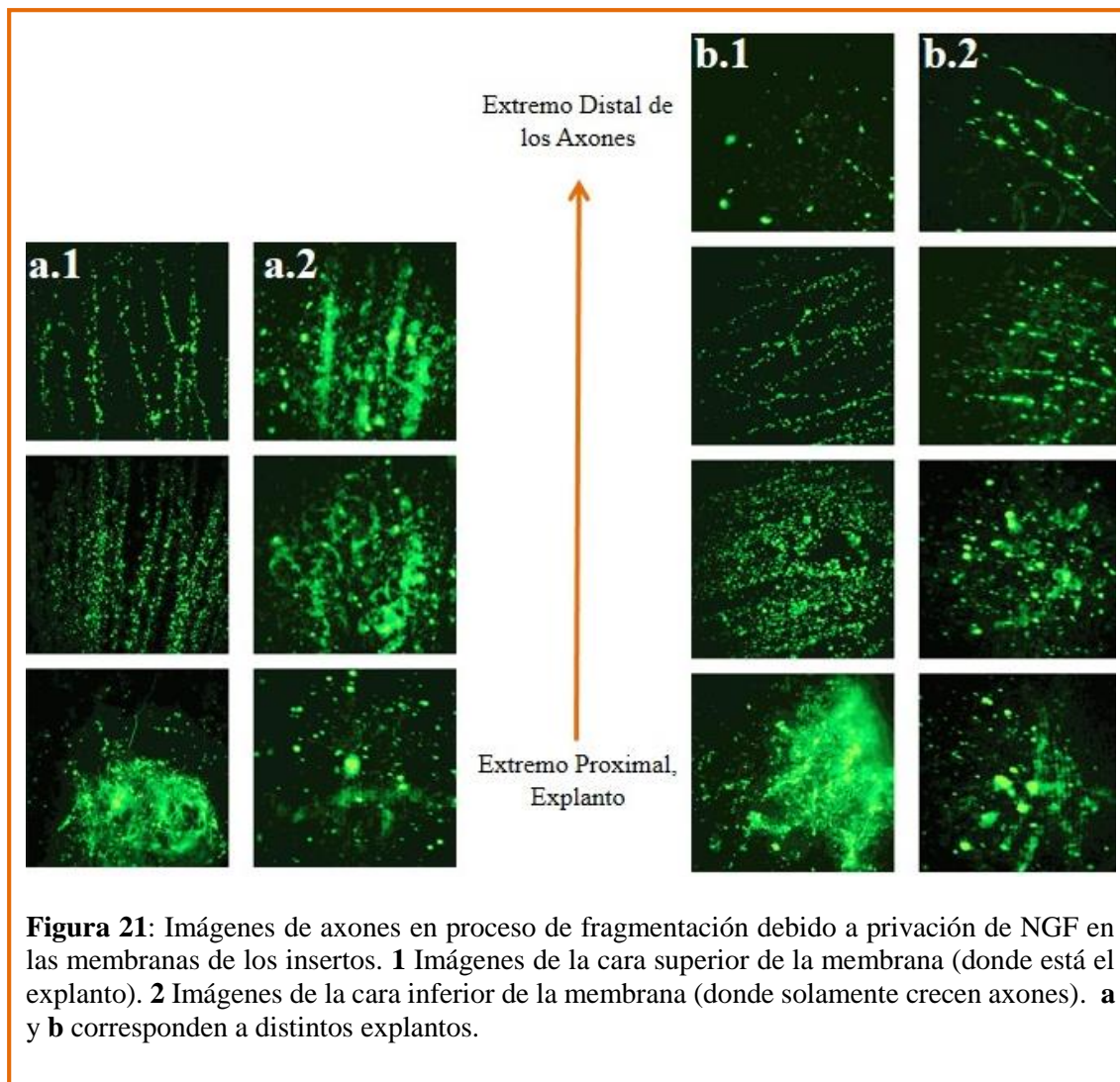


Figura 20: Imágenes del crecimiento axonal en las membranas de los insertos. a) Esquema de explanto creciendo sobre vidrio y visto desde arriba. b) Imagen a modo de referencia de un explanto sano creciendo en vidrio. c) Imágenes de la cara superior de la membrana (donde está el explanto que contiene los somas). d) Imágenes de la cara inferior de la membrana (donde solamente crecen axones).

Es importante remarcar que las imágenes c y d de la Fig. 20 corresponden al mismo sector de la membrana pero a un distinto plano óptico en el eje axial. Como puede observarse, el crecimiento axonal es sano y robusto del lado inferior (d) alcanzando una densidad axonal cualitativamente igual o mayor que el lado superior (c). Este hecho es fundamental para el funcionamiento de nuestro modelo experimental de degeneración local, puesto que es necesario contar con una alta proporción de axones creciendo en el lado opuesto a los somas (explanto).

Más tarde, repetimos el experimento anterior, pero esta vez a partir del tercer día inducimos una degeneración por privación de factor trófico NGF por 24 h. Para ello, cambiamos el medio de cultivo por uno libre de NGF, y añadimos un anticuerpo contra este factor en el compartimento inferior del inserto. Ya que la membrana no fue tratada con Micropartículas, la difusión entre los compartimentos ocurrió libremente y en ambos lados de las membranas se registró una marcada degeneración axonal (Fig. 21).

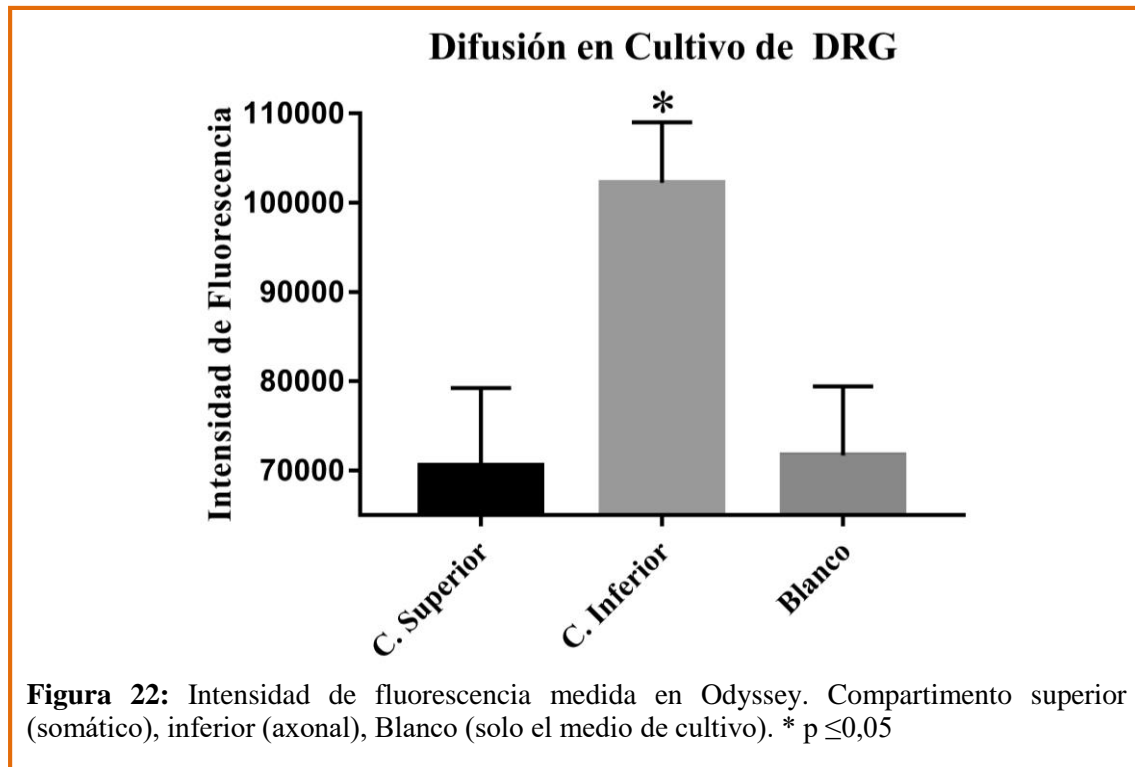


En todos los caso corroboramos que en ambas caras de la membrana los axones se encontraban completamente degenerados, reducidos a detritos inconexos (Fig. 21). Este es el resultado que esperado luego de una privación de NGF por 24 h.

4) Análisis de difusión en cultivo neuronal

Para tener una primera aproximación a la difusión en insertos en cultivo (medio Neurobasal, 37° C en incubadora con humedad y presión parcial de CO₂ constante), seguimos el protocolo para la utilización de MPs descrito en Materiales y Métodos. Luego de que los explantos crecieran por tres días en los insertos adicionados con el sustrato completo, procedimos a bloquear las membranas con MPs por 2 min sin escurrirlas. Seguidamente agregamos el anticuerpo fluorescente y medimos la intensidad de fluorescencia en el compartimento superior e inferior luego de 24 h de incubación.

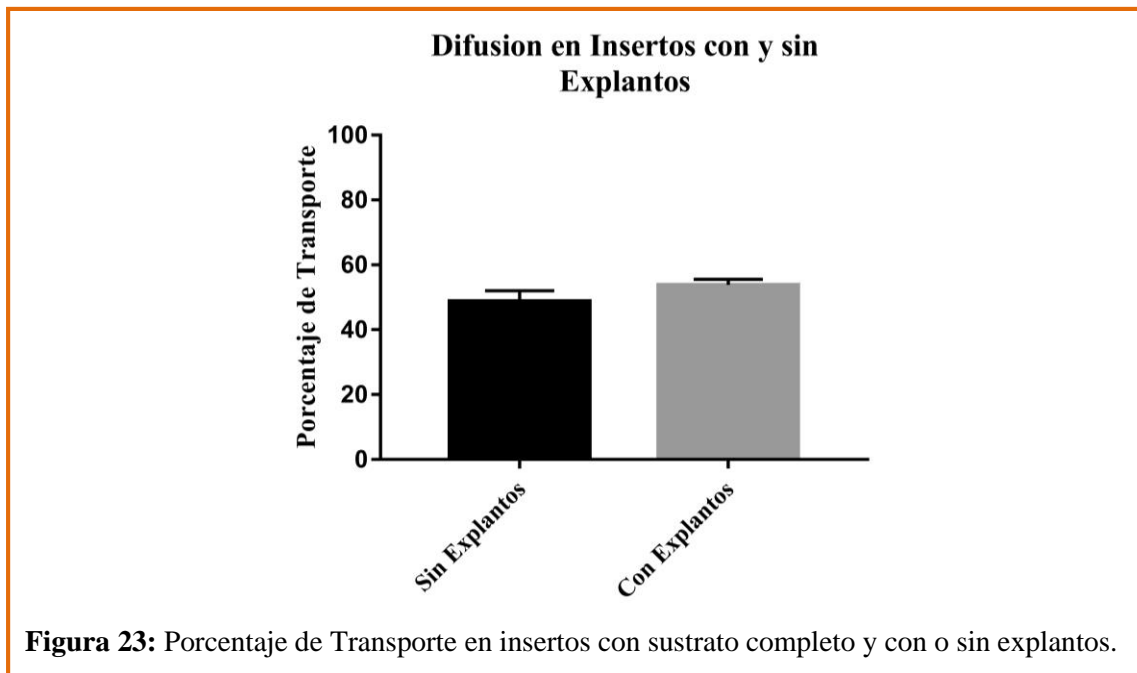
Obtuvimos el siguiente resultado:



La intensidad de fluorescencia en el compartimento superior fue similar a la del blanco, mientras que la intensidad del compartimento inferior fue varias veces mayor (Fig. 22). Esto muestra que el bloqueo de la difusión fue significativo en insertos con explantos en cultivo. A partir de este momento, utilizamos el Porcentaje de Transporte (relación

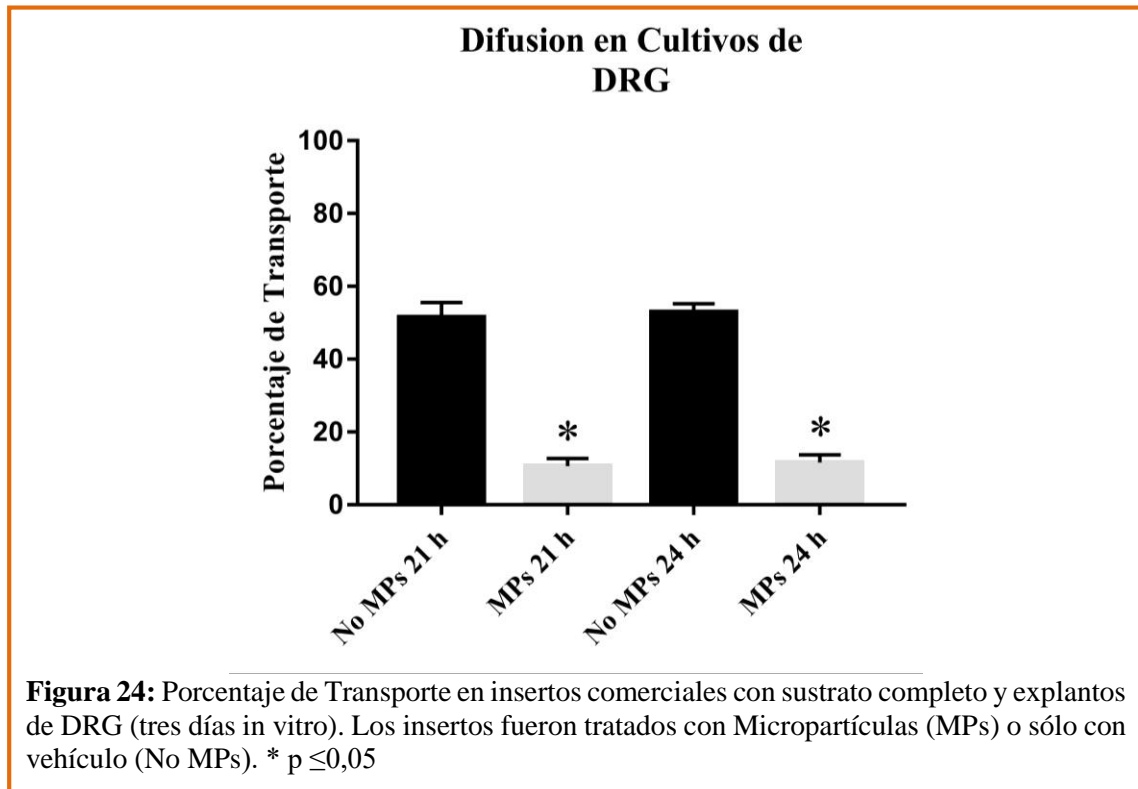
entre la intensidad de fluorescencia en el compartimento superior e inferior) como medida del paso de anticuerpo fluorescente de un compartimento al otro.

En una segunda instancia quisimos probar si los explantos por si mismos afectaban la difusión en insertos comerciales en ausencia de Micropartículas. Para ello, cultivamos por tres días explantos de DRG en insertos adicionados con el sustrato completo. Al tercer día añadimos el anticuerpo fluorescente al compartimento inferior y luego de 24 h medimos la intensidad de fluorescencia.



Como muestra la Fig. 23, no encontramos diferencias significativas en la difusión del anticuerpo en insertos con y sin explantos. Esto nos lleva a pensar que el efecto observado de las Micropartículas se debe a un bloqueo de la difusión causada por el tratamiento y no por la mera presencia de los explantos.

En otra prueba, quisimos evaluar nuevamente la difusión a 21 y 24 h. Para ello empleamos insertos con el sustrato completo y en los que cultivamos explantos de DRG por tres días. Luego del bloqueo con Micropartículas llevado a cabo al tercer día de cultivo, añadimos el anticuerpo fluorescente y medimos la intensidad de fluorescencia a las 21 y 24 h.



El tratamiento con Micropartículas bloqueó significativamente la difusión tanto a las 21 como a las 24 h (Fig. 24). El hecho de que la difusión a 21 y a 24 h haya sido similar sugiere que el máximo de difusión se alcanza temprano y que luego se estabiliza.

5) Demostración de la efectividad del sistema en modelos de degeneración axonal local

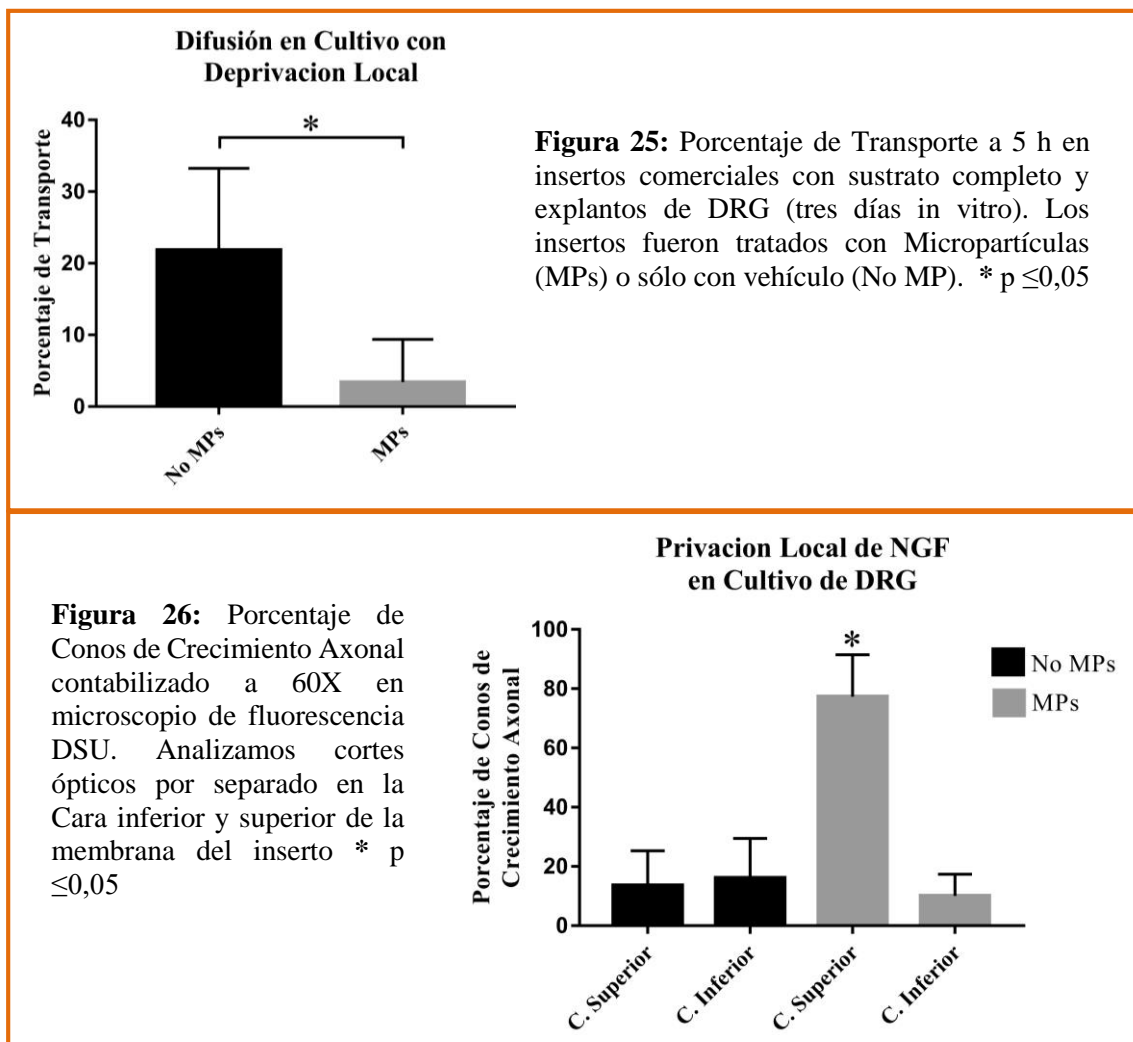
Con el objetivo de demostrar la funcionalidad de este sistema en modelos de degeneración axonal local, tomamos ocho filtros para cultivo con el sustrato completo y en ellos hicimos crecer por tres días explantos de DRG siguiendo los pasos detallados en Materiales y Métodos. Posteriormente, tratamos cuatro de estos filtros con Micropartículas y cuatro con vehículo.

Más tarde, agregamos en todos los casos un anticuerpo anti-NGF (Ac-anti NGF para generar privación local) y un anticuerpo fluorescente (AF647) (para comprobar el correcto bloqueo de la difusión) en el compartimento inferior (axonal). En el compartimento superior (somático) agregamos solamente NGF para mantener el crecimiento normal de los explantos.

Nuestro razonamiento en este experimento fue el siguiente: “si el Ac-anti NGF no difunde del compartimento inferior al superior, sólo los axones del compartimento inferior estarán sometidos a privación de NGF pero los somas y axones en la parte de arriba permanecerán sanos”.

Esperamos que si el bloqueo es efectivo, sólo se observará colapso de conos de crecimiento en el lado inferior. Como control, esperamos que en las membranas sin MPs el colapso de conos de crecimiento sea igual a ambos lados de la membrana.

Luego 5 h de haber agregado los anticuerpos, evaluamos el Porcentaje de Transporte (Fig. 25) y el Porcentaje de Conos de Crecimiento Axonal (Fig. 26). La difusión del AF647 en 5 h fue del 20% en membranas sin MPs, y de menos del 5% en membranas tratadas con las MPs. El análisis del porcentaje de terminales con conos de crecimiento demostró que esas diferencias en la difusión del AF647 son un buen indicador del bloqueo del Ac-anti NGF.



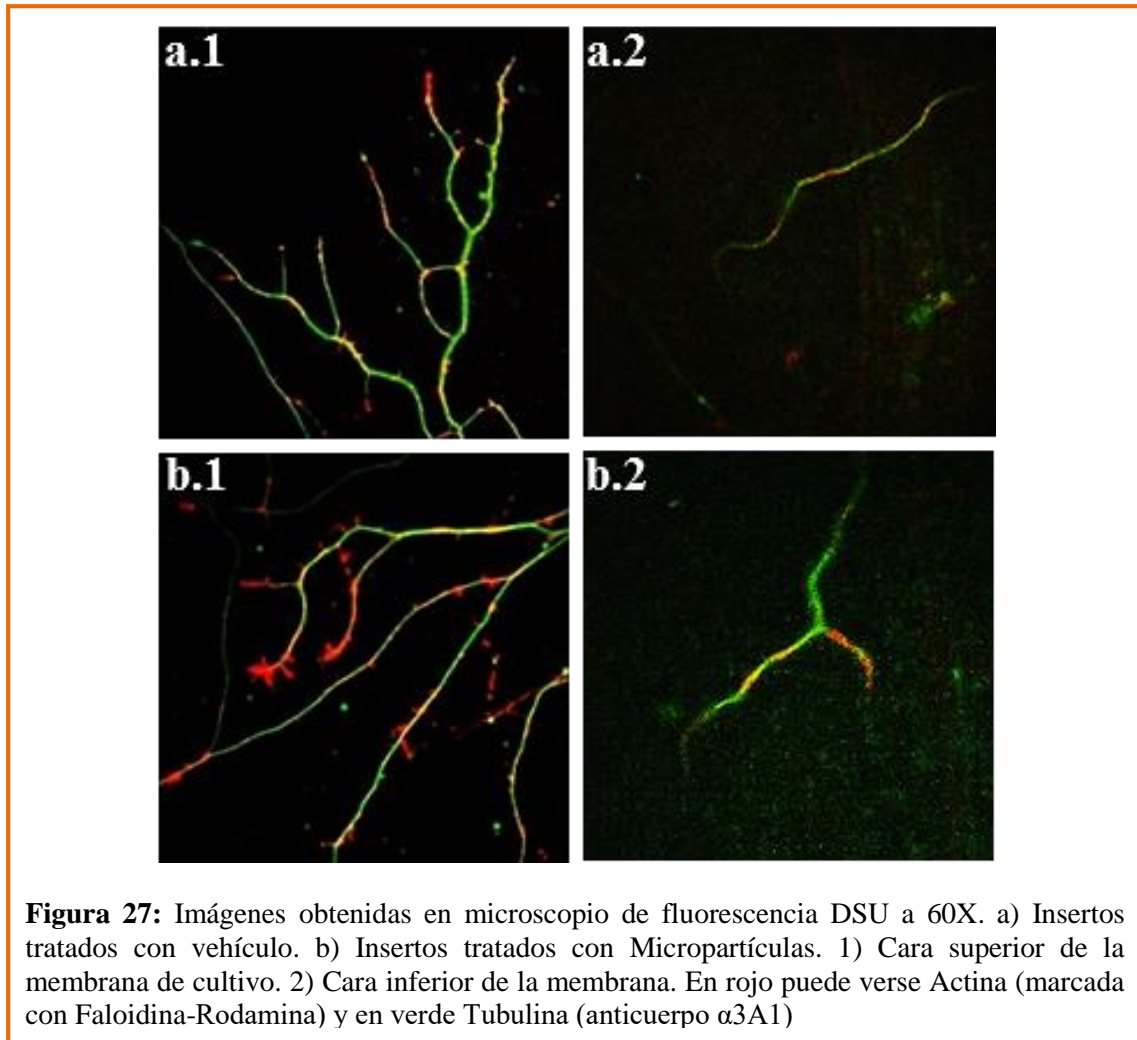


Figura 27: Imágenes obtenidas en microscopio de fluorescencia DSU a 60X. a) Insertos tratados con vehículo. b) Insertos tratados con Micropartículas. 1) Cara superior de la membrana de cultivo. 2) Cara inferior de la membrana. En rojo puede verse Actina (marcada con Faloidina-Rodamina) y en verde Tubulina (anticuerpo $\alpha 3A1$)

Como era de esperar, tanto en los insertos tratados con Micropartículas como en los tratados con vehículo pudimos apreciar un marcado colapso de conos de crecimiento axonal en la cara inferior de la membrana, debido a que este lado estuvo expuesto al anticuerpo anti-NGF y en un entorno de privación del factor trófico. Por otra parte, en la cara superior, sólo notamos colapso de conos en los insertos tratados con vehículo, ya que al no estar bloqueados los poros de la membrana el anticuerpo anti-NGF pudo difundir libremente al compartimento superior y generar un entorno de privación de factor trófico. (Fig. 26 y 27)

Ésta marcada diferencia en la degeneración de las caras superior e inferior de las membranas tratadas con Micropartículas concuerda correctamente con lo esperado para un modelo de degeneración local, por lo que podemos afirmar que el dispositivo de bloqueo es útil para el estudio de dichos modelos.

Conclusión

A partir de los experimentos realizados, pudimos determinar que:

- La mejor combinación para el bloqueo de la difusión se logra utilizando membranas tratada con Polietilenimina- Laminina- Colágeno y Micropartículas derivatizadas con grupos sulfónicos.
- El bloqueo de la difusión de un anticuerpo fluorescente en condiciones de cultivo celular es significativo al menos por 24 h.
- El bloqueo de la difusión de Fluoresceína (una molécula pequeña y muy soluble) también fue significativo.
- El tratamiento de cultivos neuronales con concentraciones de Micropartículas diez veces mayores a las necesarias para el bloqueo no causó degeneración axonal ni modificaciones en los conos de crecimiento. Por lo que concluimos que su toxicidad fue baja o nula.
- La salud de cultivos de la línea celular HEK293 tampoco pareció ser afectada por la aplicación de concentraciones altas de Micropartículas.
- El crecimiento axonal en ambos lados de la membrana fue robusto y saludable. En la cara inferior, la densidad axonal fue mayor o igual a la de la cara superior, lo que es altamente favorable para nuestro diseño experimental.
- El bloqueo de la difusión fue significativo en condiciones de cultivo en insertos con Ganglios de la Raíz Dorsal, a 5, 21 y 24 h.
- El sistema propuesto pudo ser utilizado con éxito para generar una degeneración local por privación de factor trófico.

Discusión

Durante el presente trabajo pudimos desarrollar y caracterizar una nueva herramienta para el cultivo neuronal que se adapta correctamente a las necesidades de nuestro equipo de investigación. Creemos que dicho desarrollo tecnológico podrá ser útil para el estudio de diversos modelos celulares no solo en nuestro laboratorio, sino también en otras instituciones.

Las principales características que diferencian a nuestro dispositivo de otras herramientas similares, son las siguientes:

- Robusto crecimiento celular en ambos compartimentos.
- Posibilidad de lograr un crecimiento axonal robusto y veloz.
- Flexibilidad para cultivar distintos tipos neuronales (no solamente neuronas periféricas).
- Versatilidad para adaptarse a distintos modelos de estudio.
- Bajo costo.
- Facilidad en el ensamblado y manipulación.

Durante nuestra investigación, pudimos demostrar el correcto funcionamiento del dispositivo y descartamos su toxicidad o interferencia con el desarrollo normal de neuronas DRG y células de la línea HEK. De todas formas, entendemos que es necesario realizar más análisis y experimentos para estandarizar completamente su funcionamiento y asegurar su inocuidad.

Por otro lado creemos que una vez estandarizada esta nueva herramienta su uso podrá extenderse no sólo a numerosos tipos neuronales, sino también a otros modelos de estudio celular. Como futuros objetivos de este proyecto, nos proponemos investigar posibles aplicaciones y probar su funcionalidad en distintos diseños experimentales.

Además, nos planteamos como un futuro objetivo para este proyecto analizar la combinación de distintos diámetro de poros y tamaño de Micropartículas en cultivos de otros tipos neuronales, para adaptar nuestro sistema correctamente a otros modelos de estudio

Bibliografía

- [1] STEVEN L. JONES AND TATYANA M. SVITKINA. 2016. Axon initial segment cytoskeleton: architecture, development, and role in neuron polarity. *Neural Plasticity*. Volume 2016-
- [2] CONDE C, CACERES A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009; 10:319–332. [PubMed]
- [3] RASBAND MN. The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010; 11:552–562. [PubMed]
- [4] ROBERT B. CAMPENOT. 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Cell Biology*. Vol. 74, No. 10, pp. 4516-4519.
- [5] ANNE M. TAYLOR, SEOG WOO RHEE, CHRISTINA H. TU, DAVID H. CRIBBS, CARL W. COTMAN, AND NOO LI JEON. 2003. Microfluidic multicompartiment device for neuroscience research. *Langmuir*. 19 (5): 1551–1556
- [6] TAYLOR AM, BLURTON-JONES M, RHEE SW, CRIBBS DH, COTMAN CW, JEON NL. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods*. 2005; 2(8):599-605.
- [7] TAYLOR AM, BERCHTOLD NC, PERREAU VM, TUCH, LI JEON N, COTMAN CW. Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J Neurosci.* 2009; 29(15):4697-707
- [8] KIM Y, KARTHIKEYAN K, CHIRVI S, DAVÉDP. Neuro-optical microfluidic platform to study injury and regeneration of single axons. *LabChip*. 2009; 9(17):2576-81

- [9] UNSAIN N, HEARD KN, HIGGINS JM, BARKER PA. Production and isolation of axons from sensory neurons for biochemical analysis using porous filters .J Vis Exp. 2014 Jul 8 ;(89)
- [10] TORRE ER, STEWARD O. Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. J. Neurosci. 1992; 12:762–772.
- [11] ZHENG JQ, ET AL. A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. J. Neurosci. 2001; 21:9291–9303.
- [12] GRASSELLI MARIANO GRASSELLIB, EDUARDO SMOLKOC, PÉTER HARGITTAIA, ÁGNES SÁFRÁNYA.2001. From microspheres to monoliths: Synthesis of porous supports with tailored properties by radiation polymerization. NIMBs B. Vol.185. pp. 254 - 261.
- [13] LEANDRO J. MARTINEZ, MIRNA L. SANCHEZ, PAMELA KIKOT, ROBERTO CANDAL, MARIANO GRASSELLI. 2014. Preparation of functional currant-bun-like fumed silica/polymethacrylate nanoparticles by radiation-induced polymerization. Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. Vol.463. pp. 110–117.
- [14] S.L. SOTO ESPINOZAA, C.R. ARBEITMANB, M.C. CLOCHARDC, M. GRASSELLI. 2014. Functionalization of nanochannels by radio-induced grafting polymerization on PET track-etched membranes. Radiat. Phys. Chem. Vol. 94. pp. 72–75.
- [15] ACHESON, A., BARKER, P.A., ALDERSON, R.F., MILLER, F.D., AND MURPHY, R.A. 1991. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. Neuron 7, 265–275.

- [16] UNSAIN N, HEARD KN, HIGGINS JM, BARKER PA. Production and isolation of axons from sensory neurons for biochemical analysis using porous filters. *J Vis Exp.* 2014 Jul 8 ;(89).
- [17] CHEN, M., MALONEY, J. A., KALLOP, D.Y., ATWAL, J.K., TAM, S.J., BAER, K., KISSEL, H., KAMINKER, J.S., LEWCOCK, J.W., WEIMER, R.M., ET AL. (2012). Spatially Coordinated Kinase Signaling Regulates Local Axon Degeneration. *J. Neurosci.* 32, 13439–13453.
- [18] NICOLAS UNSAIN, JULIA M. HIGGINS, KRISTEN N. PARKER, AARON D. JOHNSTONE, PHILIP A. BARKER. 2013. Xiap regulates caspase activity in degenerating axons. *Cell Rep.* 4(4):751-63.

Agradecimientos

Y para finalizar esta hermosa y desafiante experiencia que fue la carrera universitaria, no me queda más que agradecer enormemente y de corazón a las personas que fueron piezas claves en este camino:

Primero a mi familia, que desde que tengo memoria me incentivó y acompañó en mi pasión por la biología, y que me apoyó incondicional e incansablemente en cuanto proyecto se me ocurrió emprender (incluso cuando muchas veces esto significó compartir menos tiempo juntos). Realmente sin ellos hoy no estaría escribiendo estas líneas.

A mis amigos, que desde distintos ángulos y en muchas oportunidades me ayudaron a crecer y me sacaron una sonrisa cuando más lo necesitaba. Ellos son protagonistas de mis memorias más locas y de mis recuerdos más vívidos.

A Nico, mi Director, que me brindó un espacio en su equipo y me introdujo al mundo de la ciencia. También a los investigadores y becarios del Instituto Ferreyra, que a la larga se convirtió en mi segundo hogar. Y entre ellos, especialmente a Gaby, mi colega Uruguaya que incontables veces me dio una mano dentro y fuera de nuestros proyectos de investigación.

A todos los docentes de la Escuela de Biología, y a mi Codirector, que me enseñaron muchas cosas y dedicaron tiempo de sus vidas a formarme como biólogo.

Y por último a mi Tribunal de Tesina, que de manera altruista formaron parte de este proceso y me obsequiaron parte de sus horas.