



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

LA LIBERACIÓN DE SEMAFORINA 3C POR UN HIDROGEL BIOCOMPATIBLE
PROMUEVE Y GUÍA EL CRECIMIENTO AXONAL DE NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

OSCAR ALEJANDRO CARBALLO MOLINA

TUTOR PRINCIPAL: DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JULIO MORÁN ANDRADE

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS

FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Institucionales

Esta tesis se desarrolló en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Laboratorio de Reprogramación Celular IFC/UNAM en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Se agradece el apoyo a través de los donativos de Conacyt (131281, 256092 y Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Papiit IN208713/IN213716).

Fundación Alemán

Agradezco al CONACYT y a la DGAPA por haberme brindado becas para el desarrollo de mi proyecto doctoral.

Al Dr. Iván Velasco Velázquez, que durante el transcurso del doctorado ha guiado mi desarrollo académico de manera adecuada.

A los Doctores Julio Morán Andrade y Héctor Mayani Viveros que formaron parte de mi comité tutorial y con sus consejos se enriqueció mi formación científica.

Agradecimientos Personales

El mayor agradecimiento es a mi madre, quien a pesar de las adversidades ha sabido inculcarnos, a mí y a mi hermana, valores esenciales para ser una persona que trabaje para realizar sus sueños. Por su inmenso cariño, sus consejos, enseñanzas, por todo eso y más.

A mi hermana por haberme salvado aquella noche trágica en el Nevado de Toluca, pero sobre todo por su cariño y sus consejos.

A mis primos en Chiapas por todos esos años de infancia que fueron tan felices.

A Andrea Díaz por las alegrías y enseñanzas que me diste en los primeros años del doctorado.

A mis estimados amigos y compañeros de viaje América Córdoba, Andrés Durán, Benjamín, Olga Martínez y Edna Mandujano. Por todas esas alegrías y aventuras vividas, por esos atardeceres juntos que vimos en la Rivera Maya, por esas arepas caseras que además de saber delicioso sabían a amistad sincera. Colombia siempre estará en mi corazón, ese viaje es particularmente inolvidable, gracias por ello.

A Edna Mandujano, gracias por todo eso vívido, siempre lo llevaré en mi mente, tantas alegrías, viajes, aventuras, enseñanzas, tanta salsa y vallenato. Esas cascadas en la huasteca, esas noches locas en Ámsterdam, esa impresión al ver la plaza de Bruselas, caminar alrededor del Sagrado Corazón en París, las noches mágicas de Cartagena y la aventura del Tayrona, nunca se olvidarán.

A mis compañeros de Buceo, por esas aventuras tan extremas, por esas inmersiones marinas, por esa escalada al Nevado de Toluca, por haberme ayudado cuando más lo necesité, porque a pesar del frío y la obscuridad estuvieron ahí. Por esa noche brindado con vodka después de esa escalada al Iztaccíhuatl. Por tantas vivencias, gracias. Sam, Miguel, César, Arturo, Rebeca y Marisol.

A Daniela Silva, mi amiguita que tanto quiero, gracias por todo el cariño.

A Itzel Romero, por esos consejos cuando más eran necesarios, por todo tu cariño.

A mi vecina y amiga Elvia Levario, por esas salidas y comidas divertidas.

A Karla Ardemani por ser amiga y compañera de aventuras, por arriesgarse a hacer viajes lejanos, exóticos y compartir la belleza de tantos paisajes.

A mis compañeros del laboratorio que me han brindado su consejo académico, pero sobre todo por esas risas que sin duda hacen el trabajo en el laboratorio más ameno. Karla, Xóchitl, Andrea, Andy, Itzel, Cristina, Fernanda, Rolando, Vicente, Adolfo, Alejandro, Rodrigo, Emanuel, Daniel, José Luis y César.

Dedicatoria

A mi madre y mi hermana
gracias por su cariño y sus consejos

Índice

| | |
|--|-----|
| Agradecimientos Institucionales | i |
| Agradecimientos Personales | ii |
| Dedicatoria | iii |
| Índice | iv |
| Abreviaturas | 1 |
| Resumen | 3 |
| Abstract | 4 |
| Introducción | 6 |
| Crecimiento Axonal | 7 |
| Direccionamiento Axonal | 10 |
| Moléculas guía | 14 |
| Implicación de moléculas guía en patologías del Sistema Nervioso | 15 |
| Enfermedad de Parkinson | 16 |
| Etiología | 19 |
| Tratamientos | 22 |
| Terapia de reemplazo celular en la Enfermedad de Parkinson | 23 |
| Modelo animal de la EP inducido por la neurotoxina 6-OHDA | 23 |
| Trasplante de NDA en modelos de animales y pacientes | 24 |
| Moléculas guía en el crecimiento axonal de NDA en la vía nigro-estriatal | 27 |
| Efrinas | 29 |
| Netrinas | 30 |
| Slits | 30 |
| Semaforinas | 31 |
| Células troncales | 33 |
| Células troncales embrionarias de roedor | 36 |
| Células troncales embrionarias humanas | 38 |
| Diferenciación a NDA | 39 |
| Hidrogeles | 43 |
| Hidrogeles como sustrato del crecimiento axonal | 44 |
| Hidrogeles como sistemas acarreadores y liberadores | 47 |
| Inclusión y liberación de moléculas que afectan el crecimiento axonal | 48 |
| Justificación | 50 |
| Hipótesis | 52 |
| Objetivo General | 52 |
| Objetivos Particulares | 52 |
| Materiales y Métodos | 53 |
| Conjugación de la SEMA3C en el hidrogel y su liberación | 53 |
| Animales | 53 |
| Extracción de Colágena | 54 |
| Ensayos de atracción axonal utilizando explantes en geles de colágena | 54 |
| Diferenciación dopaminérgica en las hESC | 55 |
| Cámaras de crecimiento axonal | 56 |
| Tinción con calceína, inmunofluorescencia y microscopía | 57 |
| Análisis estadístico | 59 |
| Resultados | 60 |
| Liberación de la SEMA3C por el hidrogel | 60 |

| | |
|---|----|
| La SEMA3C liberada por el hidrogel atrae el crecimiento axonal de NDA----- | 60 |
| La SEMA3C liberada por el hidrogel promueve el crecimiento axonal en NDA de roedor-- | 63 |
| Las NDA diferenciadas de las hESC expresan los receptores NRP1 y NRP2----- | 68 |
| La SEMA3C liberada por el hidrogel indujo un crecimiento axonal dopaminérgico en neuronas diferenciadas a partir de hESC----- | 69 |
| Discusión----- | 72 |
| Conclusiones----- | 79 |
| Perspectivas----- | 79 |
| Bibliografía----- | 82 |
| Apéndice----- | 94 |

Abreviaturas

| | |
|---------|--|
| 6-OHDA | 6-hidroxidopamina |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATV | Área tegmental ventral |
| BDNF | <i>Brain derived neurotrophic factor</i> o Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| D | Área Distal |
| DA | Dopamina |
| DAT | Transportador de dopamina |
| E | Día embrionario |
| EpiSC | <i>Epiplast stem cells</i> o Células troncales del epiblasto |
| ESC | <i>Embryonic stem cells</i> o Células troncales embrionarias |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> o Factor de crecimiento de fibroblastos |
| FM | Fascículo medial |
| GAPs | Proteínas activadoras de GTPasas |
| GDNF | <i>Glial cell line derived neurotrophic factor</i> o Factor neurotrófico derivado de la glia |
| GEF | Factor intercambiador de nucleótido de guanina |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| hESC | <i>Human Embryonic stem cells</i> o Células troncales embrionarias humanas |
| HEK | <i>Human embryonic kidney</i> o Células embrionarias de riñón humano |
| Hid | Hidrogel |
| ICM | <i>Inner cell mass</i> o Masa celular interna |
| Ist | Istmo |
| LIF | <i>Leukemia inhibitory factor</i> o Factor inhibidor de la leucemia |
| MEF | <i>Mouse embryonic fibroblast</i> o Fibroblastos embrionarios de roedor |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| Mv | Mesencéfalo ventral |
| NDA | Neuronas dopaminérgicas |
| NGF | <i>Nerve growth factor</i> o Factor de crecimiento nervioso |
| NRP | Neuropilina |
| P | Área Proximal |
| PC | Proteína Control |
| PEG | Polietilenglicol |
| PGC | <i>Primordial germ cells</i> o Células primordiales germinales |
| PT | Pretectum |
| RADA 16 | Secuencia Arginina-Alanina-Ácido aspártico-Alanina repetida 16 veces |
| SEMA | Semaforina |
| SHH | Sonic hedgehog |
| SN | Sustancia Nigra |

SNC
TH

Sistema nervioso central
Tirosina Hidroxilasa

Resumen

La terapia celular para la enfermedad de Parkinson consiste en reemplazar las neuronas dopaminérgicas (NDA), que se pierden en esta patología. Las NDA se han trasplantado en diferentes sitios del cerebro en modelos animales de la enfermedad y se ha demostrado una mejora conductual. Sin embargo, en pacientes parkinsonianos el trasplante en caudado/putámen no ha proporcionado resultados consistentes por lo que se requiere investigar alternativas experimentales. Una opción es modificar el sitio del trasplante y promover el crecimiento axonal de las NDA trasplantadas. Por otra parte, la proteína Semaforina (SEMA) 3C participa en la navegación axonal de las NDA durante el desarrollo embrionario. Diversos estudios han demostrado que esta proteína es capaz de atraer y promover el crecimiento de los axones dopaminérgicos. Estudios de nuestro grupo señalan que la liberación de SEMA3C en el cerebro de rata por células transfectadas promueve y dirige el crecimiento axonal de las NDA. En el presente trabajo, se utilizó un hidrogel biocompatible como agente liberador de la SEMA3C. Los hidrogeles son polímeros que contienen una gran cantidad de agua, lo que permite la incorporación de moléculas solubles en su estructura, para ser liberadas paulatinamente. Al ser implantados en el cerebro los hidrogeles no generan rechazo y permiten el crecimiento axonal. En este trabajo usamos el hidrogel PuraMatrix, compuesto por péptidos que se auto-ensamblan. Describimos que este hidrogel es capaz de incorporar a la SEMA3C y liberarla de forma constante durante 4 semanas. Se evaluó, mediante explantes de mesencéfalo ventral de rata embebidos en una matriz de colágena, que la SEMA3C liberada por el hidrogel promueve la atracción de los axones dopaminérgicos de manera similar a la ocasionada por un explante de pretectum (PT), región embrionaria conocida por su papel en la atracción axonal dopaminérgica. La SEMA3C liberada por el hidrogel incrementa la longitud axonal de las NDA embrionarias de rata o diferenciadas a partir de *“Embryonic stem cells”* ESC o células troncales embrionarias humanas (hESC) mostraron un incremento significativo en su longitud

axonal medido con dispositivos de microfluidos; este aumento fue similar al obtenido cuando se expusieron las NDA a SEMA3C soluble. Previamente se había demostrado en NDA de roedor, que la SEMA3C actúa a través de los receptores Neuropilina 1 y 2. En el presente trabajo se describió por primera vez que las NDA diferenciadas de hESC expresan ambos receptores. Estos resultados indican que el PuraMatrix es capaz de incorporar y liberar SEMA3C, lo que guía y promueve el crecimiento axonal de las NDA. Este hidrogel biocompatible se puede usar como material para liberar proteínas quimio-atrayentes en modelos animales de la enfermedad de Párkinson.

Abstract

Cell therapy in Parkinson's disease is based on replacement of the dopamine neurons (DAN), which are lost in this pathology. DAN have been grafted in different brain regions in animal models of Parkinson's disease. The graft has induced behavioral recovery in these animals. However, the grafting in caudate/putámen in patients with Parkinson has generated unsatisfactory results. For this reason, it is necessary to investigate new treatments. Modifying the transplant site and the promotion of axonal growth of the cells grafted could be an option. On the other hand, the Sempahorin 3C is a protein which plays a critical role in the axonal guidance during embryonic development. Several studies have shown that this protein attract and promote the axonal growth of DAN. Our group has previously demonstrated that the release of SEMA3C in the brain of an animal model of Parkinson's Disease by transfected cells is able to promote and guide the axonal growth of DAN. In this work, we used a biocompatible hydrogel as the vector to release the SEMA3C. The hydrogels are polymers which contain a large amount of water, it allows the incorporation of soluble molecules in the polymer structure, to be released. The grafting of the hydrogels into the brain does not exert a rejection reaction and permits the axonal growth. We used the PuraMatrix hydrogel,

which is constituted by self-assembling peptides. We found that this hydrogel is able to incorporate the SEMA3C and to release it in a constant way during four weeks. Using explants of ventral mesencephalon of rat included into a collagen matrix, we evaluated if the SEMA3C released by the hydrogel attracts the dopaminergic axons. The SEMA3C released was able to promote the attraction of dopaminergic axons in a similar way to the explant of PT, this embryonic region is known by its ability to promote the attraction of these axons. In order to evaluate if the SEMA3C released by hydrogel influences the length of dopaminergic axons, we used microfluidic devices that allow the quantification of the axonal growth in response to a soluble molecule. The rodent and differentiated from hESC DAN showed an increasing in the axonal length when they were exposed to a hydrogel coupled to SEMA3C, this effect was similar to the observed when the neurons were exposed to soluble SEMA3C. Previously, it was demonstrated that in DAN of rodents, the SEMA3C exerts its effect through the receptors Neuropilin 1 and 2. In the present work, we describe for the first time that the human embryonic stem cells derivated NDA express both receptors. These results show that the PuraMatrix hydrogel is able to incorporate and release the SEMA3C, this deliver allows to guide and promote the axonal growth of DAN. This biocompatible hydrogel could be used as releasing vector of chemo attractant molecules into animal models of Parkinson's Disease.

Introducción

Las neuronas y sus conexiones nos permiten interactuar con el medio exterior. Gracias a ellas percibimos estímulos externos como la temperatura, o internos como el hambre; esta información se procesa y posteriormente se emite una respuesta. A través de una gran coordinación, las neuronas son capaces de transmitir información química y/o eléctrica con gran velocidad y precisión. Esta información se transmite a través de los axones, que se extienden desde el soma de la neurona hacia otras células, ya sea pertenecientes al sistema nervioso, o no. En ocasiones las células inervadas por los axones se encuentran muy distantes, por lo que estos tienden a extenderse largas distancias y tener estructuras muy complejas. Durante el desarrollo embrionario, las neuronas proyectan sus axones hacia las regiones que quedarán inervadas en la etapa adulta. Para que esto ocurra, debe haber una señalización adecuada en tiempo y espacio. Esta señalización se da por medio de gradientes de diversos factores que influyen en el desarrollo de diferentes poblaciones neuronales. Sin embargo, en el cerebro adulto muchas de estas señales disminuyen o desaparecen, por lo que las neuronas ya no son capaces de proyectar sus axones hacia sus sitios blancos. Esto es de particular interés en situaciones en las que el cerebro adulto sufre alguna lesión o patología en donde se requiere la regeneración axonal para restablecer las funciones perdidas. En la enfermedad de Parkinson (EP) las NDA de la Sustancia Nigra (SN) degeneran y la inervación hacia el estriado se ve afectada, lo que conlleva a la disminución de la dopamina (DA) en el estriado. La pérdida de este neurotransmisor produce los síntomas característicos de la EP, como bradicinesia, temblor en reposo y rigidez. Actualmente los medicamentos que se utilizan mejoran la calidad de vida del paciente de manera limitada y conllevan diversos efectos secundarios, los cuales se describirán posteriormente. Es por ello la necesidad de investigar nuevos tratamientos que disminuyan o eliminen estos efectos secundarios. Se han estudiado distintas alternativas para restituir la liberación de DA en el estriado. El uso de la terapia de reemplazo celular pretende injertar

neuronas para que reemplacen a las que han degenerado a causa de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de que se ha logrado la liberación de DA en el sitio donde se requiere, el traslado de esta estrategia a pacientes no ha sido exitosa. Una alternativa es trasplantar a las NDA en su sitio fisiológico (SN) y no en el estriado, sin embargo, debido al ambiente poco permisivo del cerebro adulto para el crecimiento axonal, sería necesario guiar y promover el crecimiento axonal dopaminérgico de las neuronas trasplantadas desde la SN hacia el estriado. En el trabajo realizado durante mi proyecto doctoral hemos estudiado la posibilidad de guiar el crecimiento axonal de NDA mediante la liberación de una proteína implicada en el crecimiento y guía axonal de neuronas dopaminérgicas en el desarrollo. Para ello utilizamos un hidrogel que ha demostrado ser compatible con el crecimiento axonal, además de no generar citotoxicidad. Este polímero es capaz de embeber y liberar a la SEMA3C. Demostramos *in vitro* que esta estrategia es capaz de aumentar y dirigir el crecimiento de axones dopaminérgicos, tanto en NDA de roedor en cultivo, como en NDA diferenciadas de hESC.

Crecimiento axonal

El cono de crecimiento es la estructura encargada de la elongación axonal; es través de ésta que el axón percibe las señales que promueven, inhiben o dirigen el crecimiento¹. El cono de crecimiento axonal está formado por tres regiones en base a la distribución de su citoesqueleto. Una de ellas son los filopodios que se encuentran ubicados en la zona periférica y están formados por haces de actina dispuestos de manera paralela. Por otro lado, los lamelipodios son estructuras que conectan a los filopodios y están formados por haces de actina en disposición de red^{1,2} (Figura 1). La parte central está formada por microtúbulos^{1,2} que conectan el cono de crecimiento con el eje del axón. Por otra parte, la zona de transición conecta a la región periférica con la central y está formada por

filamentos de actina en forma de arco perpendiculares a los filamentos que forman los filopodios ² (Figura 1).

El crecimiento axonal se ha dividido en tres fases de acuerdo a los procesos moleculares que se llevan a cabo. Primeramente se da la unión del cono de crecimiento con un sustrato permisivo que desencadena cascadas de señalización que dan como resultado la asociación entre el sustrato y el citoesqueleto de actina ². Durante la primera etapa designada “*protrusion*”, el movimiento retrógrado de los monómeros de actina disminuye mientras que la polimerización de actina en la parte anterior aumenta y permite el anclaje al sustrato ³. La etapa de “*engorgement*” o congestión se caracteriza por la reorientación de los filamentos de actina hacia la zona de crecimiento en la parte periférica. Posteriormente los filamentos de actina en la zona de transición, así como los haces de actina en la región central ayudan al movimiento de los microtúbulos de la región central hacia la zona de crecimiento ². Finalmente la etapa de “*consolidation*” ocurre cuando la parte proximal del cono de crecimiento se compacta para formar un nuevo segmento del axón ².

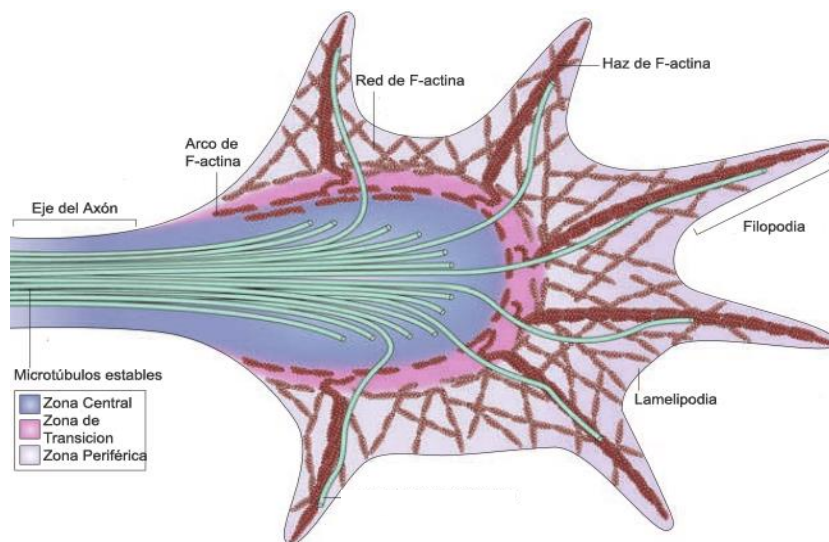


Figura 1. Estructura del cono de crecimiento. Se muestran las tres regiones que conforman al cono de crecimiento y la disposición de los filamentos de actina, así como la de los microtúbulos. Modificado de Lowery y Vactor, 2009 ².

Los microtúbulos proveen el sustrato para que ocurra un rápido transporte axonal hacia el cono de crecimiento ⁴, ya que se requiere la movilización de monómeros de actina hacia el cono de

crecimiento durante la elongación axonal ⁵. Los monómeros de actina forman filamentos que son estructuras polarizadas y su formación, estabilidad y degradación están íntimamente relacionadas con el crecimiento axonal ². Los filamentos de actina, pueden incorporar a los monómeros en la parte distal, es decir en la zona de crecimiento, esto ocurre cuando los monómeros están asociados a la molécula energética adenosina trifosfato ². Por otra parte, cuando los monómeros de actina están asociados al adenosín difosfato se da una señal de degradación en la zona del filamento adyacente a la zona de transición (en dirección opuesta a la zona de crecimiento) ². Durante el crecimiento axonal los microtúbulos también son reclutados a la zona de crecimiento por proteínas como la dineína ¹. Los microtúbulos son estructuras polarizadas compuestos por dímeros de α y β tubulina. Estos dímeros asociados al GTP para su ensamblaje en la parte distal en dirección a la zona de crecimiento, mientras aquéllos asociados a GDP se desensamblan en la dirección opuesta ², es por ello que se consideran microtúbulos dinámicos (Figura 1).

Se ha demostrado en neuronas hipocampales de ratón y rata la presencia de un proceso alternativo de transporte de actina hacia el cono de crecimiento o los filopodios denominado transporte en ondas ⁵. Este fenómeno es similar al cono de crecimiento en su estructura y dinamismo; se presenta en neuritas indiferenciadas pero se ha observado que ocurre un incremento de este fenómeno en aquellas que formarán axones, por lo que está implicado en la polarización neuronal ⁵.

Las señales entre la membrana plasmática del cono de crecimiento con el citoesqueleto son transmitidas por diferentes familias de receptores, incluyendo integrinas, cateninas y cadherinas. Estos receptores reclutan proteínas de anclaje, las cuales se unen al citoesqueleto y además inician cascadas de cinasas que amplifican la señal. Las proteínas rho-GTPasas participan en la señalización posterior a la activación de estos receptores ¹. Las GTPasas son reguladoras de la movilidad de los filamentos de actina y se ha observado que participan en la guía del crecimiento axonal ¹. Están

implicadas en la motilidad del cono de crecimiento debido a sus efectos en contractilidad de miosina y en la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina ¹. Corriente abajo en la cascada de señalización de las proteínas GTPasas se encuentran numerosas proteínas de unión a actina que modulan el crecimiento axonal, tal es el caso de las proteínas gelsolin, la familia de las ADF/cofilina y β -thymosina ¹.

Por otra parte, se ha intentado dilucidar qué señales son las que se necesitan para que un axón crezca. Esta pregunta ha sido difícil de responder debido a que generalmente las mismas señales que inducen supervivencia promueven el crecimiento axonal. La sobre expresión del gen anti – apoptótico *bcl2* en neuronas del ganglio de la raíz dorsal ha permitido responder si las neuronas extienden sus axones de manera espontánea o hay alguna señalización implicada. La sobre expresión de este gen permitió cultivar a las neuronas en un medio carente de cualquier neurotrofina, a pesar de que los somas neuronales sobrevivían, éstos no proyectaban axones. Sin embargo, cuando se le añadieron factores tróficos o se exponían a moléculas solubles secretadas por células de la retina, nervio óptico o del colículo superior, ocurría un crecimiento axonal ⁶. Aunado a esto se demostró que la estimulación eléctrica potencia el crecimiento axonal. Estos datos sugieren que se requiere de la señalización externa para promover que los axones crezcan.

Direccionamiento axonal

El crecimiento axonal no solo implica una constante elongación, es un proceso dinámico en el que el crecimiento axonal se pausa, se retrae o cambia de dirección. Diversos eventos que ocurren durante el crecimiento axonal se dan en el proceso de direccionamiento. Sin embargo, para que el cono de crecimiento pueda responder a las señales en el microambiente y cambiar la dirección, otros sucesos adicionales se llevan a cabo.

El crecimiento axonal implica la síntesis de distintos elementos estructurales, como proteínas y lípidos. Este proceso también es necesario para que el axón pueda re-direccionar su crecimiento en respuesta a señales guía ¹. La síntesis proteica puede darse tanto en el soma, como en el axón, pero se ha observado que esta última es la requerida para que el axón pueda responder a las diferentes señales microambientales ¹. A neuronas de la retina se les removió el soma y únicamente se evaluó el cono de crecimiento. Se observó que añadiendo moléculas guía como netrina-1 o SEMA3A esta estructura aún es capaz de responder mediante movimientos de atracción o repulsión respectivamente ⁷. Al administrar bloqueadores de la síntesis de proteínas estos efectos se abatían, demostrando que el direccionamiento axonal se lleva a cabo localmente en el cono de crecimiento y que es dependiente de la síntesis proteica.

Para que el cono de crecimiento pueda desplazarse necesita de un camino; este camino es un sustrato permisivo conformado por moléculas adhesivas presentes en la superficie de células adyacentes "*cell adhesion molecules*" o ancladas a la matriz extracelular como las proteínas laminina o fibronectina ². Este camino se encuentra delimitado por moléculas que inhiben la adhesión del cono de crecimiento, tal es el caso de slits ⁸, efrinas o proteoglicanos de codroitin sulfato ⁹. Por otra parte, las moléculas quimiotrópicas son las señales que promueven el direccionamiento axonal en una determinada dirección ² (Figura 2). Para que el cono de crecimiento pueda integrar y responder a las diferentes señales en el microambiente necesita de un centro de navegación que pueda enlazar estas señales con la maquinaria responsable de la dinámica del citoesqueleto. La familia de las GTPasas Rho participan de manera crucial en la transmisión de la información de diferentes moléculas guía ^{1,2,10}, en particular las GTPasas RhoA, RAC1 y CDC42 ¹¹. Las GTPasas Rho son activadas por el factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) e inhibidas por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) ¹¹. Algunos GEF y GAPs son capaces de regular a varias GTPasas Rho, así como una GTPasa Rho puede ser regulada por varios GEF y GAPs ². En un estudio de proteómica

global realizado en células de neuroblastoma se separó y comparó el proteoma de neuritas y somas. Se demostró que diferentes GEFs y GAPs se encuentran en el soma y en las neuritas. Utilizando ácido ribonucleico (ARN) interferente se observó que diferentes GEFs y GAPs regulan distintos procesos como el crecimiento neurítico, organización del citoesqueleto o la polaridad celular ¹². Estos datos sugieren que diferentes GEFs y GAPs están localizados de manera diferencial en la neurona y aunque puedan regular a las mismas GTPasas Rho controlan diferentes procesos dependiendo de su ubicación. Una vez activadas las GTPasas Rho, son capaces de ejercer diferentes funciones en el direccionamiento axonal dependiendo a que efectores activen ². Es por ello que el sistema de transducción de señales para la guía del crecimiento axonal por las GTPasas Rho es muy versátil. Utilizando un mismo sistema se pueden regular diferentes procesos dependiendo de la localización de los reguladores y efectores de éstas.

Cuando en el microambiente se presentan señales repulsivas o atractivas, el cono de crecimiento es capaz de percibir dichas señales y desencadenar una serie de vías de señalización que convergen en rearrreglos del citoesqueleto que llevan al cambio de dirección en el crecimiento axonal (Figura 2). Los filopodios son estructuras que participan en la navegación axonal ^{10,13} (Figura 2). Los monómeros de actina en los filopodios ejercen una tensión hacia la parte anterior del cono de crecimiento promoviendo su elongación ¹ (Figura 2). De manera simultánea se da un proceso de degradación de los filamentos de actina. El balance entre polimerización y degradación regula el crecimiento axonal en una determinada dirección en respuesta a señales guía (Figura 2) ¹. El comportamiento de los diferentes filopodios en un cono de crecimiento es bastante dinámico y variable. Utilizando una línea celular de neuroblastoma se demostró que los cambios de dirección en los filopodios coincidían con cambios en la tasa de polimerización del citoesqueleto de actina, mientras que la tasa de flujo retrógrado mediante la cual ocurre la despolimerización permanecía constante ¹³. La evidencia experimental sugiere que tanto la polimerización como la

despolimerización intervienen en el direccionamiento axonal, aunque posiblemente el fenómeno que predomine sea el de la polimerización.

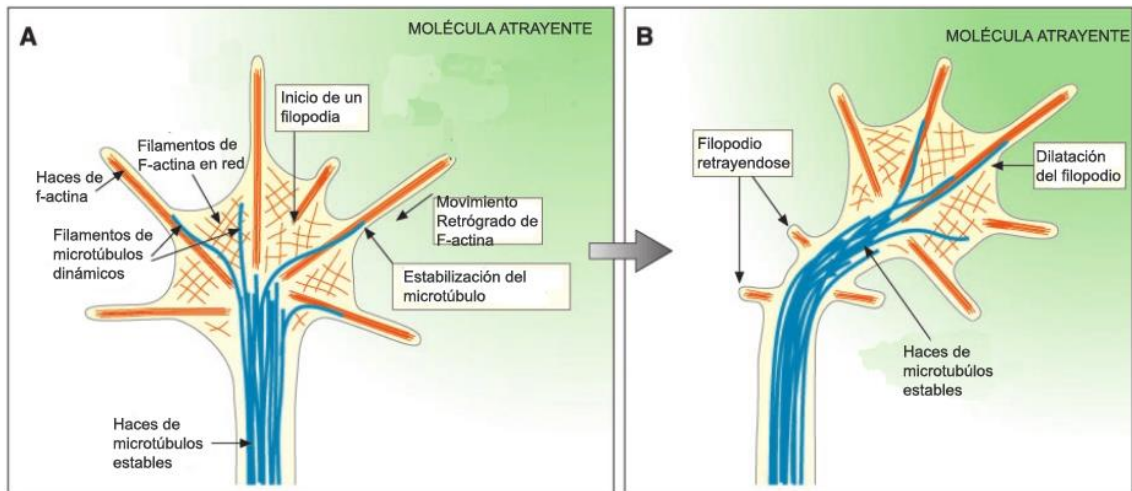


Figura 2. Cono de crecimiento en respuesta a una molécula atrayente. Se muestran los cambios que ocurren en el citoesqueleto cuando una molécula atrayente se encuentra en el sustrato. En presencia de una molécula atrayente los filamentos de actina (f-actina) sufren un rearrreglo estructural. Modificado de Dickson, 2002 ¹⁰.

Por otra parte, el direccionamiento axonal conlleva una reorganización de los microtúbulos. Normalmente estos componentes del citoesqueleto forman haces estables que son paralelos al eje del axón ¹⁰ (Figura 2). Algunos filamentos individuales de microtúbulos emergen del eje axonal en dirección al cono de crecimiento ¹⁰ y juegan un papel en el direccionamiento axonal ¹⁴ (Figura 2). Mediante microscopía de fluorescencia, se observó en conos de crecimiento de explantes del tubo neural de *Xenopus* que el direccionamiento axonal puede conllevar diferentes grados de reorganización de los microtúbulos ¹⁴. En algunos casos solo se necesita el movimiento del cono de crecimiento sin ninguna reorganización en los microtúbulos. Sin embargo, en otros casos los microtúbulos mostraron distintos cambios, se doblaron ligeramente o drásticamente y hubo síntesis de microtúbulos. De manera similar, en otro estudio se observó mediante tinciones de α -tubulina un rearrreglo de los microtúbulos cuando ocurría un cambio de direccionamiento axonal en conos de crecimiento del ganglio de la raíz dorsal en pollo. Dicho cambio se indujo mediante la exposición

a sustratos permisivos o repelentes y se observó que cuando no hay un cambio de dirección, la distribución de los microtúbulos es simétrica, en contraste a cuando ocurre un cambio en la dirección del crecimiento los microtúbulos se disponen de manera asimétrica ⁴.

Estos datos sugieren que para que ocurra un cambio de direccionamiento axonal se tiene que modificar el citoesqueleto a diferentes niveles, además de una interacción entre la reorganización de los filamentos de actina y los microtúbulos. Inicialmente estos cambios ocurren en el cono de crecimiento, que posteriormente conllevan a un rearrreglo en los haces de microtúbulos estables en el eje del axón (Figura 2).

Moléculas guía

Como se mencionó previamente el cono de crecimiento es capaz de percibir distintas señales que repercutirán en la dirección hacia la cual se dará la elongación axonal (Figura 2). Las moléculas guía juegan un papel fundamental para la señalización axonal. Inicialmente se describieron una serie de moléculas guía con sus respectivos receptores. Las proteínas Netrinas con sus receptores DCC, Slits que señalizan a través de los receptores Robo, semaforinas que actúan a través del complejo proteico Plexina – (Neuropilina) NRP, Efrinas mediante los receptores Eph y los morfógenos Wnt que señalizan a través de Frizzleds/Fz y Drl/Ryk ^{2,10,15,16}. Dichas moléculas promovían la atracción, repulsión o colapso axonal de diferentes poblaciones neuronales. Algunas moléculas guía pueden estar ancladas a la membrana y actuar a corta distancia, mientras que otras son secretadas y pueden ejercer su acción a largas distancias ¹⁵. Aunque en un principio a las moléculas guía se les atribuyó una función en particular (atracción, repulsión o colapso), estudios posteriores demostraron que la respuesta del axón no depende de la señal sino del contexto en el cual se da la señalización, es decir, la misma molécula puede ejercer atracción o repulsión axonal dependiendo de cuando se da la señal, en que parte de la neurona se percibe y el tipo celular ^{2,10}. Por ejemplo, SEMA3A inicialmente

fue nombrada como colapsina porque inducía el colapso del cono de crecimiento de neuronas sensoriales en explantes del ganglio de la raíz dorsal de pollo ¹⁷; sin embargo, posteriormente se describió que esta misma proteína era capaz de inducir el crecimiento axonal de NDA obtenidas de cultivo primario o diferenciadas de ESC de ratón ¹⁸. Diferentes moléculas guías pueden actuar sobre un mismo cono de crecimiento y éstas pueden promover efectos contrarios en cuanto al direccionamiento axonal. En ensayos de direccionamiento se demostró que conos de crecimiento de neuronas de la retina respondían a SEMA3A y Netrina-1, con un efecto repulsivo o de atracción respectivamente ⁷. La Netrina-1 indujo su efecto a través de la síntesis y degradación proteica por la vía de las PI-3 cinasa y la vía dependiente de MTOR. Por otra parte, la SEMA3A generó repulsión únicamente por la síntesis proteica, de una forma dependiente de MTOR e independiente de PI-3 cinasa. Por otra parte, una misma molécula guía puede actuar en diferentes regiones del sistema nervioso y estar implicada en procesos muy diferentes. Por ejemplo, los morfógenos Wnt participan en la regionalización anterior-posterior del crecimiento axonal durante el desarrollo, tanto en moscas de la fruta como en vertebrados ¹⁶. Sin embargo, también se ha observado la expresión de estas moléculas en lesiones de la medula espinal, y se ha determinado que intervienen en la regeneración axonal ¹⁹.

Implicación de moléculas guía en patologías del Sistema Nervioso

Diversas patologías neurológicas están caracterizadas por cambios estructurales en las conexiones axonales. Estudios recientes sugieren que algunas moléculas guía están implicadas, ya sea como causantes o como consecuencia de la enfermedad ¹⁵. Los movimientos en espejo congénitos, la parálisis de la mirada horizontal con escoliosis progresiva o la dislexia son enfermedades congénitas originadas por una guía axonal aberrante ¹⁵. Por otra parte, alteraciones ocasionadas por las moléculas guía también están involucradas con una migración neuronal deficiente, esto es causante

de enfermedades como el síndrome de Kallmann's, la enfermedad de Hirschsprung's, el autismo o la epilepsia ¹⁵. Nuevas evidencias indican que los cambios en la conectividad neuronal pueden favorecer la susceptibilidad o la progresión de diversas patologías ¹⁵. En algunas enfermedades neurodegenerativas la degeneración axonal precede a la aparición de los síntomas, tal es el caso de la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal ²⁰ o la EP²¹. La esclerosis lateral amiotrófica se caracteriza por una parálisis progresiva resultado de la muerte selectiva de las neuronas motoras superiores e inferiores. Diversos estudios en modelos de la enfermedad demuestran que en la mayoría de las formas de esta patología la degeneración de la unión neuromuscular precede a la muerte del soma neuronal ²⁰. De manera similar, la atrofia muscular espinal conlleva una significativa denervación muscular por parte de las neuronas motoras que resulta en una parálisis. Sin embargo, a diferencia de la esclerosis lateral amiotrófica, únicamente mueren las neuronas motoras inferiores ²⁰. Esta enfermedad se encuentra caracterizada por mutaciones en los genes de supervivencia de las neuronas motoras ^{20,22}. Estudios con ratones con mutaciones nulas para estos genes demostraron alteraciones en las terminaciones presinápticas de las neuronas motoras; el grado de estas alteraciones correlaciona con la progresión de la enfermedad ²². Estos datos sugieren un proceso de muerte neuronal retrograda que antecede a los síntomas de la enfermedad.

Estudiar el papel que las moléculas guía juegan en las enfermedades podría dar la respuesta a distintas incógnitas sobre la etiología aún desconocida para muchas patologías del sistema nervioso. Así mismo, las moléculas guía podrían aplicarse para diseñar posibles tratamientos, ya que en muchas enfermedades caracterizadas por alteraciones en las conexiones axonales aún no se cuenta con una alternativa terapéutica adecuada, tal es el caso de la EP.

Enfermedad de Parkinson

Por otra parte, la EP es una enfermedad neurodegenerativa del Sistema Nervioso Central (SNC), que es ocasionada por la muerte selectiva de las NDA de la SN pars compacta. Los axones que inervan al estriado en roedores o al caudado-putámen en primates degeneran y la ausencia de DA ocasiona los síntomas motores ²¹. Las principales características de esta enfermedad fueron inicialmente descritas en 1817 por James Parkinson²¹. Un siglo después se demostró que la disminución de la DA estriatal ocasionada por la muerte de las NDA en la SN generaba los síntomas característicos ^{21,23}. Los axones de las NDA localizadas en la SN proyectan hacia el caudado/putámen (o estriado en roedores) y forman la vía nigro-estriatal, la cual se afecta severamente en la EP ²¹ (Figura 3). La EP es la segunda patología neurodegenerativa más frecuente después de la Enfermedad de Alzheimer, inicia aproximadamente a los 55 años y el incremento de su incidencia está relacionado con el incremento de la edad ^{21,23,24}. En la mayoría de los casos se desconoce la etiología y se denomina Parkinson esporádico (95%), el restante es atribuido a una predisposición genética (5%) ²¹. Los principales genes involucrados en la aparición del Parkinson son α -sinucleína, Parkin, Ubiquitin C-terminal hidrolasa L1 y DJ1 ²¹. Para que se diagnostique la EP se requiere que el paciente presente bradicinesia, rigidez, temblor en reposo e inestabilidad en la postura ^{21,24-26}. El temblor que ocurre en reposo disminuye cuando se realizan movimientos voluntarios, la rigidez se refiere a la resistencia para iniciar movimientos voluntarios, mientras que la bradicinesia es la lentitud al realizar los movimientos²¹. Aunado a estos síntomas característicos se presentan otros como hipocinesia (reducción en la amplitud de movimientos), acinesia (ausencia de movimientos involuntarios), disminución de la expresión facial (hiponimia), disminución en el volumen de voz (hipofonia), problemas al pasar alimentos de manera inconsciente, adicionalmente se presentan problemas cognitivos, de demencia y depresión²¹.

El grado de degeneración de las terminales dopaminérgicas en el estriado parece anteceder a la muerte de las NDA en la SN ²⁷. Empleando la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la cual provoca la pérdida selectiva de las NDA en la SN ²¹, se demostró que la degeneración de las terminales dopaminérgicas en monos precede a la muerte de los somas de las NDA ²⁸. Por otra parte, en un estudio en el cual se comprobó que las especies reactivas de oxígeno producidas por la enzima NADPH oxidasa están involucradas en la muerte de las NDA por la neurotoxina MPTP, se observó que la protección de las terminales dopaminérgicas en el estriado por medio de la inactivación de esta enzima incrementó la supervivencia de los somas de las NDA en la SN ²⁹. Estos datos sugieren que al igual que en las patologías neuro-musculares mencionadas anteriormente ocurre un proceso de muerte retrógrada o “*dying back*”, es decir, que primero se ven afectadas las terminales nerviosas y posteriormente los somas.

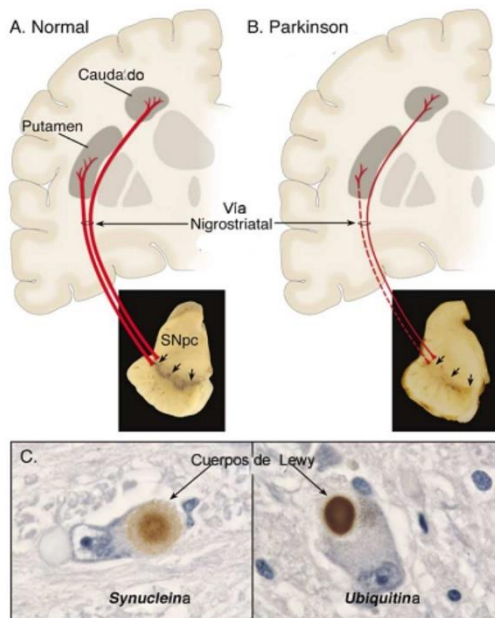


Figura 3. Neuropatología de la EP. A) Se esquematizan las proyecciones axonales que van de la SN hacia el caudado y putámen, formando la vía nigro-estriatal. B) Se ejemplifica la degeneración de la vía nigro-estriatal en pacientes con la enfermedad de Parkinson. C) Se muestran tinciones de los principales componentes proteicos en la EP de los cuerpos de Lewy, α -sinucleína y ubiquitina. Modificado de Dauer, 2003 ²¹.

Cuando inician los síntomas de la enfermedad, la DA en el putámen ha disminuido en un 80% ³⁰ y aproximadamente 60% - 80% de las NDA en la SN se han perdido ²¹. Aunque la degeneración dopaminérgica es la más marcada en la EP, otras áreas también se ven afectadas y presentan

cuerpos de Lewy, por ejemplo, en el sistema noradrenérgico (locus coeruleus), serotoninérgico (rafe) y colinérgico (núcleo motor dorsal del vago y el basal de Maynert); así como en la corteza cerebral, el núcleo olfatorio en la corteza y el sistema nervioso autónomo ²¹. Además de la degeneración de la vía nigro-estriatal, la EP está caracterizada por la presencia de inclusiones proteicas en el citoplasma de las NDA de la SN denominadas cuerpos de Lewy ²¹ (Figura 3). En tejido de la SN obtenido de pacientes con Parkinson se encontró que el mayor componente de los cuerpos de Lewy era la proteína α -sinucleína seguido de ubiquitina (Figura 3). De igual manera se observó la presencia de ambas proteínas en neuritas de la SN ²⁶. En otro estudio se determinó que el segmento no amiloide (NAC por sus siglas en inglés) de la proteína α -sinucleína es esencial para formación y agregación de estructuras hojas- β , esta conformación está implicada en la patogénesis de la EP ³¹.

Etiología

La etiología del Parkinson esporádico es aún desconocida, sin embargo, algunos factores ambientales pueden favorecer la aparición de esta enfermedad. El MPTP, fue producido accidentalmente durante la síntesis de 1-methyl-4-phenyl-4-propion-oxypiperidine, sustancia que se utilizaba como droga de abuso en los años ochenta²¹. En primates no humanos y en humanos la intoxicación por MPTP produce un síndrome parkinsoniano irreversible que genera todos los síntomas característicos de la enfermedad²¹. Esta toxina daña de manera selectiva a las NDA en un patrón muy similar al que ocurre en la EP ²¹. El herbicida paraquat y la rotenona, un compuesto citotóxico extraído de plantas naturales también han demostrado dañar a NDA de la SN²¹. Aunque no se conoce la totalidad de los eventos moleculares que producen la neurodegeneración de las NDA por parte de estos tres compuestos, se sabe que afectan el complejo 1 mitocondrial y generan inclusiones similares a los cuerpos de Lewy ²¹. Otro compuesto que causa la degeneración selectiva

de las NDA es la 6-hydroxydopamina (6-OHDA), el cual es captado por el receptor DAT presente en este tipo de neuronas. Esta neurotoxina genera especies reactivas de oxígeno, adicionalmente, interfiere con el complejo 1 mitocondrial. Sin embargo, a diferencia de los compuestos anteriormente descritos, esta toxina no es ambiental sino que fue sintetizada para generar un modelo roedor de la EP ³².

Debido a que estas toxinas afectan el complejo 1 mitocondrial y generan un síndrome parkinsónico se sugirió que la disfunción mitocondrial, con la consecuente generación del estrés oxidativo, podrían estar relacionados con la patogénesis de la EP ^{21,23,33}. En tejido de la SN de pacientes con Parkinson se observó que los cuerpos de Lewy contenían α -sinucleína nitrada, una forma oxidada de la α -sinucleína ³³. Estos datos sugieren que la disfunción mitocondrial pudiera estar relacionada con la formación de los cuerpos de Lewy ²¹. El daño oxidativo ocurre cuando la capacidad antioxidante compensatoria de la célula es sobrepasada por un exceso en la producción de especies reactivas que dañan lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares ³³. En tejido postmortem de la SN de pacientes con Parkinson, se demostró que la actividad de las enzimas NADH-ubiquinona reductasa y la NADH citocromo-c reductasa se encontraba disminuida, por lo que se concluyó que el complejo 1 mitocondrial presenta una actividad reducida en contraste con tejido proveniente de personas sanas sin la EP ³⁴. La inhibición del complejo 1 mitocondrial incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales forman radicales hidroxilo tóxicos o reaccionan con óxido nítrico para formar peroxinitrito ²¹. Estas moléculas causan daño celular al reaccionar con ácidos nucleicos, proteínas y lípidos; aunado a ello favorecen la presencia de proteínas mal plegadas ²¹.

Por otra parte, se tiene la hipótesis de que el plegado inadecuado y la agregación de determinadas proteínas son eventos que llevan a la muerte de las NDA en la SN ²¹. Los depósitos anormales de

proteínas en el cerebro también se presentan en otras enfermedades neurodegenerativas además de la EP, como la demencia asociada a cuerpos de Lewy o algunas variantes de Alzheimer³³, lo cual indica que la agregación de estas proteínas están involucradas en la degeneración neuronal²¹. Con respecto al Parkinson hereditario, algunas alteraciones genéticas se han relacionado con una conformación anormal de algunas proteínas o con alteraciones en el proceso encargado de reconocer a las proteínas mal plegadas²¹. Mediante espectrofotometría y microscopía de fluorescencia se demostró que los pesticidas DCC, dieldrin, paraquat y rotenona inducen un cambio conformacional en la α -sinucleína y propician que esta proteína forme fibrillas³⁵. Los resultados sugieren que la predisposición a la EP por toxinas ambientales y el mal plegamiento proteico no es excluyente. Al presentarse proteínas mal plegadas, las células intentan corregir el daño por medio de chaperonas, sin embargo, si el defecto no es corregido, estas proteínas son marcadas mediante poli-ubiquitinación y mandadas a degradación por proteosomas²¹. Conforme se avanza en la edad, la capacidad de utilizar tanto las chaperonas como el sistema de degradación por proteosomas disminuye, esto incrementa la cantidad de proteínas mal plegadas, lo cual a su vez afecta a los sistemas mencionados²¹ volviéndose un sistema de retroalimentación negativa. De manera interesante se ha descrito que incluso en personas sin alguna enfermedad neurodegenerativa la cantidad de neuronas que se mueren en la SN es mayor a la de otras regiones del cerebro, lo cual indica que las NDA son más susceptibles a degenerarse en personas de edad avanzada²³.

Como ya se mencionó, el envejecimiento es un factor que influye en la aparición de la EP. Diversos estudios revelan que las NDA de la región ventral de la SN presentan características que las hacen más susceptibles a daños ocasionados por el envejecimiento²³. Estos daños se reflejan en una marcada disfunción mitocondrial y en la incorrecta degradación de proteínas²³, factores clave en la aparición de la EP, como se describió anteriormente. Aunque una cantidad considerable de estrés oxidativo es ocasionado por la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria, las

NDA están expuestas a un estrés oxidativo adicional causado por el metabolismo de la DA ²³. La DA se metaboliza por la monoamino oxidasa y genera especies reactivas incluyendo radicales de oxígeno y H₂O₂ ²³. Las NDA se protegen del estrés oxidativo adicional mediante el transportador de dopamina (DAT), este transportador captura la DA potencialmente dañina (si la DA entra a las NDA causa mayor oxidación) y la manda a la terminal nerviosa donde es reempaquetada en vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas ²³; la disminución del transportador DAT puede ser un reflejo de la degeneración. En un estudio en el que se evaluó tejido humano de la SN, se demostró mediante tinciones y conteos estereológicos que la expresión del DAT disminuía proporcionalmente con la edad ³⁶. Se estudiaron tres grupos, tejido de personas jóvenes (0-49 años), mediana edad (50-69 años) y edad avanzada (70-80 años). Se observó que el grupo de mediana edad presentó una disminución de 75% con respecto al grupo joven, por otra parte, el grupo de edad avanzada presentó una reducción del 88% con respecto al tejido de personas jóvenes. Se calculó que las neuronas DAT positivas disminuyen en un 11.2% por década.

Tratamientos

La alternativa terapéutica actual para la EP se basa en tratar de restituir la DA faltante por la muerte de las NDA en la SN en el estriado (caudado o putámen) ²⁵. Los tratamientos actuales se basan en el uso del fármaco levodopa, el cual es el precursor inmediato de la DA ^{21,25}. La levodopa se administra de manera sistémica, debido a que la DA es incapaz de cruzar la barrera hemato-encefálica. Para evitar que sea metabolizado fuera del cerebro, su medicación es acompañada con otros fármacos inhibidores de la dopa – descarboxilasa, como carbidopa, y/o inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa, como el entacapone ²⁵. Estos fármacos incrementan la vida media de la levodopa y ayudan a disminuir los efectos secundarios ²⁵. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento con levodopa ha evolucionado, aún hay diversas complicaciones asociadas a su administración. Las

dicinesias son uno de los principales efectos secundarios. Éstas consisten en movimientos involuntarios hipercinéticos que varían en intensidad y frecuencia, lo que impacta de manera significativa la calidad de vida del paciente ^{21,25}. Adicionalmente, se presentan fluctuaciones en la respuesta del medicamento, por ejemplo, cuando el medicamento se metaboliza y hace efecto se denomina estado ON y la sintomatología de la EP disminuye. Sin embargo, el periodo en que el efecto concluye y antes de que se metabolice la siguiente administración está caracterizado por la aparición de síntomas característicos de la enfermedad, a este estado se le denomina "OFF" ²⁵. Adicionalmente, el paciente no responde de manera similar durante todo el tratamiento, por lo que hay que reajustar las dosis frecuentemente ²⁵. Otras complicaciones asociadas a su administración son anormalidades psiquiátricas como depresión, confusión, alucinaciones y trastornos del sueño ²⁵. Aunado a los efectos adversos, dicho tratamiento depende de que las NDA en la SN metabolicen la levodopa, pero, como se mencionó previamente, cuando los síntomas de la enfermedad aparecen la mayoría de las NDA se han perdido, por lo que el tratamiento con levodopa cada vez será menos efectivo y en general el tiempo por el cual tiene un efecto es muy corto. Por estas razones se han seguido investigando alternativas terapéuticas para la EP, que permitan restablecer la DA perdida y eviten en la mejor medida posible los efectos secundarios asociados a los tratamientos actuales.

Terapia de reemplazo celular en la EP

Modelo animal de la EP inducido por la neurotoxina 6-OHDA

Para investigar nuevas alternativas de tratamiento es necesario implementar modelos de la enfermedad. Uno de los modelos que surgieron inicialmente y hasta la fecha se mantiene como uno de los más utilizados es el desarrollado por Ungerstedt en la década de los sesenta ³². El modelo consiste en la administración intracerebral, mediante cirugía estereotáxica, de la toxina en roedores,

que induce la muerte de las NDA ^{32,37}. La toxina es inyectada en un hemisferio y genera anormalidades motoras, que reflejan el grado de degeneración neuronal. Dicha conducta puede ser cuantificada ³², lo cual permite evaluar distintos tratamientos y determinar su repercusión en la actividad motriz. El almacenamiento intracelular en las NDA de la 6-OHDA es mediado por el transportador de DA, que reconoce a la toxina debido a su similitud estructural con esta catecolamina ³⁷. Posterior a la acumulación intracelular la 6-OHDA se auto-oxida y es metabolizada por la enzima monoamina-oxidasa. Ambos procesos generan diversas especies citotóxicas como especies reactivas de oxígeno, H₂O₂ y quinonas de catecolaminas que conducen a la muerte celular; adicionalmente esta neurotoxina afecta el complejo 1 mitocondrial ³⁷.

Trasplantes de NDA en modelos animales y pacientes

En los años setenta en algunos laboratorios de Estados Unidos y Suecia surgió la idea de trasplantar NDA para poder reemplazar aquellas que se han perdido a causa de la EP ³⁸. Inicialmente se realizaron trasplantes de mesencéfalo ventral (Mv) de rata (región que contiene NDA) en roedores lesionados con 6-OHDA. En estos estudios se evaluó la recuperación mediante la conducta de giro inducida farmacológicamente ³⁸⁻⁴². Estos trabajos demostraron que el grado de recuperación dependía del sitio de trasplante, del grado de inervación en el tejido huésped por parte de las neuronas trasplantadas, así como las regiones inervadas por las NDA. Cuando el trasplante era colocado en el estriado o cerca de él, los animales mejoraban conductualmente ³⁹⁻⁴¹ (Figura 4). Mediante inmunocitoquímicas se observó que las NDA trasplantadas en el estriado hacían contactos sinápticos con las dendritas de las neuronas espinosas y con los cuerpos celulares de las neuronas gigantes ⁴². Sin embargo, cuando el trasplante se realizaba en la SN, las NDA no eran capaces de proyectar axones al estriado y los animales no mostraban una recuperación comparable a los animales que recibieron un trasplante intraestriatal (Figura 4) ^{41,43-45}. Estos resultados condujeron a

trasplantar tejido mesencéfalo humano obtenido de clínicas de aborto en ratas lesionadas con 6-OHDA. Se demostró que células del Mv de fetos de 9 semanas de gestación trasplantadas en el estriado proyectaron neuritas y disminuyeron la conducta de giro en animales lesionados ⁴⁶. Posteriormente diversos grupos comenzaron a diseñar protocolos que permitieran trasplantar tejido del Mv de fetos humanos de 6-9 semanas de gestación en pacientes con Parkinson idiopático severo. Inicialmente se describió que el trasplante unilateral en el putámen reducía los síntomas asociados a la enfermedad; tal es el caso de la rigidez y la bradicinesia, principalmente en el lado contralateral al trasplante ⁴⁷⁻⁵¹(Figura 4). Mediante tomografía por emisión de positrones se determinó con el uso del radio-marcador fluorodopa, que el trasplante reestablecía la síntesis de DA ^{47,49-51}. En algunos trabajos se logró estudiar postmortem el cerebro de pacientes que recibieron trasplante y se observó que las NDA sobrevivieron, inervaron el putámen ^{51,52} e hicieron sinapsis con células huésped ⁵². Sin embargo, diversos estudios reportaron que del 25 al 50% de los pacientes trasplantados no mejoraban, incluso mostraron un incremento en los síntomas asociados a la EP en el lado ipsilateral al trasplante, lo cual correlacionaba con un decremento en la captación de fluorodopa ^{49,50} (Figura 4). En un trabajo se modificó la estrategia experimental realizando un doble trasplante, el primero en el putámen y el segundo en el caudado. Se observó que 2 de 5 pacientes empeoraron tras el segundo trasplante ⁵³.

A pesar de que en varios trabajos se demostró y argumentó la eficacia de los trasplantes del tejido del mesencéfalo ventral fetal en el caudado y/o putámen de pacientes con Parkinson, otros trabajos publicaron que varios pacientes no se recuperaban, lo cual generó incertidumbre en cuanto a esta estrategia. Además, los estudios se realizaban en un número limitado de pacientes, por lo que era necesario utilizar un mayor número para brindarle más certeza a los resultados. También era necesario incluir en los estudios un grupo control en el que se evaluara el efecto placebo. Con este fin se realizaron posteriormente dos trabajos en los que se estudiaron a más de 30 pacientes.

Ambos estudios fueron doble ciego e incluyeron un grupo para evaluar el efecto placebo ^{54,55}. Uno de los estudios reveló diferencias entre el grupo sham y el trasplantado en pacientes con 60 años o menos. Sin embargo, en pacientes mayores a 60 años no hubo diferencias entre ambos grupos ⁵⁵. El otro estudio demostró que el grupo placebo empeoró conductualmente, mientras que el trasplantado mejoró de acuerdo a la escala para evaluar pacientes con Parkinson, sin embargo, 56% de los pacientes trasplantados desarrollaron discinencias ⁵⁴. Los autores concluyeron que no es recomendable el trasplante de tejido mesencefálico fetal para aliviar los síntomas de la EP.

La terapia de reemplazo celular ha demostrado ser una alternativa para reducir los síntomas asociados a la EP, tanto en modelos animales como en pacientes; sin embargo, los resultados clínicos indican que es necesario plantear diferentes estrategias experimentales que permitan evitar la inconsistencia en los resultados y la aparición de discinencias.

La principal estrategia experimental se ha basado en trasplantar las NDA no en su sitio ontogénico (substancia nigra), sino en una región ectópica, en el área en que las NDA proyectan sus axones (estriado en roedores o caudado/putámen en primates). Aunque el trasplante en esta región ectópica favorece la formación de las proyecciones eferentes de las neuronas trasplantadas y la liberación de DA en el sitio requerido, no es posible el establecimiento de las proyecciones aferentes que las NDA deberían recibir (Figura 4), lo cual podría estar interfiriendo en el funcionamiento celular. El trasplante en la SN probablemente modificaría esta situación, pero esta estrategia por sí sola es ineficaz por la incapacidad de los axones de alcanzar al estriado o caudado/putámen.

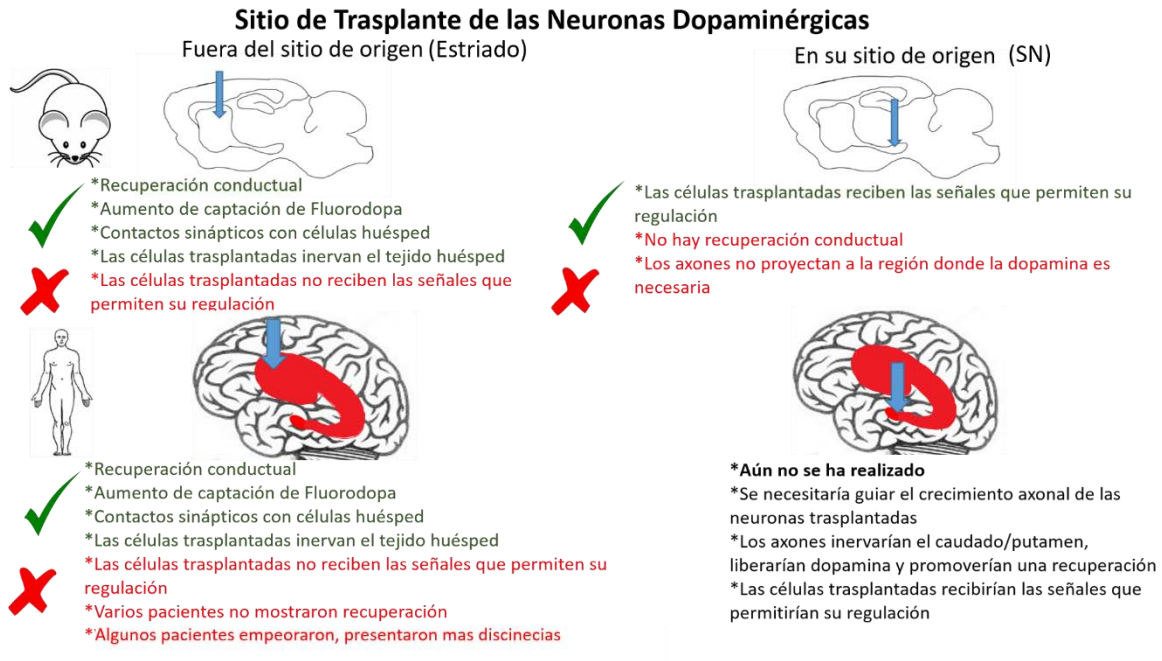


Figura 4. Ventajas y desventajas de los diferentes sitios de trasplante tanto en modelos de Parkinson como en pacientes con la enfermedad.

Esta incapacidad se debe a que, a diferencia de un cerebro en desarrollo, un cerebro adulto no es un ambiente permisivo para el crecimiento axonal. Aunado a esto, cuando se realiza un trasplante se genera una lesión con lo cual se inician varios procesos que inhiben el crecimiento axonal, como formación de la cicatriz glial^{56,57} y fibrosa⁵⁷; así como la sobre expresión de elementos inhibitorios como los proteoglicanos de condroitin sulfato, como neurocan, brevican y versican⁵⁸. Otro factor que impide el crecimiento axonal a lo largo de la vía nigro-estriatal es la ausencia de las moléculas guía que dirigen el crecimiento axonal, las cuales se encuentran presentes en la etapa de desarrollo mientras se forma la vía nigro-estriatal. La liberación en cerebro adulto de alguna o algunas moléculas implicadas en la formación de la vía nigro-estriatal que favorezcan y dirijan el crecimiento axonal podría ayudar a la inervación del estriado por parte de las NDA trasplantadas en SN.

Moléculas guía en el crecimiento axonal de las NDA en la vía nigro-estriatal

Las NDA localizadas en el Mv son esenciales para procesos cognitivos y motores. Se pueden distinguir por su anatomía y función los subgrupos A8, A9 y A10⁵⁹. Las NDA A8 corresponden a las localizadas en el campo retrorubral, las A9 a la SN, y A10 al área tegmental ventral (ATV)⁵⁹. Las NDA del subtipo A9 proyectan al estriado dorsal⁵⁹ formando la vía nigro-estriatal, están involucradas en el control de los movimientos⁶⁰ y su pérdida es la causante de la EP, como ya se mencionó. Para que ocurra la maduración neuronal tienen que llevarse procesos tempranos como la especificación celular, la maduración y la migración; también eventos posteriores como crecimiento neurítico, guía del crecimiento axonal, eliminación de procesos neuríticos “*pruning*” y formación de sinapsis⁶⁰. Uno de los modelos en los que mejor se ha estudiado la formación de la vía nigro-estriatal es el de rata. Se sabe que las NDA del Mv aparecen alrededor del día embrionario (E) 12 y comienzan a extender prolongaciones en E13⁶¹ (Figura 5). Posterior a la salida de los axones dopaminérgicos del cerebro medio, los axones se juntan y forman el fascículo medial (FM), (Figura 5)⁶⁰. Estos axones inervan el estriado y la corteza⁶⁰. Entre E14 y 15 los axones de las NDA crecen en dirección ventral-rostral (Figura 5)^{60,62}. Los axones llegan a la zona inferior del estriado en E17 y pausan su crecimiento, esto probablemente es debido a que el estriado aún no ha madurado lo suficiente por lo que aún no se expresan las señales que atraigan el crecimiento axonal^{60,62}. Para el día E20 los axones de las NDA de la SN han inervado el estriado y aparecen parches de fibras dopaminérgicas^{62,63} (Figura 5). Durante la primera semana post-natal la inervación estriatal aumenta y los parches se vuelven más evidentes⁶³.

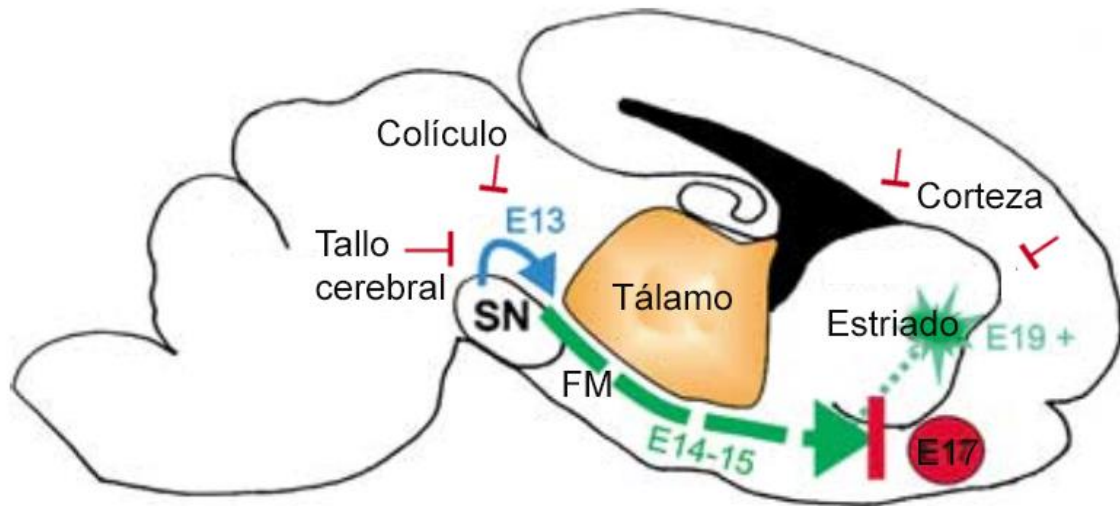


Figura 5. Desarrollo de la vía nigro-estriatal. Los axones de las NDA de la SN emergen en E13, inicialmente toman una dirección dorsal pero debido a señales inhibitorias provenientes del tallo cerebral y el colículo los axones cambian a una dirección ventral-rostral. Entre E14 y 15 los axones reciben señales atrayentes y crecen rostralmente hasta llegar a la base del estriado en E17. Los axones pausan su crecimiento, debido a señales inhibitorias de la corteza los axones no siguen avanzando rostralmente. En E19 los axones reciben señales atrayentes del estriado, por lo que los axones cambian a una dirección rostro-dorsal e inervan esta región. Las señales inhibitorias para el crecimiento axonal se muestran en rojo, mientras que las atrayentes en verde. Sustancia Nigra (SN), día embrionario (E), fascículo medial (FM). Modificado de Gates et. al., 2004 ⁶².

Durante la formación de la vía nigro-estriatal los axones reciben señales que dirigen su crecimiento, estas señales pueden ser repelentes o atrayentes. Para que la vía se forme adecuadamente la expresión de estas señales debe ser regulada temporal y espacialmente. Ciertas regiones del cerebro emiten señales repulsivas, mientras que otras promueven el crecimiento axonal. Mediante tinciones de axones dopaminérgicos con tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de DA, se demostró que al cultivar explantes de embriones se puede observar el crecimiento axonal en distintas etapas del desarrollo ⁶². Mediante un sistema de co-cultivos de explantes es posible evaluar el efecto que otras regiones del cerebro ejercen sobre el crecimiento axonal dopaminérgico del Mv. En estos ensayos se ha observado que explantes del FM ⁶², el estriado ^{62,64} y el PT ⁶⁴ durante la etapa embrionaria de formación de la vía nigro-estriatal promueven y dirigen el crecimiento axonal dopaminérgico. Por otra parte, explantes de corteza y tallo cerebral en E12 inducen un efecto de

repulsión⁶²; mientras que el tálamo^{62,64}, y la región limitante entre el cerebro medio y posterior⁶⁴ no generan ningún efecto en el crecimiento axonal. Estos resultados indican que el tallo cerebral y la corteza emiten señales quimio-repelentes. En contraste, el FM, el estriado y el PT liberan señales quimio atrayentes. Estas señales tienen que expresarse a tiempos determinados para que se forme la vía nigro-estriatal (Figura 5).

Efrinas

Se han identificado varias moléculas guía que tienen efecto en el crecimiento axonal de NDA del subtipo A9, por lo que podrían ser las responsables del crecimiento dirigido de axones dopaminérgicos en la formación de la vía nigro-estriatal. Mediante hibridación *in situ* se demostró la expresión selectiva del receptor EphB1 en NDA de la SN. Por otra parte, se describió que la región ventral del estriado, inervada por NDA del ATV pero no de la SN, expresa el ligando ephrin-B2⁶⁵. Estos datos sugieren que la interacción entre el receptor EphB1 y el ligando ephrin-B2 evita que los axones de las NDA inerven el estriado ventral. Utilizando cultivos celulares se corroboró que esta interacción inhibe el crecimiento axonal, lo cual apoya la idea que estas moléculas guía estarían participando en la formación de la vía nigro-estriatal.

Netrinas

Las netrinas son moléculas capaces de promover, atraer o repeler el crecimiento axonal en varias poblaciones neuronales⁶⁰. Utilizando inmunotinciones se demostró la presencia de los receptores DCC, robo1 y 2 en NDA de explantes de rata de E14, los ligandos de dichos receptores son netrina-1 y slit-2 respectivamente⁸. Se co-cultivaron explantes de Mv con células embrionarias de riñón “*human embryonic kidney*” (HEK), modificadas para la liberación de netrina-1 y se determinó que esta molécula promueve un crecimiento axonal dopaminérgico dirigido. En otro trabajo, utilizando ratones nulos para netrina-1 se demostró que la ausencia de esta molécula guía altera la inervación

axonal de las NDA del Mv al estriado ⁶⁶. Estudiando explantes de rata de E14 se observó que las poblaciones de NDA de la SN y del ATV responden a diferentes concentraciones de netrina-1, los axones de las NDA de la SN prefieren concentraciones bajas, mientras que los del ATV concentran altas. Estos datos muestran la importancia de la selectividad en los gradientes de moléculas guía en el crecimiento axonal dirigido.

Slits

Las proteínas Slits son conocidas por su papel en la inhibición y repulsión del crecimiento axonal de neuronas sensoriales ⁶⁰, sin embargo, también se ha descrito el papel que desempeñan en la guía de los axones dopaminérgicos. En un estudio se analizó el patrón de expresión del ARN mensajero de *Slit 1, 2 y 3*; así como de los receptores *Robo 1 y 2* en embriones de rata y se determinó que coincidía, tanto en ubicación como en tiempo, con el desarrollo de la vía nigro-estriatal ⁶⁷. El papel de estas moléculas en la guía axonal se corroboró *in vivo* al observar deficiencias en la inervación estriatal en ratones nulos para *Slit 1 y 2*, y *Robo 1 y 2*. La exposición de explantes del Mv a células modificadas para la liberación de *Slit-2* genera un efecto de repulsión e inhibición axonal dopaminérgica ^{8,67}. En un trabajo posterior, se demostró que también *Slit-1 y 3* inhiben y repelen el crecimiento de axones dopaminérgicos de explantes de Mv ⁶⁸.

Semaforinas

Las Semaforinas constituyen una familia grande de proteínas solubles o ancladas a membrana, intervienen en el establecimiento de redes neuronales de diferentes tipos celulares ⁶⁰. Participan en la regulación del crecimiento axonal y dendrítico, en la guía axonal, en la eliminación de procesos, en el reconocimiento de la zona a inervar y en la formación de sinapsis ⁶⁰.

SEMA3F se expresa en el Mv en la etapa embrionaria en la que los axones dopaminérgicos se dirigen hacia el estriado ^{64,69,70}. La alteración del patrón de expresión de SEMA3F mediante la expresión ectópica del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 8 demostró el papel de esta molécula guía en la regulación del crecimiento axonal dopaminérgico en el eje caudal-rostral ⁶⁹. Esta alteración indujo que los axones crecieran de manera aberrante. La inhibición de la expresión de *neuropilina* 2, receptor de SEMA3F, en ratones mutantes provocó que los axones dopaminérgicos se dirigieran a la región caudal y dorsal, en lugar de la rostral. Sin embargo, otro trabajo indica que la inhibición genética de *neuropilina* 1 y 2 en ratones mutantes no genera cambios significativos en la dirección axonal ⁷⁰. Ensayos en geles de colágena con explantes de Mv han demostrado que SEMA3F induce un efecto de repulsión axonal ^{64,70,71} y un moderado efecto en el colapso de conos de crecimiento ⁷⁰.

También se ha demostrado la presencia de la SEMA3A en el Mv en el periodo de formación de la vía nigro-estriatal ^{64,70,72}. En ratones mutantes carentes del factor de transcripción Nkx2.1 se observó durante el desarrollo embrionario una disminución en la expresión de la proteína soluble SEMA3A, así como un crecimiento aberrante de los axones dopaminérgicos ⁷². En animales normales los axones de la SN inervan el estriado ipsilateral, sin embargo, en los ratones mutantes los axones cruzan la línea media e inervan el estriado contralateral. Estos datos sugieren que la SEMA3A en algún momento del desarrollo de la vía nigro-estriatal repele el crecimiento axonal e impide que los axones crucen la línea media. En un ensayo *in vitro* se demostró que SEMA3A induce el colapso de conos de crecimiento de axones dopaminérgicos, así como un efecto muy moderado de repulsión ⁷⁰. Sin embargo, otros estudios demostraron, mediante la liberación por células HEK 293 de SEMA3A, que esta molécula incrementa el crecimiento axonal dopaminérgico ^{64,73}.

Por medio de estudios de hibridaciones *in situ* se demostró la presencia de SEMA3C en la región del PT en embriones de rata de E12.5. Mediante ensayos con explantes se observó que dicha región atrae el crecimiento axonal dopaminérgico⁶⁴, lo que indica que esta molécula guía probablemente sea la responsable del efecto atrayente. Se transfectaron células HEK 293 para que liberaran SEMA3C al medio y se observó que al co-cultivar explantes de Mv con estas células, los axones dopaminérgicos crecieron en dirección a las células HEK^{64,73}. Estos resultados demostraron el efecto quimio-atrayente de SEMA3C. Ensayos *in vitro* posteriores indicaron que SEMA3C también es capaz de incrementar la longitud axonal dopaminérgica⁷³. El efecto quimio-atrayente de la SEMA3C también se ha demostrado *in vivo* en un trabajo realizado por nuestro grupo, en donde, se trasplantaron células HEK 293 que liberaron SEMA3C a lo largo de la vía nigro-estriatal, lo que promovió el crecimiento axonal dirigido de NDA trasplantadas en la SN, hacia el estriado⁷⁴. El crecimiento axonal dirigido repercutió en una mejora conductual de ratas lesionadas con la toxina 6-OHDA, que como se mencionó previamente es un modelo de la EP. La evidencia experimental sugiere que la SEMA3C puede ser utilizada para guiar el crecimiento axonal de NDA en estudios de reemplazo celular en modelos animales de la EP.

Como se describió anteriormente, en los ensayos de reemplazo celular en pacientes con Parkinson se utilizó tejido mesencéfalo proveniente de fetos humanos, esto conlleva diversas desventajas. Una de ellas es la asociada a problemas éticos; el uso de tejido proveniente de fetos está desaprobado por varios sectores de la sociedad, incluso legalmente estuvo prohibido en algunos países como en Estados Unidos. Sin embargo, otras desventajas están más relacionadas con el procedimiento quirúrgico. Los procedimientos en cuanto a la obtención, manejo, preservación y el tiempo entre la obtención y el trasplante variaba entre cada grupo de investigación³⁸, esto complica la reproducibilidad y la comparación de resultados. Otro problema con el uso de tejido fetal como fuente de NDA es la disponibilidad³⁸, el trasplante implica el uso de varios fetos obtenidos de clínicas

de aborto, lo que dificulta la obtención de una suficiente cantidad de tejido. Otra característica asociada a la incertidumbre de los resultados fue que debido a esta baja disponibilidad se trasplantaban pocos pacientes por estudio, lo que repercutía en una pobre estadística y por ende una baja confiabilidad de los datos. Es por todo esto que es necesario utilizar una fuente distinta de NDA. Como se detallará en la siguiente sección, las células troncales constituyen una buena alternativa para la obtención de NDA, ya que se puede obtener un número ilimitado de células y los protocolos de diferenciación son reproducibles. Sin embargo, también presentan desventajas, por ejemplo, el porcentaje de diferenciación varía entre protocolos y las células que se obtienen son muy heterogéneas, es decir, se diferencian diferentes tipos celulares, aunque el procedimiento se haya dirigido para la obtención de uno solo.

Células troncales

Las células troncales han recibido una gran atención debido a la posibilidad de usarlas como una fuente de células en terapias de reemplazo celular. Además de su aplicación en medicina regenerativa, las células troncales han permitido estudiar procesos fundamentales del desarrollo como la diferenciación celular y la regeneración tisular ⁷⁵. Las células troncales se definen como células inmaduras, indiferenciadas que son capaces de auto-renovarse a través de la replicación, así como por su capacidad de diferenciación hacia células maduras de tejidos específicos ^{75,76} (Figura 6). Una célula troncal puede dividirse y dar lugar a dos células troncales, esta división se denomina simétrica, por otro lado, cuando de la división surge una célula troncal y otra progenitora la división se denomina asimétrica ⁷⁵. Las células troncales pueden clasificarse de acuerdo a la etapa del organismo donde se obtienen como ESC o células troncales adultas ⁷⁶. Otra manera de clasificar a las células troncales es por su capacidad de diferenciarse a células especializadas. Las células

totipotentes son capaces de crear un organismo completo, esta propiedad la posee el cigoto y las células subsecuentes hasta el estadio de 8 células de la mórula ^{75,77} (Figura 6). Posteriormente la diferenciación celular da origen al blastocisto, el cual está formado por una capa de células exteriores denominadas trofoblasto y por células indiferenciadas localizadas en el interior denominadas células de la masa celular interna o “*inner cell mass*” (ICM)^{76,77} (Figura 6). Estas células ya no son totipotentes pero retienen la capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales, por lo que se les llama pluripotentes ⁷⁶⁻⁷⁸ (Figura 6). Por otra parte, las células multipotentes tienen un potencial de diferenciación más reducido, estas dan lugar a ciertos linajes únicamente ^{76,78} (Figura 6). Un ejemplo de ellas son las células troncales somáticas, las cuales residen en tejidos fetales o adultos ⁷⁵; a diferencia de las ESC, éstas se pueden mantener en cultivo únicamente por periodos cortos de tiempo ⁷⁶.

La investigación con células troncales data de los años sesentas cuando se establecieron líneas de células del carcinoma embrionario, las células troncales de los teratocarcinomas ^{75,77}. Estas células aisladas clonalmente retenían su capacidad para diferenciarse en derivados de las tres capas germinales. Eran también capaces de participar en el desarrollo embrionario de ratones quiméricos cuando eran introducidas en la ICM de embriones tempranos de ratón ⁷⁹. Sin embargo, estas células mostraron aberraciones cromosómicas ⁸⁰ y perdían su habilidad de diferenciarse ⁸¹. Posteriormente se cultivaron líneas celulares de blastocistos de ratón (ESC) mediante medio condicionado de células de carcinoma embrionario ⁸² o utilizando una capa de células alimentadoras o “*feeders*” de fibroblastos embrionarios de ratón ⁸³. Las ESC se originan de la ICM y pueden mantenerse *in vitro* por tiempos largos ⁷⁶ y diferenciarse mediante determinados protocolos a células de las tres capas embrionarias (Figura 6). Cuando son cultivadas estas células muestran una capacidad casi ilimitada de proliferación ⁷⁷. Su pluripotencialidad se demostró *in vivo* por su introducción en blastocistos. Los ratones quiméricos resultantes demostraron que las ESC son capaces de contribuir a todos los

linajes celulares incluyendo la línea germinal⁸⁴. Cuando el blastocisto se implanta en el útero ocurre una reorganización celular, se forma un embrión bilaminar⁷⁸. La capa inferior adyacente a la cavidad del blastocisto se denomina hipoblasto o endodermo primitivo, estas células darán origen únicamente a tejido extraembrionario. Por otra parte, la capa de células adyacente al trofoblasto se denomina epiblasto o ectodermo primitivo y producirá células de las tres capas germinales que darán origen al embrión⁷⁸. Las células del epiblasto de embriones en etapas tempranas de preimplantación se han aislado para obtener células troncales del epiblasto o “*epiblast stem cells*” (EpiSC)⁷⁸. Recientemente dos grupos demostraron la pluripotencialidad de estas células^{85,86}. Las EpiSC poseen requerimientos de manutención *in vitro* muy diferentes a las ESC de ratón, sin embargo, de forma interesante tienen requerimientos similares a las hESC⁷⁵ (tabla 1).

Las células primordiales germinales o “*primordial germ cells*” (PGC) (Figura 6) son otro tipo de células troncales pluripotentes, estas residen en las crestas gonadales en desarrollo y dan lugar a la formación de gametos^{75,77}. Estas células comparten muchas características con las ESC, poseen una alta capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro*⁸⁷. Cuando las PGC son implantadas en blastocistos son capaces de contribuir a la formación de células somáticas y germinales en ratones quiméricos⁸⁸. El aislamiento y cultivo de las PGC de fetos humanos de 5 a 7 semanas llevo a la creación de líneas celulares embrionarias germinales humanas⁸⁹. Estas células fueron capaces de diferenciarse a varios tipos celulares, sin embargo, mostraron una limitada capacidad proliferativa⁹⁰ en contraste con las líneas de ESC murinas y humanas⁷⁷.

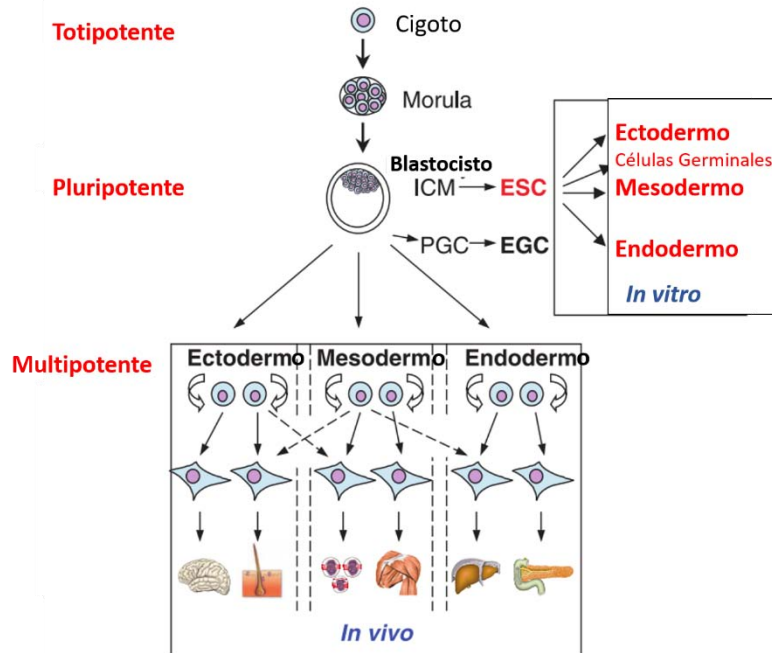


Figura 6. Jerarquía de las células troncales. El cigoto y las primeras divisiones celulares se definen como totipotentes porque pueden generar un organismo entero. En el estadio de blastocisto únicamente las células de la masa celular interna (ICM) retienen la capacidad de formar células de las tres capas embrionarias. En un estadio de desarrollo posterior se toman las células primordiales germinales (PGC) que dan origen a las “Embryonic germ cells” (EGC), que también son pluripotenciales. En tejidos fetales o adultos se encuentran presentes células multipotentes y progenitores para reemplazar las células que se pierden o que se dañan en tejidos y órganos. Las células troncales embrionarias derivadas de la ICM tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* a todas las células somáticas del organismo, así como las células germinales masculinas y femeninas. Modificado de Wobus y Boheler, 2005 ⁷⁷.

Células troncales embrionarias de roedor

El establecimiento de las ESC de ratón implicó el aislamiento y cultivo de la ICM de embriones pre-implantación sobre fibroblastos embrionarios de ratón o “mouse embryo fibroblast” (MEFs) ⁷⁷. Las ESC de ratón mantienen relativamente un cariotipo normal y estable ⁷⁷. Una prueba irrefutable para demostrar que una célula troncal es pluripotencial es su capacidad para formar teratomas, que contengan derivados de las tres capas germinales en roedores inmuno-deficientes ⁷⁵. Para mantener a las ESC de roedor en estado pluripotente se requiere una capa de células alimentadoras, esto sugirió que los MEFs proveían factores para mantener la troncalidad. Dos grupos de manera independiente identificaron al “leukemia inhibitory factor” (LIF) como el responsable de promover

la pluripotencia o suprimir la diferenciación^{91,92} (Tabla 1). El LIF es una glicoproteína soluble de la familia de las interleucinas, actúa a través del receptor membranal gp130 y señala por medio de la vía de las STAT⁹³. Se ha propuesto que cuando una interacción ligando-receptor relevante sobrepasa un determinado umbral la probabilidad de diferenciación se incrementa⁷⁷.

| | ESC ratón | EpiSC ratón | ESC humanas |
|---|-----------|-------------|-------------|
| Marcadores de células troncales | | | |
| Oct-4 | √ | √ | √ |
| Nanog | √ | √ | √ |
| Sox2 | √ | √ | √ |
| Klf-4 | √ | X | √ |
| Gbx 2 | √ | X | √ |
| Stella | √ | X | √ |
| Rex 1 | √ | X | √ |
| Fgf-5 | X | √ | X |
| Fosfatasa alcalina | √ | X | √ |
| Marcadores de superficie | | | |
| SSEA 1 | √ | √ | X |
| SSEA 3/4 | X | X | √ |
| TRA 1-60 | √ | NE | √ |
| Respuesta a factores que preservan la pluripotencialidad | | | |
| LIF | √ | X | X |
| BMP | √ | X | X |
| Nodal/Activina | X | √ | √ |
| FGF-2 | X | √ | √ |

√ Tabla 1. Marcadores moleculares de células troncales pluripotentes mantenidas in vitro y los factores que preservan su pluripotencialidad. "√" significa que el marcador se expresa o que participa en la pluripotencia de las células. "X" significa que el marcador no se expresa o que no participa en la pluripotencia de las células. NE significa que no se ha examinado esa característica. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), proteínas morfogénicas de hueso (BMP), antígeno embrionario específico de fase (SSEA), factor inhibidor de leucemia (LIF), receptor alfa de célula T (TRA) Tomado de Pelayo et. al, 2011⁷⁵

Para la identificación de las ESC se han establecido algunos marcadores moleculares y de superficie (Tabla 1). Uno de los marcadores que se han asociado al mantenimiento del estado pluripotente es el factor de transcripción Oct 4. Se ha observado que basta un incremento menor que el doble en la expresión basal de este factor para que las células se diferencien al endodermo primitivo y al mesodermo, mientras que la pérdida en la expresión induce la formación del trofoectodermo, así como la pérdida de la pluripotencia⁹⁴. Nanog es otro factor que está involucrado en mantener a las ESC en estado pluripotente, su sobre expresión confiere a las células la capacidad de auto-renovación sin la necesidad de estimularse el receptor gp130⁷⁷. Las proteínas morfogenéticas óseas

(BMP) coadyuvan con el LIF para mantener el estado de pluripotencia ⁹⁵. Estas proteínas inducen la expresión de genes inhibidores de la diferenciación a través de la vía de las Smad. El bloqueo de los factores de transcripción involucrados en la diferenciación permite que la célula se auto-renueve al exponerla al LIF, que activa a la vía STAT3 ⁹⁵. La señalización por MEK y ERK también están involucrada en la auto-renovación y diferenciación de las ESC. La inhibición de MEK/ERK inhibe la diferenciación y mantiene la auto-renovación *in vitro*, por otro lado, la expresión de ERK y de la fosfatasa de tirosina SHP-2 contrarrestan los efectos proliferativos de STAT3 y promueven la diferenciación ⁹³. La vía de señalización por Wnt ha demostrado participar en el mantenimiento de la pluripotencia, la activación de esta vía por un inhibidor farmacológico de GSK-3 mantiene el fenotipo de células indiferenciadas en ESC murinas y humanas, además permite la expresión de los factores Oct 4 y Nanog ⁹⁶.

Células troncales embrionarias humanas

El conocimiento adquirido en el establecimiento de las ESC murinas permitió que se desarrollaran protocolos para aislar y mantener líneas a partir de embriones humanos en estado de pre-implantación generados por fertilización *in vitro* ⁹⁷⁻⁹⁹ y posteriormente por el cultivo de blastocistos ¹⁰⁰. Las hESC humanas comparten varios marcadores de pluripotencia con las ESC de roedor, la expresión de Oct 4, la actividad de telomerasa, así como la formación de teratomas y la generación de derivados de las tres capas germinales ^{98,101} (Tabla 1). De manera similar a las ESC de roedor las hESC mantienen una alta proliferación por largos periodos *in vitro* y mantienen un cariotipo estable ¹⁰². Sin embargo, hay algunos marcadores de troncalidad que son diferentes entre ambos tipos celulares, por ejemplo, el marcador de superficie SSEA-1 presente en las ESC de roedor se encuentra ausente en las células humanas ¹⁰³. Por otra parte, el marcador de superficie SSEA-3/-4 está en las células humanas y no en las de roedor ¹⁰⁴ (Tabla 1). Para las ESC de roedor es suficiente la

administración de LIF para sustituir los factores liberados por los MEFs que favorecen la troncalidad, sin embargo, las hESC no responden ante LIF, por lo que es necesario cultivarlos con una capa de *feeders* y con FGF2^{98,99} (Tabla 1).

El aislamiento y caracterización de las hESC ha permitido estudiar procesos relacionados a la diferenciación celular que ocurren en el desarrollo embrionario. Anteriormente estos eventos eran poco estudiados por las complicaciones metodológicas existentes. Por otra parte, los avances con las hESC ha hecho posible la existencia de una fuente ilimitada de células que pueden utilizarse en terapias de reemplazo celular o la evaluación de futuros medicamentos⁷⁵.

Diferenciación a NDA

La evidencia experimental sugiere que la troncalidad depende de un balance entre diferentes señales, ya que un desbalance de éstas puede provocar que las células se diferencien. De manera fisiológica la diferenciación, así como la viabilidad y la proliferación dependen de elementos extrínsecos como las interacciones a diferentes niveles que se dan en el microambiente, estas pueden ser célula-célula, célula-matriz o célula-molécula soluble; así como por factores intrínsecos como factores de transcripción o proteínas y moléculas reguladoras del ciclo celular⁷⁵. Por otra parte, la diferenciación *in vitro* es afectada por parámetros como la densidad celular, los componentes del medio, los aminoácidos, los factores de crecimiento, las proteínas de la matriz extracelular, el pH, la osmolaridad y el suero fetal⁷⁷. La expresión temporal de genes y proteínas de tejidos específicos de las ESC durante la diferenciación *in vitro* indica que de cierta manera se recapitulan los procesos del desarrollo embrionario¹⁰⁵.

La formación de neuronas de la médula espinal, del cerebro posterior y del cerebro medio requieren la señal ventralizante de sonic hedgehog (SHH), además de factores que definen el eje anterior-posterior como FGF8, FGF4 y ácido retinoico^{106,107}. Para la generación de NDA *in vitro* es necesaria

la recapitulación de las señales presentes en el desarrollo, es por ello que a menudo estas moléculas son añadidas en los distintos protocolos de diferenciación. La diferenciación de hESC a NDA promete la obtención de células que en un futuro puedan ser utilizadas en ensayos clínicos de pacientes con la EP. Es por ello que diversos grupos han trabajado en el establecimiento de protocolos para la obtención de NDA funcionales. En un estudio se demostró la eficiente generación de NDA a partir de dos líneas de hESC (H1 y H9) mediante el cocultivo con células estromales, las cuales poseen un potencial de inducción neural así como de la administración secuencial de moléculas que inducen el patrón ventral rostral y de maduración dopaminérgica ¹⁰⁸. Las hESC cultivadas sobre el estroma formaron estructuras neuroepiteliales en forma de roseta, más del 90 % de las células expresaron marcadores de precursores neurales como Pax6, Nestina, la Proteína de Adhesión Neuronal y Sox1. Posteriormente las células se expusieron a SHH y FGF8, factores que intervienen *in vivo* en el establecimiento del centro organizador del istmo. En la etapa final se añadió ácido ascórbico y “*brain derived neurotrophic factor*” (BDNF). Se obtuvo de 64 a 79% de células TH+ con respecto al total de células β III tubulina positivas (marcador de linaje neural). La identidad de las NDA se determinó por inmunotinciones, RT-PCR, microscopía electrónica, liberación de DA y electrofisiología.

En un estudio más reciente se utilizó una estrategia diferente para la derivación de NDA a partir de las mismas líneas de hESC. Para la especificación de NDA se requiere la co-expresión de los marcadores FOXA2 y LMX1A ¹⁰⁹. En ese trabajo se indujo la expresión de FOXA2 mediante una inhibición dual de la vía de las SMAD y LMX1A por la activación de la vía de las WNT ¹⁰⁹. La inhibición de SMAD se logró con los fármacos LDN193189 y SB431542, mientras que la activación de las WNT se indujo mediante el fármaco CHIR99021 el cual es un inhibidor de la GSK β (Figura 7). De manera similar a otros protocolos, se utilizó el FGF8 y se activó la señalización de SHH mediante un agonista, y en la etapa tardía del protocolo se usaron factores de maduración como BDNF, “*glial derived neurotrophic factor*” (GDNF) y ácido ascórbico (Figura 7). Se comparó la proporción de células TH+

obtenidas con este protocolo con respecto a otro que implicaba la formación de rosetas neurales, como el trabajo descrito al inicio de la sección y se observó que con esta nueva estrategia se obtenía una mayor cantidad de células TH+. Las células obtenidas mediante el protocolo de inhibición dual de SMAD expresaban LMX1A y FOXA2, y liberaban DA y sus metabolitos DOPAC y HVA, a diferencia de las células obtenidas con el otro protocolo. Además, los autores comprobaron la funcionalidad de las células en modelos roedores de la EP, las células sobrevivieron y promovieron una recuperación conductual, adicionalmente se hicieron trasplantes en monos lesionados con la neurotoxina MPTP, modelo de la EP, y se corroboró la supervivencia de las células, así como la presencia de fibras dopaminérgicas.

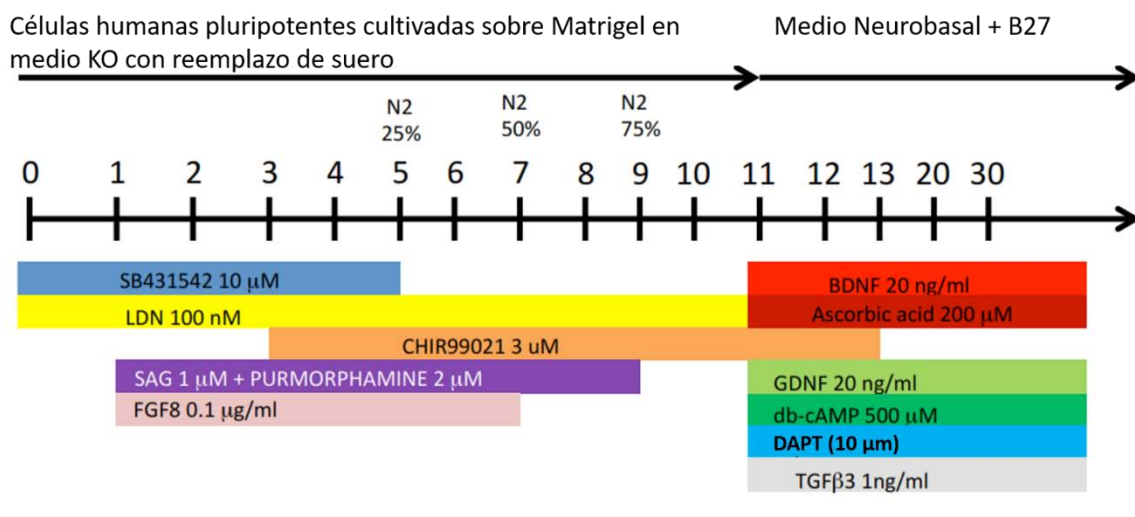


Figura 7. Protocolo de diferenciación dopaminérgica a partir de hESC. Modificado de Kriks et. al., 2011¹⁰⁹

Los datos sugieren que con el protocolo de inhibición dual se obtiene un mayor número de neuronas TH+, y estas presentan más marcadores de identidad dopaminérgica con respecto a las células obtenidas con protocolos en los que las células forman rosetas neurales. Además de que su funcionalidad en modelos *in vivo* de la EP ha sido comprobada, es por esto que en el presente trabajo se utilizó el protocolo de inhibición dual para obtener NDA humanas.

Hasta el momento se ha descrito que una alternativa para evadir los problemas asociados al uso de tejido fetal de embriones humanos en terapias de reemplazo celular para la EP son las NDA diferenciadas a partir de hESC. Aunque no se ha demostrado que posean todas las características de una NDA, si se ha corroborado que presentan muchos marcadores dopaminérgicos característicos y son funcionales en modelos animales de la EP.

Por otra parte, si las NDA se trasplantaran en la SN, su sitio fisiológico, las neuronas podrían recibir las señales necesarias para regular la liberación de dopamina. Con esta estrategia, posiblemente se evitarían las dificultades observadas por diversos grupos cuando se trasplantan las células en el estriado. Sin embargo, como se mencionó previamente es necesario guiar el crecimiento axonal hacia el estriado, ya que en el cerebro adulto las señales que dirigen a los axones dopaminérgicos se encuentran ausentes. Una alternativa viable para lograrlo es mediante la administración de la molécula quimio-atrayente SEMA3C, la cual dirige el crecimiento axonal de NDA diferenciadas de ESC de roedor y promueve una recuperación conductual en ratas parkinsonicas ⁷⁴. En ese trabajo, la SEMA3C se liberó a lo largo de una trayectoria artificial entre la SN y el estriado por células humanas embrionarias de riñón, a las cuales se les había transfectado una construcción para que liberaran constitutivamente esta proteína. Sin embargo, aunque no se observó una reacción de rechazo, la introducción al cerebro de células ajenas al linaje neuronal o glial no sería la mejor alternativa si se piensa en una futura aplicación en pacientes. Es por ello la necesidad de evaluar alguna alternativa que permita liberar la SEMA3C. La proteína liberada debería de conservar todos sus efectos con respecto al crecimiento axonal dopaminérgico. Además de ello, debe ser biocompatible, es decir, su introducción al cerebro no debe de generar una reacción adversa.

Hidrogeles

Los hidrogeles son polímeros con características físicas y químicas que los hacen buenos candidatos para ser implantados en sistemas biológicos ¹¹⁰. Los hidrogeles son polímeros hidrofílicos que pueden incorporar agua en más del 90 % de su estructura ^{110,111}. La incorporación se lleva a cabo durante el proceso de gelificación, proceso que caracteriza a los hidrogeles. La gelificación sucede cuando un polímero en solución cambia su conformación a una estructura de gel por la polimerización de monómeros ¹¹⁰. La gelificación conlleva la formación de enlaces entre los monómeros en respuesta a diferentes estímulos ^{110,112}. La dureza y la porosidad son variables que afectan la interacción de las células con el hidrogel, ambas características físicas dependen de la densidad del gel, la cual puede modificarse durante el proceso de gelificación ^{110,113,114}. Diversos estímulos pueden promover la gelificación de los hidrogeles, por ejemplo, temperatura ¹¹⁵⁻¹¹⁷, pH ¹¹⁸⁻¹²⁰, la exposición a luz UV ^{112,121-123} o la concentración de iones ¹²⁴⁻¹²⁷. Sin embargo, la gelificación *in vivo* limita el uso de factores físicos dañinos para el organismo como la luz UV, pH extremo o temperaturas no fisiológicas. Es por ello que varios hidrogeles han sido diseñados para que gelifiquen al entrar en contacto con temperaturas fisiológicas ^{116,117}, concentración de iones fisiológicas ¹²⁴⁻¹²⁷ o pH fisiológico ^{118,120}. La gelificación *in situ* presenta varias ventajas, por ejemplo, la solución puede ser implantada de forma líquida, lo que es particularmente importante en tejidos blandos como el cerebro, en los que la implantación de estructuras rígidas o sólidas puede ocasionar diversas complicaciones ¹²⁸. La gelificación *in situ* permite que se pueda manipular la forma que adoptará el hidrogel en el tejido. A diferencia de otros polímeros, los hidrogeles pueden utilizarse para rellenar cavidades formadas por traumatismos en el sistema nervioso (Figura 8). Uno de los principales problemas en la regeneración del SNC es que los axones transectados por la lesión ya no pueden reinervar el otro lado de la cavidad debido a la falta de un sustrato permisivo para su crecimiento, así como la falta de señales que promuevan y dirijan el crecimiento (Figura 8) ¹²⁸.

Hidrogeles como sustrato del crecimiento axonal

Las características físicas de los hidrogeles como el alto contenido de agua en su estructura, su porosidad, así como la estructura en tres dimensiones que toman durante el proceso de gelificación emula en cierto grado a la matriz extracelular de varios tejidos ^{110,114,129}. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que los hidrogeles son un sustrato permisivo para el crecimiento axonal. Se sintetizó un hidrogel a base de la secuencia de péptidos Arginina-Alanina-Ácido aspártico-Arginina repetida 16 veces (RADA 16). Al promover la gelificación, estos péptidos se auto-ensamblan para formar una matriz. Se demostró que neuronas del hipocampo de ratas presentaban una actividad sináptica similar a cuando eran sembradas sobre Matrigel, una mezcla de proteínas de matriz extracelular comercial derivada de carcinoma, ampliamente utilizada como sustrato para el crecimiento celular ¹³⁰. Otro estudio demostró que el hidrogel es capaz de soportar la proliferación y la diferenciación de células progenitoras neurales de la misma forma que el Matrigel, además de permitir el crecimiento por periodos superiores a 5 meses ¹²⁶.

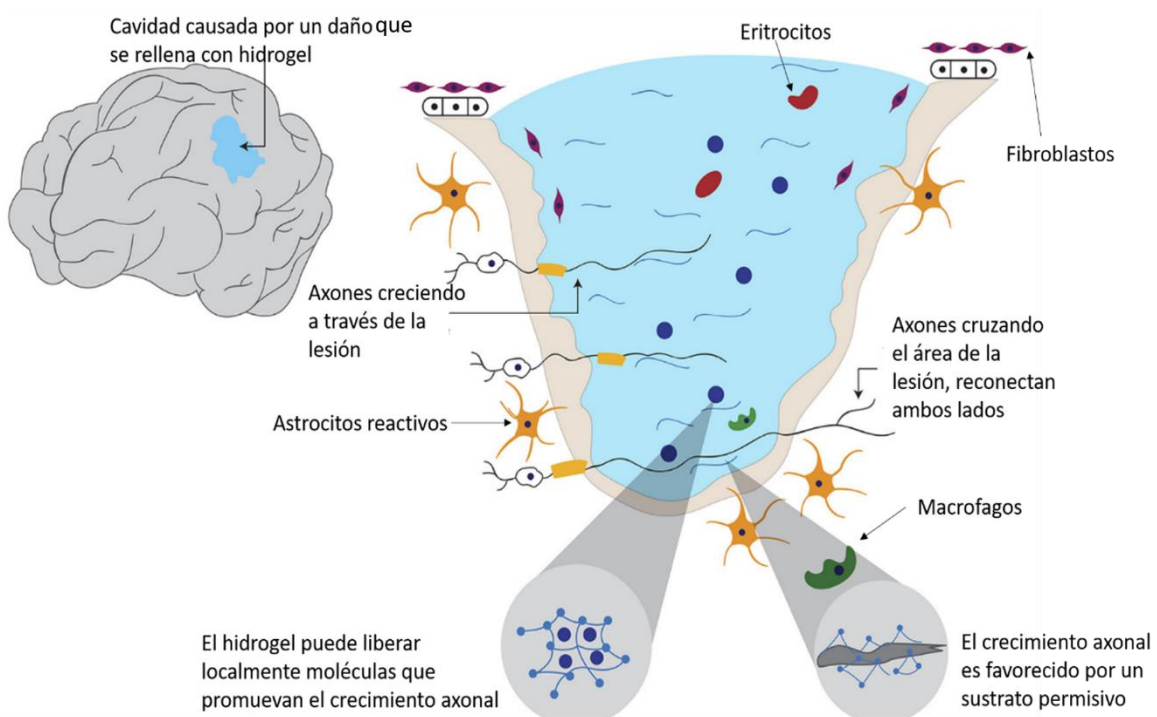


Figura 8. La gelificación *in situ* de los hidrogeles favorece la regeneración axonal en lesiones en el cerebro. Los hidrogeles son capaces de llenar cavidades irregulares, con lo cual brindan un sustrato permisivo para que los axones puedan reinervar el otro lado de la lesión. Además, los hidrogeles pueden liberar moléculas que favorezcan el crecimiento axonal. Modificado de Carballo-Molina y Velasco, 2015 ¹²⁸.

Por otra parte, se han realizado estudios *in vivo* para determinar si los hidrogeles son biocompatibles con el tejido del cerebro. Un grupo de trabajo realizó dos estudios en los que implantó un polímero de polietilenglicol (PEG) en cerebro de ratas y de primates no humanos. Después de 4 meses se observó en los cerebros de los monos que la reacción glial y microglial alrededor del implante del hidrogel era similar a la observada en el grupo control ¹³¹. Con respecto al cerebro de ratas, se demostró que el polímero generaba una reacción glial inferior a la que presentaba el grupo control ¹³². A pesar de que la estructura de los hidrogeles ha demostrado no generar rechazo por parte del tejido cerebral, cuando se combina con partículas que no son biodegradables puede generarse una reacción adversa. En un estudio se implantó un hidrogel de PEG conjugado con partículas de sílice en el estriado de ratas, 30 días después se observó una gran cantidad de macrófagos y células gliales alrededor del sitio del implante, comparado con el grupo control ¹³³. Como se mencionó, las características físicas de los hidrogeles permiten que se puedan utilizar para rellenar las cavidades ocasionadas por un daño en el tejido del cerebro (Figura 8). En otro artículo se lesionó la corteza de ratas adulta y la cavidad resultante fue llenada con solución salina o con un hidrogel RADA 16 ¹³⁴. A las 2 semanas se observó una disminución significativa de la presencia de astrocitos y macrófagos, comparado con el grupo control. Después de 6 semanas el hidrogel redujo significativamente el área de la lesión, además de ello se observó crecimiento celular en la cavidad.

En un trabajo similar se utilizó un hidrogel de ácido hialurónico, solo o modificado para contener la proteína de matriz extracelular laminina ¹³⁵. A las doce semanas se observó que los hidrogeles permitían la infiltración celular, la angiogénesis y la inhibición de la cicatriz glial. Sin embargo, solo el hidrogel con laminina fue permisivo para el crecimiento neurítico. Para evaluar si la reconexión

axonal promovida por la implantación de un hidrogel en una discontinuidad del tejido nervioso ocasionada por una lesión es funcional, en un trabajo se utilizó un modelo de ceguera en hámsters causado por la transección del nervio óptico ¹²⁴. La cavidad fue llenada con solución salina o con un hidrogel RADA 16. Los investigadores encontraron que en los animales que recibieron el hidrogel las áreas alrededor de la lesión se reconectaron después de 6 semanas, en contraste con los animales del grupo control. Aunado a ello, los animales tratados con el hidrogel recuperaron la visión, lo que se corroboró con pruebas conductuales.

Los datos sugieren que, a pesar de que los resultados pueden variar dependiendo del tipo de hidrogel y de la aproximación experimental, estos polímeros son un buen sustrato para el crecimiento axonal. Los experimentos *in vivo* han corroborado que cuando los hidrogeles son implantados en el cerebro favorecen el crecimiento axonal.

Hidrogeles como sistemas acarreadores y liberadores

Otra cualidad que tienen los hidrogeles es su capacidad para embeber moléculas o células en su estructura durante el proceso de gelificación ^{125,127,136,137}. La incorporación de moléculas en los hidrogeles es favorecida por el alto contenido de agua que éstos poseen, lo que permite la difusión de moléculas solubles ^{125,127,137}. El proceso de incorporación y liberación está influenciado por características del hidrogel como el tamaño del poro y por las propiedades de la molécula, como su peso o su carga eléctrica ^{125,137}. En el caso en que el tamaño del poro es mayor al de la molécula incluida, la liberación ocurre por un proceso de difusión ¹³⁸. Por otra parte, cuando la molécula es más grande que el poro, son los procesos de degradación y erosión los que determinan la liberación ¹³⁷.

La liberación local de fármacos o moléculas de diversa índole es un factor clave en el tratamiento de diversas lesiones y enfermedades del sistema nervioso ¹²⁸. La liberación de drogas en el SNC

implica un gran reto debido a la presencia de la barrera hematoencefálica y hematoespinal que impide el paso a muchas moléculas al SNC ¹³⁹. El uso de catéteres asociados a sistemas de mini-bombas de infusión y la administración de un bolo de medicamento son estrategias comúnmente utilizadas para la liberación de fármacos en el SNC ¹³⁹. La administración del bolo en el espacio intratecal se ve afectado por el constante flujo del líquido cerebro-espinal, el cual dispersa el medicamento reduciendo su efectividad ¹³⁹. Por otro lado, el uso de catéteres presenta una alta probabilidad de infección, debido a que la mini-bomba de infusión se coloca externamente. Aunado a esto, es común que los catéteres se enreden, se desconecte o presenten fugas ¹⁴⁰.

Debido a que los hidrogeles pueden gelificar *in situ* es posible emplearlos como sistemas de liberación local ^{127,137,139,141} (Figura 8), aunque deben de investigarse estrategias de implantación que impliquen el menor daño al tejido cerebral. El uso de hidrogeles biodegradables es especialmente relevante para tratamientos a largo plazo, ya que evitaría un segundo procedimiento quirúrgico de remoción. Los hidrogeles son un sistema de liberación muy versátil, ya que se puede modificar la tasa de liberación del fármaco modificando la concentración del hidrogel ¹²⁸. El hidrogel puede modificarse para ajustarse a necesidades específicas como la vida media del fármaco, la dosis o el tiempo de tratamiento ¹²⁸.

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que el hidrogel RADA 16 con nombre comercial Puramatrix es capaz de embeber y liberar proteínas relevantes en el área de medicina regenerativa como FGF, BDNF y el factor de crecimiento vascular endotelial ¹⁴².

Inclusión y liberación de moléculas que afectan el crecimiento axonal

En un estudio se incluyó la proteína SEMA3A en un hidrogel de PEG conjugado con partículas de sílice y se evaluó su efecto en el crecimiento axonal dopaminérgico ¹³³. La SEMA3A es una molécula implicada en el desarrollo de la vía nigro-estriatal. Mediante hibridaciones *in situ* se ha demostrado

su expresión en la región en la que los axones del cerebro medio crecen en dirección al cerebro anterior ⁶⁴. Estudios previos *in vitro* realizados por el mismo grupo demostraron que la SEMA3A promueve la elongación axonal de NDA de cultivo primario o diferenciadas de ESC de roedor ⁷³. Se observó un incremento significativo en la longitud axonal dopaminérgica en las células expuestas al hidrogel con 2 ó 5 µg/ml de SEMA3A, comparado con la condición control.

Aún no hay muchos estudios en los que se hayan utilizado a los hidrogeles como vectores de moléculas que promuevan y dirijan el crecimiento axonal, sin embargo, las características de los hidrogeles, y los trabajos hasta ahora realizados indican que podrían utilizarse *in vitro* para liberar moléculas que promuevan un crecimiento axonal dirigido.

En este trabajo hemos evaluado *in vitro* si un hidrogel conformado por péptidos que se auto ensamblan es capaz de incorporar y liberar la proteína SEMA3C. Mediante ensayos de direccionamiento axonal se ha determinado si la liberación promueve atracción de los axones dopaminérgicos. Posteriormente se estudió si la SEMA3C liberada por el hidrogel es capaz de promover el crecimiento axonal de NDA de roedor o diferenciadas a partir de hESC.

Justificación

La terapia de reemplazo celular en la EP basada en células troncales ha demostrado ser una alternativa viable para el restablecimiento de los síntomas asociados a la enfermedad. Sin embargo, las inconsistencias en los ensayos con pacientes han hecho evidente la necesidad de modificar la estrategia experimental. Una razón por la que pudieran estar apareciendo las discinesias en pacientes trasplantados es que debido a que las NDA son trasplantadas en un sitio no fisiológico, no están en el microambiente idóneo, lo cual repercute en su funcionamiento. Por otra parte, el trasplante en la SN, el sitio fisiológico de las NDA presenta el impedimento de que los axones dopaminérgicos no son capaces de crecer en dirección al estriado. Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que es posible guiar el crecimiento axonal dopaminérgico *in vivo* mediante la liberación de la proteína SEMA3C, la cual está implicada en la formación de la vía nigro-estriatal, promueve el crecimiento axonal hacia el estriado de NDA trasplantadas en la SN. En ese trabajo se utilizaron células embrionarias de riñón transfectadas para la liberación de la SEMA3C. Una alternativa para no introducir células ajenas al cerebro es el uso de polímeros que sean biocompatibles y que permitan la incorporación y liberación de distintas moléculas. Los hidrogeles son biopolímeros que han demostrado, en estudios *in vitro* e *in vivo*, ser un buen sustrato para el crecimiento axonal. Su implantación en el cerebro de roedores y primates no ha generado reacción de rechazo. Por otra parte, los hidrogeles tienen la capacidad de incluir en su estructura diversas moléculas y liberarlas al medio a través de diversos procesos. Esto sugiere que dichos biopolímeros pudieran implantarse en el cerebro y utilizarse como vehículos de administración. El hidrogel formado por RADA 16 ha demostrado en diversos estudios ser capaz de embeber y liberar moléculas *in vitro*, así como promover el crecimiento y la regeneración axonal, por lo que resulta ser un buen candidato para liberar la SEMA3C y en estudios posteriores, implantarse en modelos de la EP.

Previo al trasplante se tiene que evaluar, en estudios *in vitro*, si el hidrogel es capaz de incluir y liberar a la SEMA3C. Además, es necesario hacer pruebas para determinar si la SEMA3C liberada dirige y promueve el crecimiento axonal dopaminérgico. Por lo tanto, el uso de un biopolímero que sea un sustrato permisivo para el crecimiento axonal y que simultáneamente permita liberar la SEMA3C podría constituir un avance significativo en la estrategia del trasplante intranigral de NDA en modelos de la EP.

Hipótesis

El hidrogel será capaz de embeber y liberar la SEMA3C, la proteína liberada promoverá y guiará el crecimiento axonal de neuronas dopaminérgicas cultivadas.

Objetivo General

Estudiar el crecimiento axonal dirigido de NDA cultivadas favoreciendo la liberación de SEMA3C por un hidrogel biocompatible.

Objetivos Particulares

- ✓ Conjugará la SEMA3C al hidrogel y evaluará su liberación.
- ✓ Realizará ensayos *in vitro* de direccionamiento axonal para determinar el efecto sobre NDA de roedor al ser expuestas al hidrogel conjugado con SEMA3C.
- ✓ Evaluará la longitud axonal de NDA de roedor en presencia del hidrogel acoplado con SEMA3C.
- ✓ Diferenciará hESC a NDA que expresen el marcador de TH.
- ✓ Determinará la expresión de los receptores NRP1 y NRP2 en las NDA humanas.
- ✓ Evaluará la longitud axonal de NDA humanas en presencia del hidrogel acoplado con SEMA3C.

Materiales y Métodos

Conjugación de la SEMA3C en el hidrogel y su liberación

En el presente estudio se utilizó el hidrogel RADA 16 con nombre comercial, PuraMatrix (solución al 1%) de la compañía Becton Dickson, conformado por péptidos que se auto-ensamblan. Los péptidos están formados por los aminoácidos arginina, alanina y ácido aspártico¹⁴³. El hidrogel fue diluido con agua estéril libre de sales para obtener una concentración final de 0.15%, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. El hidrogel fue combinado con la proteína recombinante SEMA3C de humano (Abcam) durante la gelificación, posteriormente se incubó a 37°C en solución salina estéril por 28 días. Diariamente se recuperó una alícuota de la solución, y se reemplazó con la misma cantidad de nueva solución. La SEMA3C fue mezclada con el hidrogel antes de que se promoviera su gelificación por la adición de solución salina (0.9% de cloruro de sodio)¹⁴³. La SEMA3C se conjugó a una concentración de 5 y 10 µg/ml y su liberación se cuantificó mediante un ensayo de ELISA; el protocolo empleado fue el recomendado por el proveedor (Cloud-Clone Corp). El experimento se repitió 5 veces por cada concentración.

Animales

Se utilizaron ratas adultas y embriones de 14 días de gestación de la cepa Wistar. Los animales fueron alojados y manejados de acuerdo a la norma local NOM-062-ZOO-1999, y a la guía internacional para el uso de animales de laboratorio (Animal Welfare Assurance A5281-01). Se respetó el protocolo CICUAL avalado por el comité de ética del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C +/- 2°C) con un ciclo de 12 h de luz y 12 de oscuridad. La comida y el agua fueron brindados *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados para obtener el tejido y procesar los cortes. Se realizaron esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

Extracción de Colágena

El procedimiento de extracción de colágena fue realizado de acuerdo a lo reportado previamente¹⁴⁴. Cuatro colas congeladas de ratas adultas fueron lavadas con etanol al 70%. Utilizando pinzas estériles se obtuvieron los tendones que fueron lavados con etanol al 70%. Se obtuvieron 2 gramos de tendones, estos se cortaron en fragmentos de 0.5 cm. Una vez secos, los tendones fueron transferidos a 60 ml de una solución fría (4°C) de ácido acético al 0.1%. Los tendones fueron puestos en agitación a 4°C por 20 h. La solución final se diluyó con 80 ml de agua estéril y fue centrifugada a 9000 rpm por 30 minutos a 4°C. Esta solución fue utilizada para preparar los geles de colágena.

Ensayos de atracción axonal utilizando explantes en geles de colágena

Se obtuvieron explantes de las regiones del Mv, del istmo (Ist), y del PT de embriones de 14 días como se describió previamente⁶⁴ y se mantuvieron en solución de Krebs. Los explantes de Mv fueron embebidos en la matriz de colágena, ésta se obtuvo al mezclar 300 µl de medio N2 (DMEM/F12 1:1, suplementado con 25 µg/l de insulina humana, 30 nM de selenito de sodio, 100 µM de putrescina, 20 nM de progesterona y 100 mg/l de apotransferina), 100 µl de solución de colágena, 10 µl de una solución de cloruro de sodio 1.537 M (concentración final de 36.6 mM) y 10 µl de NaHCO 0.89 M (concentración final de 21.2 mM); esta mezcla se mantuvo a 4 °C previo a su gelificación. Los explantes de Mv fueron embebidos junto con explantes de PT (n=23) o Ist (n=17) en cajas de 4 pozos (Nunc) y se dejó polimerizar a 37°C por una hora. Se tuvo especial cuidado para mantener una distancia de 500-1000 µm entre los explantes, posteriormente se añadió una capa de colágena y se dejó polimerizar por una hora. Finalmente, se añadieron 700 µl de medio N2.

Para los experimentos en los cuales se evaluó al hidrogel, se conjugó una gota de PuraMatrix con

SEMA3C (n=21) o con una proteína de la piel de cerdo acoplada al fluoróforo Verde Oregon 488 (Molecular Probes), como proteína control (PC, n=11), ya que esta proteína tiene un peso molecular y carga eléctrica similar a la SEMA3C. Ambas proteínas se conjugaron a una concentración de 200 µg/ml y el hidrogel se dejó polimerizar por una hora a temperatura ambiente. Una capa adicional de colágena se añadió e inmediatamente se depositó el explante de Mv. Posterior a una hora a 37°C, una capa adicional de colágeno se añadió y se dejó polimerizar por otra hora a 37 °C, finalmente 700 µl de medio N2 fueron adicionados. Los explantes fueron cultivados por 5 días sin cambio de medio.

Para determinar el efecto de atracción o repulsión en los explantes de Mv, la longitud de los axones TH+ se cuantificó usando el “plugin” NeuronJ en el software ImageJ (*National Institutes of Health*)¹⁴⁵. El explante de Mv fue dividido en el área proximal (P) y la distal (D), como lo indica el esquema de la Figura 10, con respecto a la ubicación del otro explante o del hidrogel. En los casos en los cuales los explantes proyectaban muchos axones, únicamente se consideraron los 10 más largos; cuando hubo menos de 10 axones todos los axones fueron medidos. El promedio del crecimiento axonal en la región D y P fue utilizado para calcular el cociente P/D. Cuando el valor fue superior a 1 se consideró un efecto de atracción; en contraste, cuando el valor fue menor a uno, se atribuyó un efecto de repulsión¹⁴⁶. Cuando el explante no presentó ningún crecimiento se registró un valor de cero. Un problema metodológico fue que cuando se añadía la última capa de colágena, el hidrogel se fragmentaba. Se descartaron aquéllos experimentos en los cuales se presentaron muchos fragmentos y/o donde estos quedaban distribuidos alrededor del explante y no era posible la determinación de las regiones P y D.

Diferenciación dopaminérgica de las hESC

Se utilizó la línea de células troncales embrionarias humanas H9, por medio de una transducción

lentiviral esta línea expresa la proteína verde fluorescente (GFP) de forma constitutiva ¹⁴⁷. La diferenciación a NDA fue inducida mediante la inhibición dual de SMAD combinada con la inducción de la placa de piso ¹⁰⁹. Las células H9 fueron sembradas en Matrigel (BD), se crecieron por 11 días en medio condicionado “knockout” DMEM con 15% reemplazo de suero, 2 mM GlutaMAX, aminoácidos no esenciales y 10 μ M de β -mercaptoetanol. Los cultivos fueron expuestos a LDN 193189 (100 nM, Stemgent; 0-11 días), SB431542 (10 μ M, Tocris; 0-5 días), el agonista de SHH SAG (1 μ M, Sigma; 1-9 días) y Purmorfamina (2 μ M, Stemgent; 1-9 días), FGF8 (100 ng/ml, Peprotech; 1-7 días) y CHIR99021 (3 μ M, Stemgent; 3-13 días). El medio “knockout” con reemplazo de suero fue cambiándose paulatinamente por medio N2 a partir del día 5. En el día 11 el medio fue cambiado a medio Neurobasal con suplemento B27 (NB/B27; Invitrogen) suplementado con BDNF (20 ng/ml, Peprotech), ácido ascórbico (0.2 mM, Sigma), GDNF (20 ng/ml, Peprotech), TGF β 3 (1 ng/ml, Peprotech), dibutilil AMPc (0.5 mM; Sigma), y DAPT (10 mM; Sigma) por 10 días (Figura 7). En el día 21, las células fueron disociadas usando TrypLE Express (Life Technologies) y resembradas en las cámaras de crecimiento axonal.

Cámaras de crecimiento axonal

Las cámaras de crecimiento son dispositivos fabricados con Polydimethylsiloxano. Se adquirieron de Xona Microfluidics (Standard Neuron Device Cat.No: SND900) y fueron utilizadas de acuerdo las recomendaciones del proveedor. Las cámaras fueron adheridas a cubreobjetos tratados con poly-L-ornitina (15 mg/ml) / Laminina (1 mg/ml) / Fibronectina (2 mg/ml) ejerciendo una ligera presión. Para la obtención de NDA de ratas se realizó la disección en solución de Krebs del Mv de embriones de 14 días, que se disoció utilizando TrypLE Express (Gibco). Las células fueron sembradas a una densidad de 250,000 células/5 μ l en el compartimento celular (Figura 13). Después de 10 minutos 100 μ l de medio N2 fueron añadidos. Al otro lado de la cámara, se agregaron 200 μ l de medio N2

para la condición control o 200 ml de medio N2 con 20 mg/ml de SEMA3C. Para los experimentos con hidrogel, primeramente, se añadieron 100 ml de medio en un pozo proveedor, el cual se encontraba en el lado opuesto a donde se habían sembrado las células (Figura 13). Posteriormente se añadieron 3.5 ml del hidrogel acoplado a SEMA3C o PC (200 mg/ml) y 100 ml de medio. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂/95% aire por 5 días. Aunque se utilizó la misma densidad celular, cada cámara presentó un número variable de axones; el total de axones medidos fueron los siguientes: medio solo (n=18), medio con SEMA3C soluble (n=59), hidrogel acoplado a PC (n=90) e hidrogel con SEMA3C (n=92). El crecimiento axonal en los microcanales fue cuantificado usando el “plugin” NeuronJ en el software ImageJ¹⁴⁵. Decidimos utilizar este software porque permite la medición de la longitud axonal dentro de los microcanales, los axones que van entrando a los microcanales y también aquellos que salían. Las NDA humanas fueron sembradas en las cámaras de crecimiento al día 21 de diferenciación y se mantuvieron por 14 días.

Tinción con calceína, inmunofluorescencia y microscopía

Para visualizar las células vivas, los cultivos fueron incubados con 1 mM de calceína-AM (R&D Systems) por 15 min. Este ensayo nos permitió identificar claramente los axones en crecimiento dentro de los microcanales de las cámaras de crecimiento, ya que en algunos casos la observación mediante contraste de fase resultó complicada. Para la inmunodetección de las células en las cámaras de crecimiento se fijó con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente o con metanol por 5 minutos a -20 °C. Las células fueron permeabilizadas y bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente con 0.3% de Triton X-100 Y 10% de suero normal de cabra en PBS. Las células se incubaron toda la noche, todos los anticuerpos se diluyeron en PBS más 10% de suero normal de cabra: mouse anti- β III Tubulin 1:1000 (Covance, número de catálogo MR-435P); rabbit policlonal anti-TH 1:1000 (Pel-freez, número de catálogo P40101-150). Los anticuerpos secundarios

fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente: Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit 1:1000 (Molecular Probes); Alexa 568 goat anti-mouse 1:1000 (Molecular Probes). En el caso de las células humanas que expresan la GFP, el Alexa 488 fue substituido por el Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit 1:500 (Jackson ImmunoResearch). En todos los experimentos se incluyeron controles negativos que consistieron en la adición únicamente del anticuerpo secundario, sin encontrar marcaje inespecífico.

En experimentos paralelos, se sembraron sobre cubre objetos, células provenientes de la misma suspensión de NDA humanas que fueron usadas en las cámaras de crecimiento. Después de 28 ó 35 días de diferenciación, se llevó a cabo una inmunotinción para los receptores NRP1 o NRP2 siguiendo los protocolos previamente descritos¹⁴⁸. Las células se bloquearon con 10% de suero de caballo por hora y media, y se permeabilizaron con 0.1% de Triton X-100 y 5% de suero de caballo; posteriormente se incubaron con anti-TH, junto con anti-NRP1 1:500 (R&D Systems) o anti-NRP2 (1:2500¹⁴⁹) durante toda la noche. Los anticuerpos secundarios fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente (1:1500; Molecular Probes). Se calculó el porcentaje de neuronas que co-expresaban TH/NRP1 (se contaron 130 células para el día 28 y 134 para el día 35) o TH/NRP2 (se contaron 95 células para el día 28 y 98 células para el día 35), en dos experimentos independientes.

Los explantes fueron procesados de acuerdo a protocolos previamente establecidos⁶⁴. Los geles de colágena se fijaron con paraformaldehído al 4% por dos horas a temperatura ambiente. Los explantes se permeabilizaron y bloquearon por 3 horas a temperatura ambiente con 0.3% de Triton X-100 y 10% suero normal de cabra en PBS. Los geles de colágena fueron expuestos a los mismos anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las cámaras de crecimiento. Los tiempos de incubación fueron mayores: los explantes se expusieron al anticuerpo primario por 2 días y al secundario por un día.

Las imágenes de las cámaras de crecimiento con células de roedor fueron tomadas con un microscopio confocal Olympus FV-1000. Las fotografías de las células humanas en las cámaras de crecimiento fueron todas con el microscopio confocal Zeiss LSM510. Los parámetros de captura fueron similares en todos los grupos.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar. Los experimentos se hicieron por duplicado y se realizaron al menos tres experimentos independientes. Como prueba estadística se realizó ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 6.0 para graficar y realizar el análisis estadístico. Se consideraron diferencias estadísticas con una $P \leq 0.05$.

Resultados

Liberación de la SEMA3C por el hidrogel

Se conjugó la proteína SEMA3C recombinante humana con el hidrogel PuraMatrix a dos diferentes concentraciones (5 ó 10 mg/ml) y se cuantificó su liberación. La solución salina en contacto con el hidrogel acoplado a la SEMA3C se colectó cada semana y mediante un ensayo de ELISA se cuantificó la liberación. Después de 28 días se detectó que para ambas concentraciones se liberaron niveles constantes de la proteína (Figura 9).

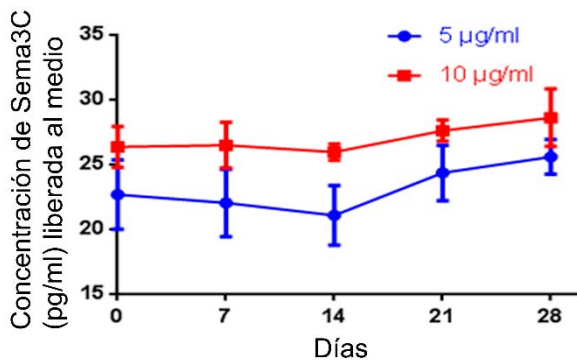


Figura 9. Liberación de la Semaforina 3C (SEMA3C) embebida en el PuraMatrix. Cuantificación por ELISA de la SEMA3C liberada por el hidrogel a las concentraciones de 5 y 10 µg/ml. El hidrogel es capaz de liberar la SEMA3C al medio por lo menos 28 días a ambas concentraciones.

La SEMA3C liberada por el hidrogel atrae el crecimiento axonal de NDA

Los geles de colágena forman un ambiente de tres dimensiones que favorece el crecimiento axonal^{126,144,150,151}, además de ello permite la difusión de moléculas^{64,66,152}. Para evaluar si la liberación de la SEMA3C por parte del hidrogel puede influenciar la dirección del crecimiento axonal de las NDA se utilizó un sistema de cultivo en geles de colágena, que incluyó explantes de Mv, co-cultivados con explantes de PT o Ist. Adicionalmente, explantes de Mv se cultivaron en presencia del hidrogel polimerizado acoplado a SEMA3C o a la PC. Como control positivo se utilizaron los cultivos de Mv-PT ya que estudios previos indican que la región del PT ejerce una atracción axonal de las NDA^{64,153};

como control negativo se utilizaron los explantes de Mv con Ist, región que no atrae a los axones dopaminérgicos ⁶⁴. De forma paralela, se cultivaron explantes de Mv con el hidrogel acoplado a la SEMA3C o a la PC (Figura 10). Después de 5 días, se realizaron inmunotinciones para TH y β III tubulina para visualizar la dirección del crecimiento de los axones dopaminérgicos. Se calculó un radio de atracción P/D como se describe en la sección de métodos (Figura 10).

No se observaron axones dopaminérgicos provenientes del explante de Mv creciendo en dirección a los explantes del Ist (Figura 11). En contraste, se observó un efecto de atracción cuando los axones dopaminérgicos estuvieron en presencia de explantes del PT (Figura 11). Un efecto similar se observó cuando las NDA contenidas en el explante de Mv fueron expuestas al hidrogel acoplado con SEMA3C: la mayoría de los axones se localizaron en la zona P y crecieron en dirección al hidrogel (Figura 11).

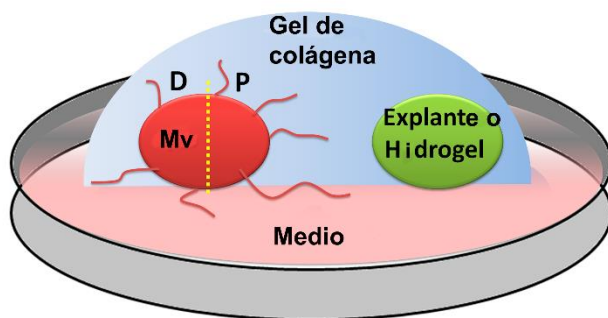


Figura 10. Esquema del sistema de co-cultivos en gels de colágena de explantes de Mesencéfalo Ventral (Mv) con otros explantes o con hidrogeles. El explante de Mv se co-cultivó con explantes de PT, Ist, hidrogel acoplado con la PC o hidrogel con SEMA3C. El explante de Mv se dividió en zona proximal (P) o distal (D) para estudiar el direccionamiento axonal.

De manera opuesta, los axones crecieron en direcciones aleatorias cuando fueron expuestos al hidrogel con la PC (Figura 11). Setenta por ciento de los axones dopaminérgicos en el co-cultivo Mv-PT mostraron un fenómeno de atracción mientras que solo 30% presentaron repulsión. En contraste, en el grupo de Mv-Ist los axones mostraron un 65% de repulsión, 12% de atracción y 23% no presentaron crecimiento (Figura 12). Cuando los explantes de Mv se expusieron al hidrogel

acoplado con SEMA3C se observó un 90% de atracción y 10 % de repulsión. Contrariamente, se observó un 64% de repulsión, 27% de atracción y 9% sin crecimiento cuando se expusieron al hidrogel acoplado con la PC (Figura 12).

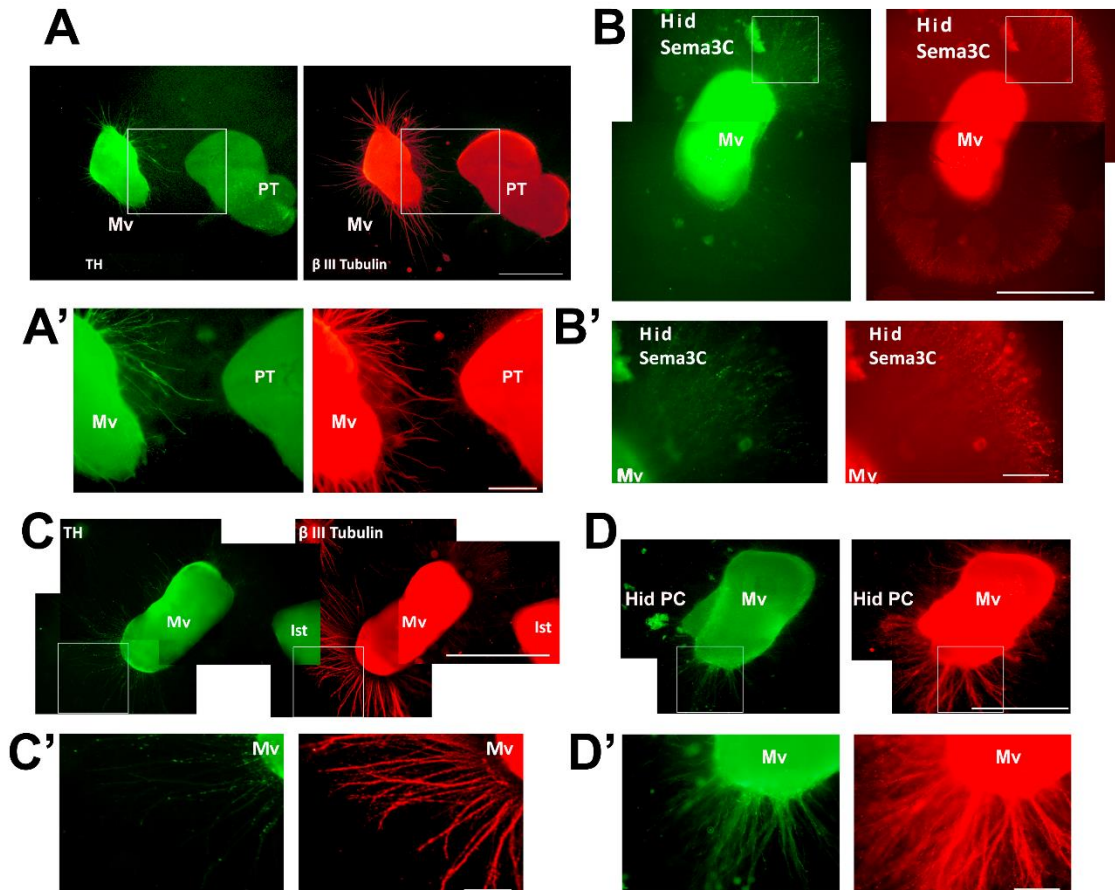


Figura 11. El explante de PT y el hidrogel conjugado con SEMA3C inducen atracción del crecimiento axonal dopaminérgico dirigido. Mediante inmunotinciones para TH y β III Tubulina, se observa que los axones dopaminérgicos provenientes del explante de Mv crecen en dirección al explante de PT (A); en A' se muestra a mayor aumento. De igual forma, los axones dopaminérgicos son atraídos en presencia del hidrogel acoplado a SEMA3C (Hid SEMA3C) (B), con un aumento del área en recuadro B'. En contraste, los axones dopaminérgicos crecen de forma aleatoria al estar expuestos al explante del Istmo (Ist) (C). Cuando el explante de Mv se cultiva con el hidrogel conjugado con la proteína control (Hid PC) los axones dopaminérgicos no muestran una dirección determinada (D). Barras de escala: A – D: 1000 μ m; A' – D': 100 μ m.

Se calculó el cociente proximal/distal para cuantificar el efecto de atracción en cada grupo experimental (Figura 12). Las condiciones de Mv-PT y Mv-hidrogel/SEMA3C presentaron valores del radio proximal/distal superiores a uno (Figura 12), lo que indica que la SEMA3C liberada por el hidrogel atrae a los axones de las NDA de manera similar al explante de PT. Mv-Ist y Mv-hidrogel/PC presentaron valores menores a uno (Figura 12). De manera paralela se midió la longitud de los axones TH+ independiente de su ubicación proximal o distal y se encontró que los valores fueron similares en todos los grupos (Figura 12).

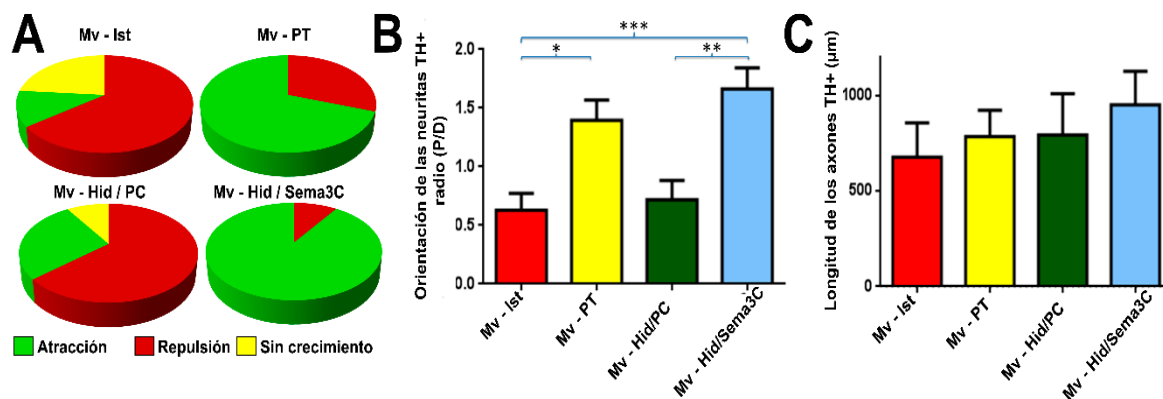


Figura 12. El hidrogel conjugado con SEMA3C (Hid/SEMA3C) atrae de forma similar a los axones dopaminérgicos del Mv que el explante de PT. Los axones dopaminérgicos del Mv se clasificaron como proximales, distales o sin crecimiento. La proporción de atracción, repulsión o falta de crecimiento fue calculada. El PT y el Hid/SEMA3C promovieron principalmente un efecto de atracción; en contraste, el Ist y el Hid/PC indujeron principalmente repulsión (A). El radio P/D fue obtenido para todas las condiciones, PT e Hid/SEMA3C arrojaron un valor superior a uno que indica atracción, mientras que con Ist e Hid/PC se obtuvieron valores inferiores a uno, indicando repulsión. No se observaron diferencias significativas entre PT e Hid/SEMA3C (B). El largo de los axones fue similar en todas las condiciones (C). Promedio \pm el error estándar * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, ANOVA de una vía, prueba Tukey de comparaciones múltiples.

La SEMA3C liberada por el hidrogel promueve el crecimiento axonal en NDA de roedor

Para evaluar si la SEMA3C liberada por el hidrogel era capaz de incrementar la longitud axonal de las NDA, se utilizaron dispositivos de microfluidos comerciales diseñados para evaluar la respuesta de los axones a moléculas solubles. Las cámaras de crecimiento contienen dos lados que están

separados por una serie de microcanales de 900 μm de largo (Figura 13); se ha establecido que solo los axones son capaces de crecer esta distancia ^{154,155}. Un lado de la cámara debe contener el doble de medio que el otro para crear una fuerza hidrostática que permita el movimiento de moléculas solubles en una sola dirección, del compartimento axonal al compartimento celular (Figura 13). Como se indica en el esquema, se sembraron NDA en el compartimento celular y la SEMA3C se colocó en el compartimento axonal. Una característica importante que tienen estos dispositivos es que debido a la presencia de los microcanales los axones siguen una trayectoria en línea recta ¹⁵⁶, en contraste a los ensayos donde se emplean matrices en tres dimensiones como los geles de colágena. Se cuantificó la longitud axonal de las NDA provenientes de la disociación del Mv después de la exposición por 5 días a diferentes tratamientos: (1) medio solo, (2) medio con SEMA3C soluble a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, (3) hidrogel acoplado a la PC conjugado inicialmente a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ (4) e hidrogel acoplado a SEMA3C con concentración para gelificación de 200 $\mu\text{g/ml}$. La tinción con calceína permite visualizar células vivas, lo que, reveló que las neuronas tienden a agruparse en cúmulos y que la densidad celular fue similar en todas las condiciones. Se puede apreciar que algunos axones entran a los microcanales y cruzan hacia el compartimento axonal (Figura 14).

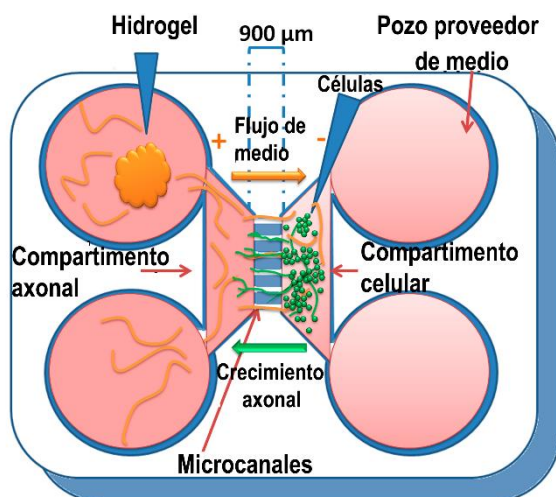


Figura 13. Esquema de las condiciones de cultivo en las cámaras de crecimiento. La cámara está dividida en su parte central por una serie de microcanales. De un lado de la cámara se sembraron las células, mientras que en el otro se colocaron los tratamientos. El flujo de medio va del lado izquierdo hacia donde se encuentran las células mientras que, el crecimiento axonal se da en sentido contrario.

La inmunotinción para β III tubulina y TH permitió identificar los axones de las NDA.

La cantidad de axones dopaminérgicos que cruzaron los microcanales fueron significativamente diferentes en la condición de medio con respecto a la de SEMA3C disuelta en el medio. En la condición control, en promedio 2 microcanales por cámara presentaban axones TH+ que cruzaban los 900 μ m (longitud de los canales). En contraste, en la condición con SEMA3C disuelta en el medio, en promedio 8 microcanales presentaban axones TH+ cruzando (Figura 14). Adicionalmente se observó que se incrementó el número y la longitud de las ramificaciones al salir de los microcanales, comparado con la condición control (Figura 14). El hidrogel combinado con la PC indujo un crecimiento axonal similar al observado en la condición solamente con medio. De manera opuesta, la SEMA3C acoplada con el hidrogel provocó que una mayor cantidad de axones cruzaran, además de una mayor complejidad en las ramificaciones (Figura 14).

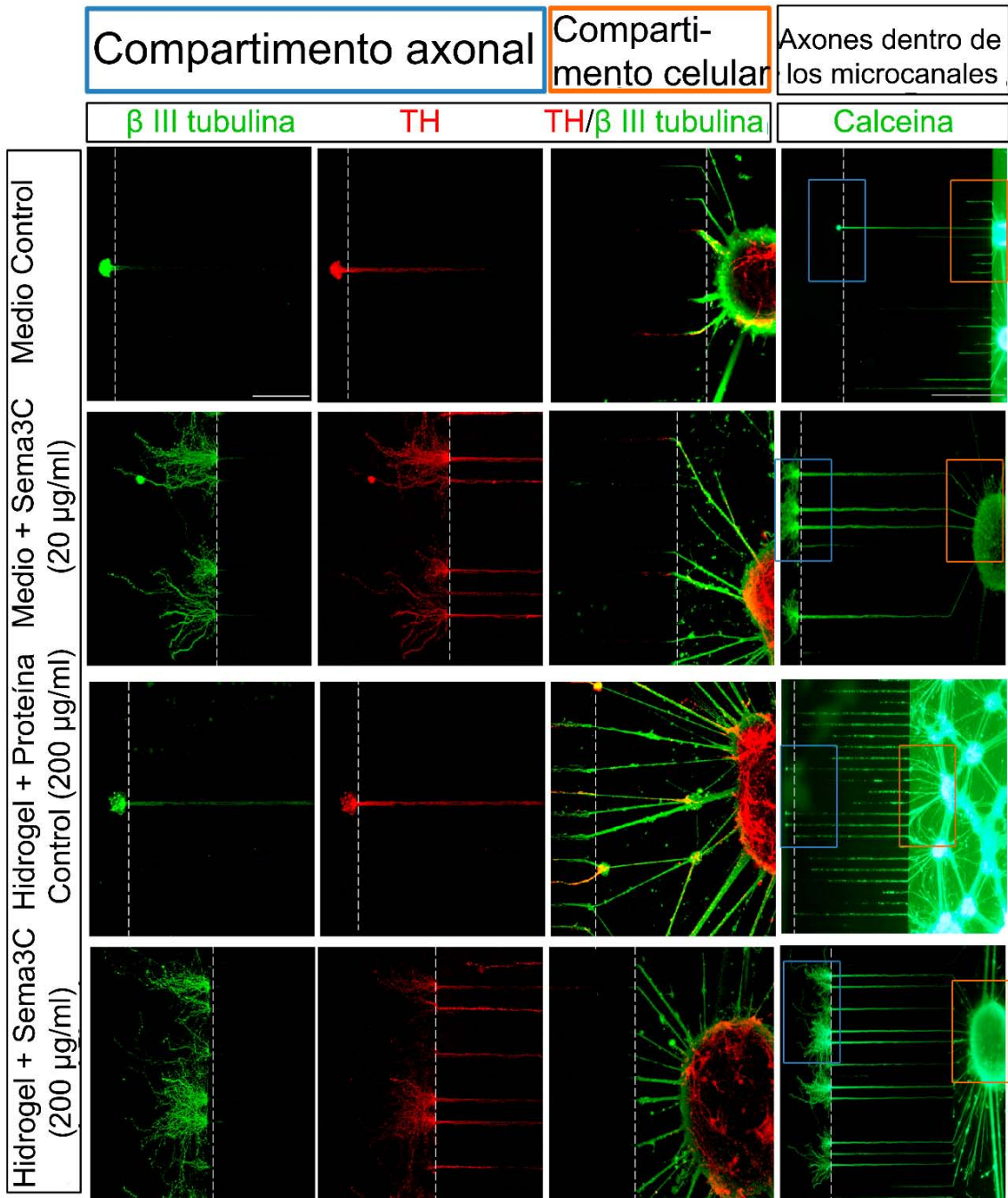


Figura 14. El hidrogel con SEMA3C incrementa el crecimiento axonal de las NDA de roedor. Mediante inmunotinciones para TH y β III tubulina se observó que en todas las condiciones los axones dopaminérgicos cruzaron los microcanales hasta el compartimento axonal. Sin embargo, en las condiciones de SEMA3C soluble e Hidrogel + SEMA3C, la cantidad de axones que cruzaron fue mayor, comparado con las condiciones de medio solo y la de hidrogel con proteína control. En el compartimento celular se muestra que la densidad de NDA fue similar en todas las condiciones. En el panel de la derecha se muestra, mediante tinciones con Calceína, que la proporción de axones que entraron a los microcanales fue similar en todas las condiciones antes de

fijar las células. Barras de escala: 100 μm para las imágenes con inmunotinciones, 300 μm en las imágenes con calceína.

Para cuantificar la longitud de los axones TH⁺ de las NDA que entraban, cruzaban y salían de los microcanales se utilizó el software ImageJ. Considerando todos los axones que lograron entrar a los microcanales, las condiciones de SEMA3C soluble y SEMA3C acoplada al hidrogel indujeron axones dopaminérgicos de mayor longitud al compararse con las condiciones control (Figura 15). La CP acoplada al hidrogel generó una mayor longitud de axones TH⁺ comparado con el medio solo. Sin embargo, es importante resaltar que el hidrogel con la SEMA3C provocó un incremento en la longitud axonal 1.6 veces mayor que el hidrogel con la PC. La cantidad de axones que entraron a los microcanales en todos los grupos fue similar (Figura 15).

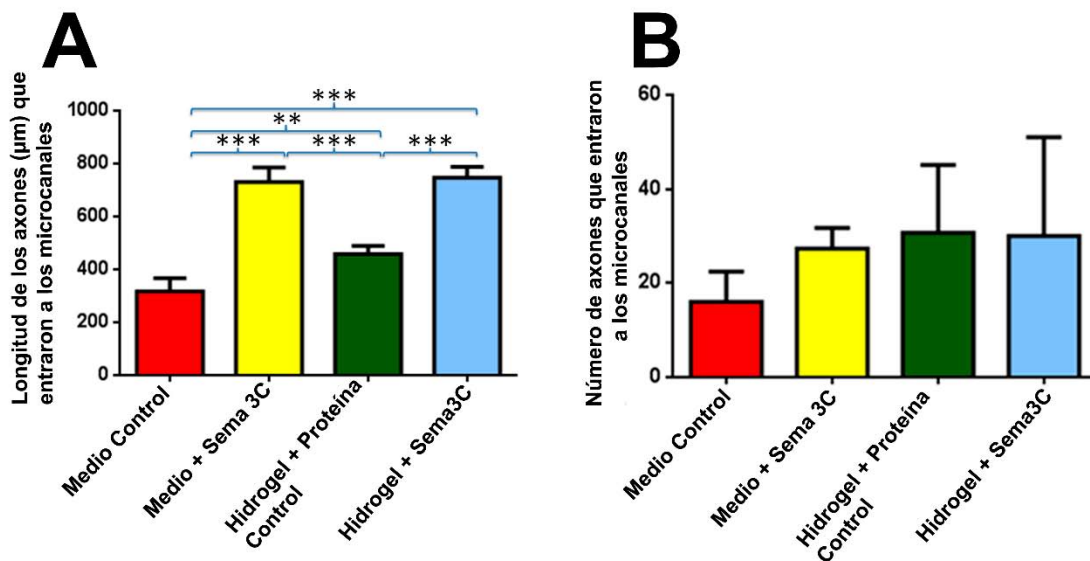


Figura 15. La SEMA3C liberada por el hidrogel incrementa el crecimiento axonal de NDA en la misma proporción que la SEMA3C soluble. Cuantificación de la longitud axonal dopaminérgica. La longitud de los axones de NDA del Mv de rata se incrementa cuando son expuestos al hidrogel acoplado con la SEMA3C o a la SEMA3C soluble; no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. El medio control e hidrogel con proteína control indujeron un crecimiento axonal significativamente menor comparado con las 2 condiciones con SEMA3C (A). El número de axones dopaminérgicos que entraron en los microcanales fue similar en todas las condiciones (B). **p < 0.01; ***p < 0.001, ANOVA de una vía, prueba Tukey de comparaciones múltiples.

Las NDA diferenciadas de las hESC expresan los receptores NRP1 y NRP2

Se diferenciaron hESC de la línea H9 que expresaban de manera constitutiva la GFP de acuerdo con protocolos previamente establecidos ¹⁰⁹. Implementando este protocolo, después de 28 días se obtuvieron 36.6 % de neuronas TH+, y esta proporción se incrementó a 46.6% para el día 35 de diferenciación. Se realizó la inmunotinción para determinar si las NDA diferenciadas expresaban los receptores NRP1 o NRP2. Las tinciones se realizaron en las mismas células utilizadas para los ensayos en las cámaras de crecimiento descritos a continuación. Al día 28 de diferenciación, se observó que 86% de las neuronas TH+ mostraron reactividad para el anticuerpo de NRP1 y 87.6% para el de NRP2. Esta proporción se incrementó ligeramente para el día 35, ya que hubo una co-expresión TH-NRP1 de 88.8% mientras que para TH-NRP2 hubo un doble marcaje de 90% (Figura 16).

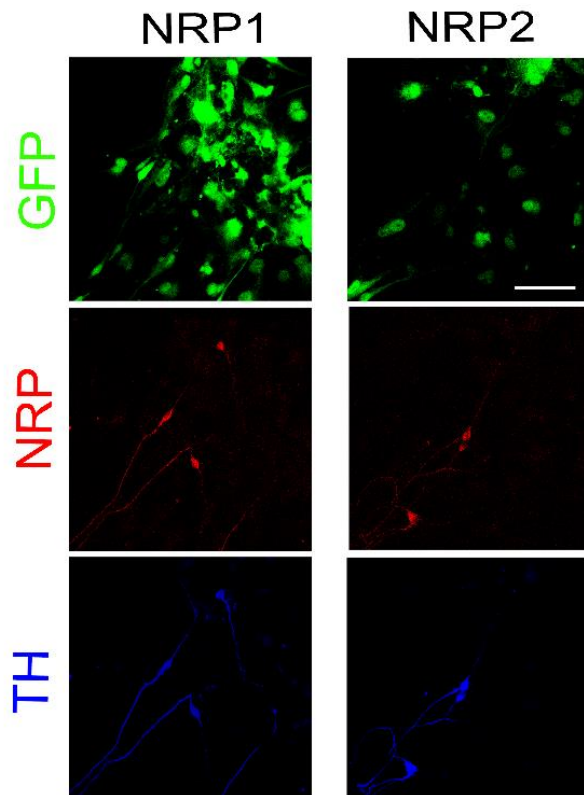


Figura 16. Las neuronas dopaminérgicas diferenciadas de hESC expresan los receptores NRP1 y NRP2 en una alta proporción. Inmunotinciones con anticuerpos específicos para TH y los receptores NRP1 y NRP2 muestran que las NDA del día 35 de diferenciación presentan una alta proporción de células positivas para NRP1 y NRP2. Se muestra también la fluorescencia de GFP para indicar la densidad celular.

La SEMA3C liberada por el hidrogel induce un crecimiento axonal dopaminérgico en neuronas diferenciadas a partir de hESC

A los 21 días de diferenciación, las células en diferenciación dopaminérgica fueron disociadas y resembradas en las cámaras de crecimiento axonal. Inmunotinciones para β III tubulina y TH mostraron que los tratamientos con la SEMA3C soluble o SEMA3C acoplada al hidrogel promovieron una mayor cantidad de axones, así como de una longitud superior, en contraste con los tratamientos de medio solo e hidrogel acoplado a la PC (Figura 17). En el compartimento celular, la densidad de las neuronas positivas a TH y β III tubulina fue similar en todas las condiciones. La columna de la derecha de la Figura 17 muestra imágenes de la GFP a bajo aumento. Se puede apreciar que la proporción de los axones que entran en los microcanales fue similar en todos los grupos experimentales. Los recuadros naranjas y azules corresponden al compartimento celular y axonal, respectivamente.

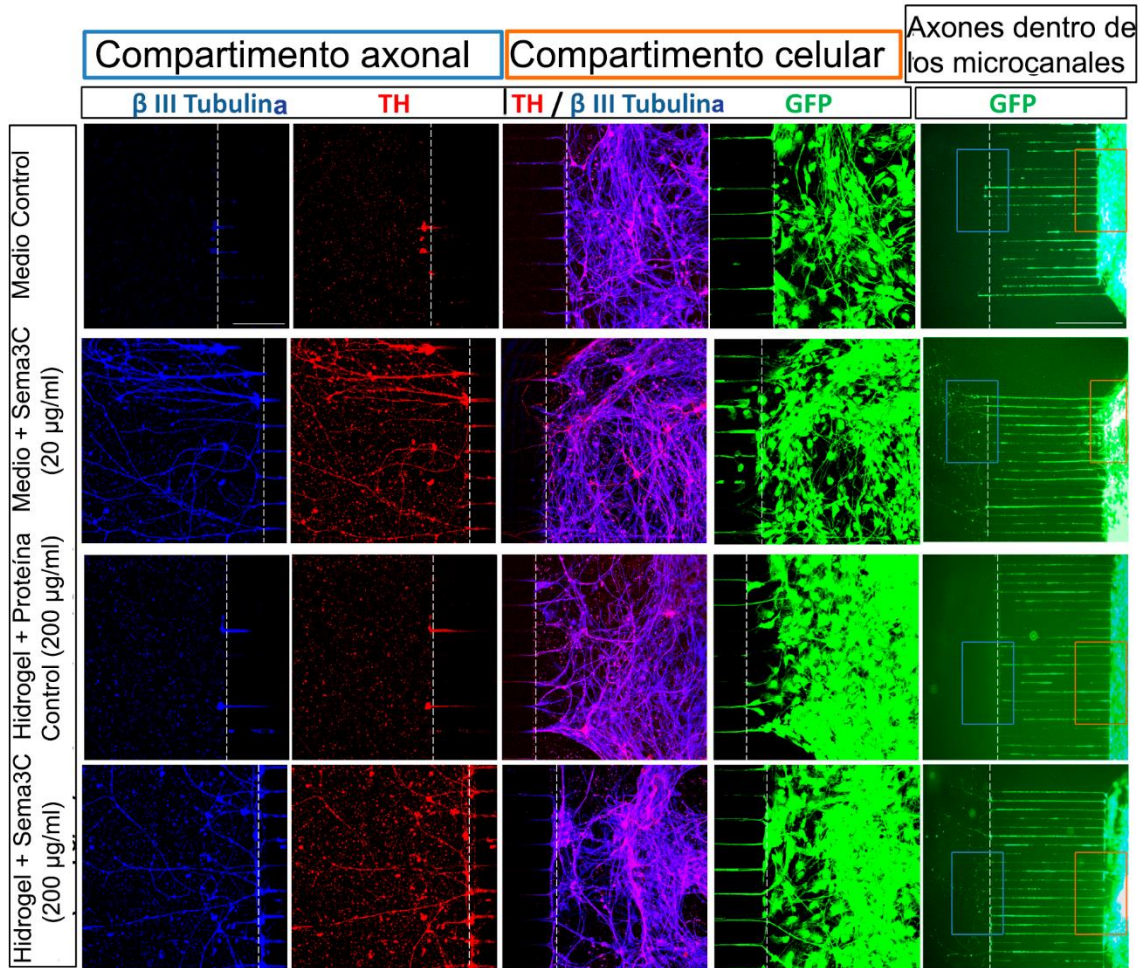


Figura 17. El hidrogel con SEMA3C incrementa el crecimiento axonal de las NDA diferenciadas de hESC. Mediante inmunotinciones para TH y β III Tubulina se observó que en todas las condiciones los axones dopaminérgicos cruzaron los microcanales hasta alcanzar el compartimento axonal. Sin embargo, en las condiciones de SEMA3C soluble e Hidrogel + Semaforina 3C la cantidad de axones que cruzaron fue superior, al compararse las condiciones de medio solo e hidrogel con proteína control. En el compartimento celular se muestra que la densidad de células positivas a GFP fue similar en todas las condiciones. Adicionalmente, la proporción de neuronas TH+ fue similar en todas las condiciones. En el panel de la derecha se muestra mediante tinciones con calceína que la proporción de axones que entraron a los microcanales fue similar en todas las condiciones. Barras de escala: 100 μ m para las imágenes con inmunotinciones, 300 μ m en las imágenes con calceína.

Similar a los resultados obtenidos con las células del Mv de ratas, la longitud axonal fue significativamente mayor en los grupos de SEMA3C soluble y SEMA3C acoplada al hidrogel en comparación con las condiciones control (Figura 18). La cantidad de axones que entraron a los microcanales fue similar en todos los grupos (Figura 18).

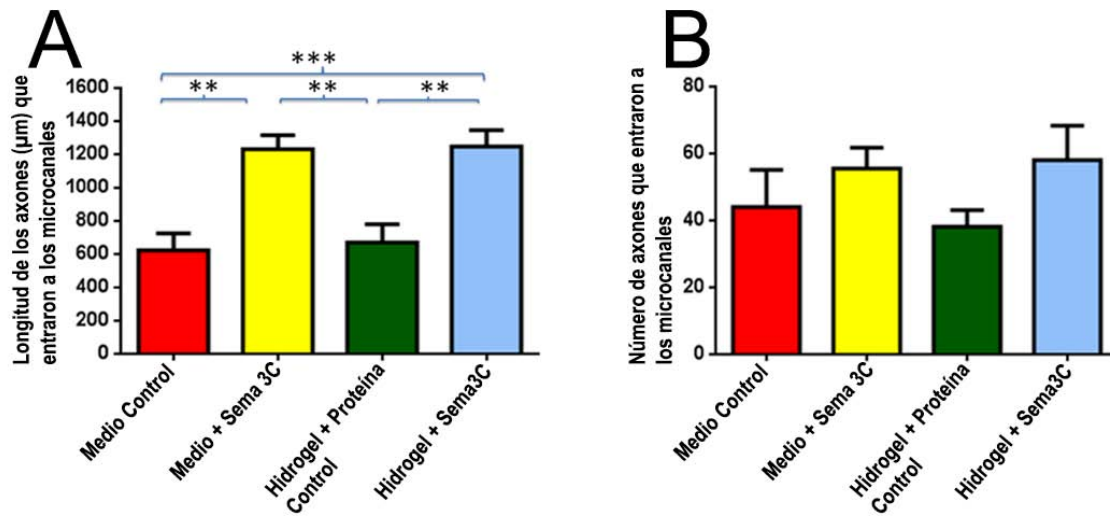


Figura 18. La SEMA3C liberada por el hidrogel incrementa el crecimiento axonal de NDA en la misma proporción que la SEMA3C soluble. La longitud de los axones de NDA diferenciadas de hESC incrementa cuando son expuestos al hidrogel acoplado con la SEMA3C o bien se incuban con SEMA3C soluble. El medio control e hidrogel con proteína control indujeron un crecimiento axonal significativamente menor comparado con las condiciones con SEMA3C (A). El número de axones que entraron en los microcanales fue similar en todas las condiciones (B). $**p < 0.01$; $***p < 0.001$, ANOVA de una vía, prueba Tukey de comparaciones múltiples.

Discusión

Uso de los Hidrogeles para promover regeneración axonal

Diversos grupos de investigación han demostrado que los hidrogeles son un sustrato adecuado para el crecimiento de diversos tipos neuronales ^{126,130}. Cuando estos polímeros han sido implantados en cerebros de roedores o primates no han generado rechazo alguno ^{131,134,135,157}. Adicionalmente, tienen la capacidad de embeber en su estructura diferentes tipos de moléculas y liberarlas al medio ^{127,137,139,141}. Los hidrogeles son muy versátiles ya que, al modificar parámetros como su concentración se puede manipular la rigidez del polímero después de la gelificación. Esto influye en la adhesión y crecimiento celular. Algunas células como las neuronas prefieren sustratos blandos, mientras que otras crecen mejor en sustratos rígidos. Al cambiar la densidad del polímero también se modifica su capacidad para liberar las moléculas contenidas en su interior. Al estar inicialmente en una fase líquida, los hidrogeles pueden ser manipulados para que transcurrido el proceso de gelificación adopten la forma que se requiera. Por ejemplo, pueden llenar cavidades irregulares en el tejido a diferencia de otros polímeros rígidos. También, a diferencia de otros polímeros los hidrogeles poseen una combinación de características deseables para su utilización *in vitro* e *in vivo* para el crecimiento axonal ¹²⁸. Inicialmente se utilizaron polímeros rígidos para la promoción del crecimiento axonal en el sistema nervioso periférico. Principalmente se utilizaron sistemas tubulares para guiar y proteger el crecimiento de los axones ¹²⁸. Sin embargo, debido a las características físicas y químicas de estos polímeros no fueron compatibles con la viabilidad y el crecimiento neuronal. Por ejemplo, conductos de silicon ¹⁵⁸, canales del copolímero poliacrilonitrilo:polivinilcloruro ¹⁵⁹, conductos de colágeno y politetrafluoroetileno ¹⁶⁰ y canales de fluoruro de polivinilideno ¹⁶¹. Es por ello que los hidrogeles son una alternativa viable para la promoción del crecimiento axonal. Esto pudiera ser aplicado a distintas patologías o lesiones en

donde se requiera la re-inervación de axones. Por ejemplo, en la EP, en la cual se requiere que axones dopaminérgicos inerven el estriado, o en lesiones en las que los nervios han sido transectados, como lesiones de médula espinal por accidentes. Cuando ocurren lesiones en el SNC, se desencadenan una serie de eventos que tienen como la finalidad evitar que el daño se expanda a regiones adyacentes que no han sido afectadas ¹²⁸. Sin embargo, se forman cicatrices que constituyen barreras para el crecimiento axonal como la glial ^{56,57} o la fibrosa ⁵⁷, y se expresan moléculas como los proteoglicanos de condroitin sulfato neurocano, brevicano y versicano que inhiben el crecimiento de los axones ^{58,162}. Al administrar los hidrogeles, se puede proporcionar un substrato adecuado para el crecimiento axonal; adicionalmente, se pueden utilizar a estos polímeros para que liberen moléculas que promuevan la viabilidad neuronal o induzcan crecimiento axonal de un tipo en particular de neuronas. Estos aspectos se describen con mayor profundidad en una revisión que se publicó durante mi estancia doctoral ¹²⁸.

Liberación de la SEMA3C por el hidrogel

En este trabajo se demostró que el hidrogel PuraMatrix es capaz de embeber la proteína recombinante humana SEMA3C y liberarla al medio, se mantuvieron niveles constantes de liberación por al menos 28 días. Previamente se ha reportado que este hidrogel es capaz de incorporar y liberar diferentes moléculas como el factor de crecimiento básico de fibroblastos, el factor de crecimiento vascular endotelial, BDNF, albúmina de suero bovina, inmunoglobulina G e insulina ^{142,163,164}. Nuestros resultados confirman que las proteínas liberadas por este hidrogel son funcionales, ya que estas ejercen la función esperada *in vitro* ^{142,163}. Estas proteínas tienen un peso molecular entre los 7 y 38 kDa; la SEMA3C posee una masa mucho mayor (82 kDa), a pesar de ello

aún puede ser liberada por el hidrogel. Nuestros resultados muestran que el hidrogel PuraMatrix pueden embeber y liberar proteínas de mayor peso molecular a lo reportado anteriormente.

La SEMA3C liberada por el hidrogel dirige el crecimiento axonal dopaminérgico

En un estudio previo se demostró *in vitro* utilizando una matriz de colágena similar a la que se usó en este trabajo, que los axones de las NDA diferenciadas de ESC embrionarias de ratón son atraídos por SEMA3C liberada por células HEK ⁶⁴. Durante el desarrollo embrionario diversas moléculas secretadas por distintas estructuras guían el crecimiento axonal dopaminérgico que dará lugar a la vía nigro-estriatal en la etapa adulta. Se ha demostrado que durante los días embrionarios E12.5-14.5 los axones dopaminérgicos provenientes del Mv se dirigen a la región embrionaria del PT ⁶⁴. Esta evidencia sugiere que esta región atrae el crecimiento axonal de las NDA del Mv. Se ha demostrado mediante hibridaciones *in situ* en embriones de rata que durante el direccionamiento axonal dopaminérgico (E12.5) se expresa la SEMA3C en el PT ⁶⁴, por lo que esta proteína podría estar involucrada en la atracción de los axones dopaminérgicos. El presente estudio demostró que la región embrionaria del PT induce un efecto de atracción axonal de las NDA. Se ha descrito que la región del Ist no atrae el crecimiento axonal dopaminérgico ⁶⁴. En este trabajo se observó que los axones no son atraídos por esta región, lo que concuerda con los resultados de trabajos anteriores. Interesantemente, cuando los explantes de Mv se cultivaron con fragmentos de hidrogel que habían sido conjugados previamente durante el proceso de gelificación con la SEMA3C, se observó un efecto de atracción axonal dopaminérgica. Nuestros resultados indican que la SEMA3C liberada por el hidrogel promueve un efecto de atracción muy similar a la región embrionaria del PT. Adicionalmente, esto confirmaría que la SEMA3C es la responsable de la atracción axonal dopaminérgica de las neuronas del Mv. Contrariamente, los hidrogeles que contenían la PC no

indujeron un cambio en la dirección axonal, el efecto fue muy similar al obtenido en los co-cultivos de Mv con el Ist. El ensayo de direccionamiento axonal en geles de colágena ha sido utilizado por otros grupos para evaluar el efecto quimio-trópico de moléculas guía sobre axones dopaminérgicos. Por ejemplo, se ha identificado que la proteína Netrina-1 induce la atracción axonal de NDA ^{8,66,165}. Esto indica que este tipo de ensayos son lo suficientemente sensibles para evaluar el direccionamiento axonal; además de que son varias moléculas guía las que estarían dirigiendo el crecimiento axonal de las NDA del Mv.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en el que se demuestra que la liberación de una molécula por un hidrogel es capaz de guiar el crecimiento axonal de NDA. Algunos estudios previos han demostrado que es posible inducir la atracción axonal utilizando hidrogeles; sin embargo, para ello es necesario combinarlos con partículas que sean capaces de liberar moléculas. A diferencia de nuestro trabajo, estos estudios usan el hidrogel únicamente como matriz y no como agente liberador. Por ejemplo, se promovió la atracción axonal *in vitro* de neuronas diferenciadas a partir de ESC utilizando un hidrogel de PEG combinado con partículas biodegradables de ácido Poli-lactico-co-glicolico, las cuales liberaron el factor de crecimiento similar a insulina ¹⁶⁶. Otro trabajo demostró un incremento de la longitud axonal de neuronas del sistema nervioso periférico mediante la exposición del factor de crecimiento nervioso (NGF), el cual fue liberado por partículas de ácido poli-lactico-co-glicolico embebidas en una matriz combinada de colágena e hidrogel de agarosa ¹⁶⁷.

Por otra parte, durante el desarrollo embrionario el direccionamiento axonal está dado por la interacción de diferentes moléculas a la vez, en ocasiones estas ejercen efectos contrarios. La implementación de una estrategia experimental que permita evaluar distintas moléculas a la vez sería capaz de brindar valiosa información. Recientemente, se ha diseñado un sistema *in vitro* que permite evaluar la respuesta axonal ante diferentes moléculas de manera simultánea. Este dispositivo se basó en contener proteínas inmovilizadas así como solubles con diferentes gradientes,

en este estudio se evaluó el efecto de la SEMA6A y NGF en el crecimiento axonal de neuronas del ganglio de la raíz dorsal ¹⁶⁸. La SEMA6A indujo un efecto de repulsión en las neuritas de neuronas sensoriales de la región lumbosacral, sin embargo, no fue así para otras regiones espinales; adicionalmente se observó que el NGF podía atenuar este efecto. Aplicar un sistema similar al estudio de las NDA podría ayudar a entender de mejor manera la guía axonal, esto se reflejaría en el desarrollo de mejores estrategias para re-inervar el estriado en modelos animales de la EP.

La SEMA3C liberada por el hidrogel incrementa la longitud axonal dopaminérgica

Los geles de colágena previamente han sido utilizados para evaluar el crecimiento axonal ¹⁸. En esta matriz los axones son capaces de crecer en todas direcciones, aunque esto favorece estudiar el direccionamiento axonal, se dificulta cuantificar con exactitud la longitud ya que el crecimiento ocurre en diferentes planos. Debido a esto, aunque se utilicen programas computacionales especializados la medición no es exacta. Para abordar este problema metodológico, en este estudio se decidió utilizar las cámaras de crecimiento axonal, en las que como se detalló en la sección de métodos, los axones crecen en línea recta y en un solo plano. La trayectoria que siguen los axones durante su crecimiento *in vitro* es no lineal, generalmente es en forma ramificada. Cuando los axones entran a los microcanales se obliga a los axones a crecer en una trayectoria recta. Por otra parte, los axones *in vivo* crecen en diferentes planos para encontrar su sitio blanco, esto se reproduce al estar en una matriz en tres dimensiones, esto dificulta dar seguimiento a la trayectoria de los axones. En las cámaras de crecimiento, los axones crecen sobre un sustrato en dos dimensiones lo que induce que los axones crezcan en un solo plano.

Los dispositivos de microfluidos han sido utilizados para evaluar la respuesta axonal a diferentes moléculas solubles ^{154,155}.

En el presente trabajo, se evaluaron los efectos de la molécula guía SEMA3C utilizando dispositivos de microfluidos, con los cuales se permite identificar de manera inequívoca los axones en crecimiento. Usando NDA provenientes de roedores y diferenciadas de hESC, observamos un incremento en la longitud axonal al exponerlas al hidrogel conjugado con la SEMA3C, similar al que se presentó cuando la SEMA3C soluble se encontraba presente. Es por ello que podemos afirmar que la SEMA3C liberada por el hidrogel PuraMatrix, es igualmente funcional que la forma soluble de la proteína en términos de crecimiento axonal, aunque se utilizó una concentración diez veces mayor en el hidrogel. El tiempo necesario para observar el crecimiento axonal fue distinto en ambos tipos celulares, para las NDA de roedor fue de 5 días, mientras que, para las de humano fue de 15 días. Posiblemente, esto sea el reflejo de lo que ocurre *in vivo*. En embriones de rata la aparición de las NDA en el Mv ocurre al E12.5, y se ha observado que para el E15.5 las proyecciones dopaminérgicas llegan a la región que formará al estriado en la etapa adulta ⁶⁴. Por otra parte, en un estudio se obtuvieron 29 cerebros embrionarios humanos y se observó la aparición de NDA en el Mv a las 6.5 semanas, mediante tinciones de TH se demostró que los axones dopaminérgicos llegan al putámen en desarrollo a las 9 semanas de gestación ¹⁶⁹. Mientras que las NDA del Mv de roedor les toma 3 días alcanzar su zona blanco, las de humano tardan aproximadamente 18 días, seis veces más, en nuestro trabajo las NDA tardaron tres veces más en crecer en comparación con las de roedor.

Los resultados obtenidos señalan que el hidrogel fungió como un vector adecuado de SEMA3C ya que preserva la liberación de manera constante dentro de ese intervalo de tiempo.

Los dispositivos de microfluidos han sido empleados previamente para aislar axones de neuronas diferenciadas de hESC, monitorear el movimiento mitocondrial a través de los axones ¹⁷⁰, para evaluar daños en el axón, regeneración y transporte ¹⁵⁵, estudiar la diferenciación y la entrada de axones a los microcanales ¹⁷¹ e identificar la comunicación bidireccional entre neuronas motoras y

células musculares¹⁷². Otros dispositivos de microfluidos con diferentes características en su diseño, han sido utilizados para generar gradientes químicos y evaluar la respuesta de conos de crecimiento¹⁷³. Datos previos de nuestro grupo demostraron que la SEMA3C aumenta el crecimiento axonal *in vitro*¹⁸ de NDA obtenidas de la diferenciación de ESC de roedor. Este es el primer reporte que indica que este efecto puede ser obtenido en NDA provenientes de hESC. Esto sugiere mecanismos similares de respuesta a la SEMA3C en ambas especies. Nuestra investigación también indica que los protocolos de diferenciación de ESC a NDA para células de roedor usado previamente¹⁷⁴ y el utilizado en este trabajo para células humanas son capaces de generar neuronas que responden de manera similar a la señalización por SEMA3C¹⁰⁹.

Las hESC expresan los receptores NRP1 y NRP2

Por otra parte, la respuesta de las NDA humanas a SEMA3C correlaciona con el alto porcentaje en la co-expresión de los receptores NRP1 y 2 en las neuronas TH+ obtenidas. Previamente, se ha demostrado la expresión de los receptores para SEMA3C NRP1 y NRP2 en NDA obtenidas del Mv de ratas en desarrollo y de la diferenciación de ESC de ratón. Ambos tipos celulares mostraron una proporción similar en la co-expresión de células TH+ con los receptores NRP1 (77% en rata, 82% ratón) y NRP2 (48% en rata, 59% ratón). El bloqueo de estos receptores mediante anticuerpos neutralizantes inhibe el efecto de atracción y de promoción en el crecimiento axonal de las NDA cuando son expuestas a SEMA3C¹⁸. Fue de nuestro interés evaluar si las NDA obtenidas de hESC expresaban también estos receptores, ya que previamente no había reportes de ello. Nuestros resultados demostraron que aproximadamente 90% de las NDA derivadas de las ESC presentaban inmno-reactividad para los anticuerpos anti-NRP1 y NRP2. Esto sugiere que los efectos de atracción y promoción del crecimiento axonal por la SEMA3C están mediados por ambos receptores.

Conclusiones

En este trabajo se demostró que el hidrogel PuraMatrix puede embeber y liberar constantemente a la proteína SEMA3C *in vitro* por al menos por 28 días.

La SEMA3C liberada por el hidrogel atrae el crecimiento axonal de NDA de roedor, similar a la región de PT, en geles de colágena.

Las NDA diferenciadas de hESC expresan en una alta proporción los receptores NRP1 y 2, necesarios para que ocurra la señalización por SEMA3C en NDA diferenciadas de ESC de roedor.

Adicionalmente, la SEMA3C liberada por el hidrogel promueve un incremento en la longitud axonal de NDA de roedor y diferenciadas de hESC, en una proporción similar a SEMA3C soluble en el medio.

Ambos tipos de NDA respondieron a la señalización por SEMA3C en un patrón similar.

Este es el primer reporte que indica que un hidrogel puede ser usado como vector de una molécula guía para incrementar y guiar el crecimiento axonal.

Perspectivas

Uso del hidrogel para promover y guiar el crecimiento dopaminérgico in vivo

En lo correspondiente al uso de las NDA en modelos animales de la EP, se sabe que el trasplante de estas neuronas en el estriado de ratas parkinsonicas induce una recuperación en la conducta de giro inducida por apomorfina o anfetamina ^{74,174–178}. Sin embargo, este trasplante ectópico induce complicaciones conductuales, por ejemplo, un incremento en las dicinesias inducidas por levodopa ^{179,180}. Además, en pacientes con Parkinson el trasplante en el estriado ha demostrado no causar una recuperación consistente ^{54,55}. Posiblemente, una causa de esta inconsistencia en los resultados,

es que las neuronas no se encuentran en la SN, su nicho fisiológico, por lo que no estarían las señales que permitan su regulación, por ejemplo, las aferencias o las moléculas del microambiente.

Una alternativa al trasplante ectópico, sería trasplantar a las NDA en la SN y guiar su crecimiento axonal para alcanzar el estriado dorsal. Esto debido a que el cerebro adulto es un ambiente poco propicio para el crecimiento axonal, ya que, muchas de las señales que favorecen y guían el crecimiento únicamente se expresan durante el desarrollo y un par de semanas en la etapa postnatal ¹⁸¹. Datos previos de nuestro grupo han demostrado que un trasplante intra-nigral de NDA derivadas de ESC de ratón, combinado con el trasplante de células HEK transfectadas para liberar SEMA3C en una trayectoria entre la SN y el estriado inducen una recuperación conductual en ratas parkinsonicas después de tres semanas ⁷⁴. En el presente trabajo, se demostró que la liberación de la SEMA3C por el hidrogel se mantuvo constante por lo menos 4 semanas, es por ello que podemos especular que el PuraMatrix podría reemplazar a las células HEK en la promoción y guía del crecimiento axonal *in vivo*. El reemplazar a las células HEK con este hidrogel, evitaría la introducción de células ajenas al SNC al cerebro, lo cual sería indeseable si se piensa que esta estrategia se utilice algún día en la clínica.

El hidrogel empleado en este trabajo ha sido implantado previamente en el cerebro de roedores sin mostrar alguna reacción glial adversa ^{124,134,182}. Esta característica es importante, ya que otros hidrogeles son capaces de embeber y liberar proteínas, sin embargo, al ser implantados en el cerebro generan una reacción de rechazo, la cual desencadena una serie de eventos que impide el crecimiento axonal ¹²⁸. Por ejemplo, en un hidrogel de PEG acoplado a partículas de sílice se embebió la proteína SEMA3A, la cual induce un incremento en el crecimiento axonal de NDA *in vitro*, sin embargo, cuando este hidrogel fue implantado en cerebro de rata, se produjo una severa reacción glial ¹³³. Nuestros resultados y el de otros grupos, sugieren que el hidrogel PuraMatrix podría ser

utilizado como vector para liberar moléculas *in vivo*, en nuestro caso, nos interesaría la liberación de la SEMA3C en un modelo animal de la EP para promover el crecimiento axonal dirigido de NDA derivadas de hESC.

Uso del hidrogel para promover y guiar el crecimiento dopaminérgico liberando otras moléculas guía

Como se describió en la introducción, además de la SEMA3C, otras moléculas son capaces de guiar el crecimiento axonal de las NDA de la SN. Por ejemplo, SEMA3F^{64,70} y Slit-2 repele el crecimiento axonal dopaminérgico, mientras que netrina-1 lo atrae⁸. Además de SEMA3C, pudieran embeberse en el hidrogel alguna de estas moléculas para guiar el crecimiento axonal dopaminérgico.

Uso del hidrogel para promover y guiar el crecimiento dopaminérgico usando una combinación de moléculas guía

Una alternativa para guiar el crecimiento axonal sería la combinación de diferentes moléculas guía, lo cual simularía en mayor medida lo que sucede *in vivo*. Pudieran utilizarse moléculas que atrajeran el crecimiento axonal dopaminérgico, y por otro lado moléculas que lo repelen. Las moléculas que lo atraen se pudieran colocar en la región en la que se desea que lleguen los axones, mientras que las moléculas repelentes a los costados de la trayectoria que se desea que los axones realicen, con la finalidad de que estos no se desvíen.

Bibliografía

1. Goldberg, J. L. How does an axon grow? *Genes Dev* **17**, 941–958 (2003).
2. Lowery, L. A. & Vactor, D. Van. The trip of the tip : understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 332–343 (2009).
3. Mogilner, A. On the edge : modeling protrusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 32–39 (2006).
4. Aylor, T. Microtubule reorganization is obligatory for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15221–15226 (1996).
5. Flynn, K. C., Pak, C. W., Shaw, A. E., Bradke, F. & Bamberg, J. R. Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Dev. Neurobiol.* **69**, 761–779 (2009).
6. Goldberg, J. L. *et al.* Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron* **33**, 689–702 (2002).
7. Campbell, D. S. & Holt, C. E. Chemotropic Responses of Retinal Growth Cones Mediated by Rapid Local Protein Synthesis and Degradation. *Neuron* **32**, 1013–1026 (2001).
8. Lin, L., Rao, Y. & Isacson, O. Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 547–555 (2005).
9. Nash, M., Pribiag, H., Fournier, A. E. & Jacobson, C. Central nervous system regeneration inhibitors and their intracellular substrates. *Mol Neurobiol* **40**, 224–235 (2009).
10. Dickson, B. J. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science.* **298**, 1959–64 (2002).
11. Koh, C. Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neuro Signals* **15**, 228–237 (2007).
12. Pertz, O. C. *et al.* Spatial mapping of the neurite and soma proteomes reveals a functional Cdc42/Rac regulatory network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1931–1936 (2008).
13. Mallavarapu, A. & Mitchison, T. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol.* **146**, 1097–1106 (1999).
14. Tanaka, E. & Kirschner, M. W. The role of microtubules in growth cone turning at substrate boundaries. *J. Cell Biol.* **128**, 127–137 (1995).
15. Battum, E. Y. Van, Brignani, S. & Pasterkamp, R. J. Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* **14**, 532–546 (2015).
16. Killeen, M. T. & Sybingco, S. S. Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev. Biol.* **323**, 143–151 (2008).
17. Luo, Y., Raible, D. & Raper, J. A. Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* **75**, 217–227 (1993).
18. Tamariz, E. *et al.* Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to

- semaphorins 3A and 3C. *J. Neurosci. Res.* **88**, 971–980 (2010).
19. Onishi, K., Hollis, E. & Zou, Y. Axon guidance and injury-lessons from Wnts and Wnt signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* **27**, 232–240 (2014).
 20. Murray, L. M., Talbot, K. & Gillingwater, T. H. Review: Neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **36**, 133–156 (2010).
 21. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
 22. Murray, L. M. *et al.* Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 949–962 (2008).
 23. Reeve, A., Simcox, E. & Turnbull, D. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res. Rev.* **14**, 19–30 (2014).
 24. Arenas, E. Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 152–156 (2010).
 25. Salat, D. & Tolosa, E. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: Current status and new developments. *J. Parkinsons. Dis.* **3**, 255–269 (2013).
 26. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6469–73 (1998).
 27. Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. & Seitelberger, F. Brain dopamine and the syndromes of parkinson and huntington. *J. Neurol. Sci.* **20**, 415–455 (1973).
 28. Herkenham, M. *et al.* Selective Retention of MPP⁺ Within the monoaminergic systems of the primate brain following MPTP administration: an in vivo autoradiographic study. *Neuroscience* **40**, 133–158 (1991).
 29. Wu, D. *et al.* NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6145–6150 (2003).
 30. Marsden, C. D. Parkinson's disease. *Postgrad. Med. J.* **68**, 538–43 (1992).
 31. Li, H. T., Du, H. N., Tang, L., Hu, J. & Hu, H. Y. Structural transformation and aggregation of human α -synuclein in trifluoroethanol: Non-amyloid component sequence is essential and β -sheet formation is prerequisite to aggregation. *Biopolymers* **64**, 221–226 (2002).
 32. Ungerstedt, U. & Arbuthnott, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* **24**, 485–493 (1970).
 33. Giasson, B. I. *et al.* Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective alpha -

- Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science*. **290**, 985–989 (2000).
34. Schapira, A. H. V, Cooper, T. S. J. M., Clark, J. B., Jenner, P. & Marsden, T. C. D. Mitochondria1 Complex I Deficiency in Parkinson ' s Disease. *J. Neurochem*. **54**, 823–827 (1990).
 35. Uversky, V. N., Li, J. & Fink, A. L. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation : a possible factor in Parkinson ' s disease. *FEBS Lett*. **500**, 105–108 (2001).
 36. Ma, S. Y. *et al*. Dopamine transporter-immunoreactive neurons decrease with age in the human substantia nigra. *J. Comp. Neurol*. **409**, 25–37 (1999).
 37. Simola, N., Morelli, M. & Carta, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res*. **11**, 151–167 (2007).
 38. Bjorklund, A. & Kordower, J. H. Cell Therapy for Parkinson's Disease: What Next? *Mov. Disord*. **28**, 110–115 (2013).
 39. Björklund, A., Dunnett, S. B., Stenevi, U., Lewis, M. E. & Iversen, S. D. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: Functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res*. **199**, 307–333 (1980).
 40. Dunnett, S. B., Björklund, A., Stenevi, U. & Iversen, S. D. Grafts of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res*. **229**, 209–217 (1981).
 41. Dunnett, S. B., Björklund, A., Schmidt, R. H., Stenevi, U. & Iversen, S. D. Intracerebral grafting on neuronal cell suspensions IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesion following implantation of nigral cell suspension in different forebrain sites. *Acta Physiol Scand Suppl* **522**, 29–37 (1983).
 42. Freund, T. F. *et al*. Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J. Neurosci*. **5**, 603–16 (1985).
 43. Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C. & Björklund, A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J. Neurosci*. **15**, 3863–3875 (1995).
 44. Mendez, I., Sadi, D. & Hong, M. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J. Neurosci*. **16**, 7216–7227 (1996).
 45. Mukhida, K., Baker, K. A., Sadi, D. & Mendez, I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J. Neurosci*. **21**, 3521–3530 (2001).
 46. P. Brundin, O.G. Nilsson, R.E. Strecker, O. Lindvall, B. Astedt, A. B. Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Brain Res*. **65**, 235–240 (1986).

47. Lindvall, O. *et al.* Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in parkinson's disease. *Science*. **2**, 574–577 (1990).
48. Lindvall, O. *et al.* Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol.* **31**, 155–165 (1992).
49. Lindvall, O. *et al.* Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **35**, 172–80 (1994).
50. Wenning, G. K. *et al.* Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **42**, 95–107 (1997).
51. Kordower, J. H. *et al.* Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **13**, 383–393 (1998).
52. Kordower, J. H. *et al.* Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's Disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J. Comp. Neurol.* **370**, 203–230 (1996).
53. Hagell, P. *et al.* Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease Effects of the second graft. *Clin. Neurosci.* **122**, 1121–1132 (1999).
54. Olanow, C. W. *et al.* A Double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* **54**, 403–414 (2003).
55. Freed, C. R. *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **344**, 710–719 (2001).
56. Shearer, M. C. & Fawcett, J. W. The astrocyte/meningeal cell interface – a barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res.* **305**, 267–273 (2001).
57. Kawano, H. *et al.* Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* **349**, 169–180 (2012).
58. Fawcett, J. W. & Asher, R. A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* **49**, 377–391 (1999).
59. Smits, S. M., Burbach, J. P. H. & Smidt, M. P. Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Prog. Neurobiol.* **78**, 1–16 (2006).
60. Van den Heuvel, D. M. A. & Pasterkamp, R. J. Getting connected in the dopamine system. *Prog. Neurobiol.* **85**, 75–93 (2008).
61. Smidt, M. P. & Burbach, J. P. H. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 21–32 (2007).
62. Gates, M. A., Coupe, V. M., Torres, E. M., Fricker-Gates, R. A. & Dunnett, S. B. Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 831–844 (2004).
63. Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B. & Groenewegen, H. J. The pre- and postnatal

- development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* **25**, 857–887 (1988).
64. Hernández-Montiel, H. L., Tamariz, E., Sandoval-Minero, M. T. & Varela-Echavarría, A. Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon. *J. Comp. Neurol.* **506**, 387–397 (2008).
 65. Yue, Y. *et al.* Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J. Neurosci.* **19**, 2090–2101 (1999).
 66. Li, J. *et al.* Evidence for topographic guidance of dopaminergic axons by differential Netrin-1 expression in the striatum. *Mol. Cell. Neurosci.* **61**, 85–96 (2014).
 67. Dugan, J. P., Stratton, A., Riley, H. P., Farmer, W. T. & Mastick, G. S. Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**, 347–356 (2011).
 68. Lin, L. & Isacson, O. Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell derived dopaminergic neurons by netrin-1 and slits. *Stem Cells* **24**, 2504–2513 (2009).
 69. Yamauchi, K. *et al.* FGF8 Signaling Regulates Growth of Midbrain Dopaminergic Axons by Inducing Semaphorin 3F. *J. Neurosci.* **29**, 4044–4055 (2009).
 70. Torre, E. R., Gutekunst, C. A. & Gross, R. E. Expression by midbrain dopamine neurons of *Sema3A* and *3F* receptors is associated with chemorepulsion in vitro but a mild in vivo phenotype. *Mol. Cell. Neurosci.* **44**, 135–153 (2010).
 71. Yamauchi, K. *et al.* FGF8 Signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing Semaphorin 3F. *J. Neurosci.* **29**, 4044–4055 (2009).
 72. Kawano, H. *et al.* Aberrant trajectory of ascending dopaminergic pathway in mice lacking *Nkx2.1*. *Exp. Neurol.* **182**, 103–112 (2003).
 73. Tamariz, E. *et al.* Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *J. Neurosci. Res.* **88**, 971–980 (2010).
 74. Díaz-Martínez, N. E. *et al.* Recovery from experimental parkinsonism by semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. *Mol. Ther.* **21**, 1579–1591 (2013).
 75. Pelayo, R., Santa-Olalla, J. & Velasco, I. *Células troncales y medicina regenerativa.* **1**, (2011).
 76. Fortier, L. A. Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.* **34**, 415–423 (2005).
 77. Wobus, A. M. & Boheler, K. R. Embryonic Stem Cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* **85**, 635–678 (2005).
 78. De Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S. & Alcaina, Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev.* **6**, 633–49 (2010).
 79. Mintz, B. & Illmensee, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3585–9 (1975).

80. Papaioannou, V. E., McBurney, M. W., Gardner, R. L. & Evans, M. J. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* **258**, 70–73 (1975).
81. Berstine, E. G., Hooper, M. L., Grandchamp, S. & Ephrussi, B. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3899–3903 (1973).
82. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7634–7638 (1981).
83. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
84. Bradley, a, Evans, M., Kaufman, M. H. & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255–256 (1984).
85. Chang, H. & Matzuk, M. M. Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech. Dev.* **104**, 61–67 (2001).
86. Tremblay, K. D., Dunn, N. R. & Robertson, E. J. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* **128**, 3609–3621 (2001).
87. Rohwedel, J., Sehlmeier, U., Shan, J., Meister, A. & Wobus, a M. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol. Int.* **20**, 579–87 (1996).
88. Matsui, Y., Zsebo, K. & Hogan, B. L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**, 841–847 (1992).
89. Shambloott, M. J. *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13726–13731 (1998).
90. Shambloott, M. J. *et al.* Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 113–8 (2001).
91. Williams, R. L. *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684–687 (1988).
92. Smith, a G. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688–690 (1988).
93. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **210**, 30–43 (1999).
94. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* **24**, 372–376 (2000).

95. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281–292 (2003).
96. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* **10**, 55–63 (2004).
97. Pera, M. F., Reubinoff, B. & Trounson, A. Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **113**, 5–10 (2000).
98. Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, a & Bongso, a. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**, 399–404 (2000).
99. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–7 (1998).
100. Stojkovic, M. *et al.* Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* **22**, 790–7 (2004).
101. Amit, M. Human Feeder Layers for Human Embryonic Stem Cells. *Biol. Reprod.* **68**, 2150–2156 (2002).
102. Amit, M. *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* **227**, 271–278 (2000).
103. Solter, D. & Knowles, B. B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 5565–9 (1978).
104. Henderson, J. K. *et al.* Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* **20**, 329–337 (2002).
105. Leahy, A. M. Y., Xiong, J., Kuhnert, F. & Stuhlmann, H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation Use of Developmental Marker Genes to Define Temporal and Spatial Patterns of Differentiation During Embryoid Body Formation. *J. Exp.* **81**, 67–81 (1999).
106. Lee, S.-H. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M. & McKay, R. D. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **18**, 675–679 (2000).
107. Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A. & Jessell, T. M. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**, 385–397 (2002).
108. Perrier, A. L. *et al.* Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1543–12548 (2004).
109. Kriks, S. *et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **480**, 547–551 (2011).

110. Aurand, E. R., Lampe, K. J. & Bjugstad, K. B. Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering. *Neurosci. Res.* **72**, 199–213 (2012).
111. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 18–23 (2012).
112. Sawheny, A. S., Pathak, C. P. & Hubbell, J. A. Bioerodible hydrogels based on photopolymerized Poly(ethylene glycol)-co-poly(α -hydroxy acid) diacrylate macromers. *Macromolecules* **25**, 581–587 (1993).
113. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **101**, 1869–1880 (2001).
114. Kirschner, C. M. & Anseth, K. S. Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Mater.* **61**, 931–944 (2013).
115. He, S., Yaszemski, M. J., Yasko, A. W., Engel, P. S. & Mikos, A. G. Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)-dimethacrylate. *Biomaterials* **21**, 2389–2394 (2000).
116. Jeong, B., Bae, Y. H. & Kim, S. W. In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 171–177 (2000).
117. Tate, M. C., Shear, D. A., Hoffman, S. W., Stein, D. G. & LaPlaca, M. C. Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. *Biomaterials* **22**, 1113–1123 (2001).
118. Srividya, B., Cardoza, R. M. & Amin, P. D. Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system. *J. Control. release* **73**, 205–211 (2001).
119. Cheng, E. *et al.* A pH-Triggered, Fast-Responding DNA Hydrogel. *Angew. Chemie* **121**, 7796–7799 (2009).
120. Chiu, Y.-L. *et al.* pH-triggered injectable hydrogels prepared from aqueous N-palmitoyl chitosan: in vitro characteristics and in vivo biocompatibility. *Biomaterials* **30**, 4877–4888 (2009).
121. Mellott, M. B., Searcy, K. & Pishko, M. V. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials* **22**, 929–941 (2001).
122. Bryant, S. J. & Anseth, K. S. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **59**, 63–72 (2002).
123. Chatterjee, K. *et al.* The effect of 3D hydrogel scaffold modulus on osteoblast differentiation and mineralization revealed by combinatorial screening. *Biomaterials* **31**, 5051–5062 (2010).
124. Ellis-Behnke, R. G. *et al.* Nano neuro knitting : Peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5054–5059 (2006).

125. Nagai, Y., Unsworth, L. D., Koutsopoulos, S. & Zhang, S. Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold. *J. Control. Release* **115**, 18–25 (2006).
126. Koutsopoulos, S. & Zhang, S. Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, Matrigel and Collagen I. *Acta Biomater.* **9**, 5162–5169 (2013).
127. Koutsopoulos, S. & Zhang, S. Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *J. Control. Release* **160**, 451–458 (2012).
128. Carballo-Molina, O. A. & Velasco, I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–12 (2015).
129. Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S. & Demirci, U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine* **5**, 469–484 (2011).
130. Holmes, T. C. *et al.* Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6728–6733 (2000).
131. Bjugstad, K. B. *et al.* Biocompatibility of PEG-Based hydrogels in primate brain. *Cell Transplantat* **17**, 409–415 (2008).
132. Bjugstad, K. B., Lampe, K., Kern, D. S. & Mahoney, M. Biocompatibility of poly (ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. *J Biomed Mater Res A* **95**, 79–91 (2010).
133. Tamariz, E. *et al.* Delivery of chemotropic proteins and improvement of dopaminergic neuron outgrowth through a thixotropic hybrid nano-gel. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **22**, 2097–2109 (2011).
134. Guo, J. *et al.* Self-assembling peptide nanofiber scaffold promotes the reconstruction of acutely injured brain. *Nanomedicine* **5**, 345–351 (2009).
135. Hou, S. *et al.* The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *J Neurosci Methods* **148**, 60–70 (2005).
136. Kobsa, S. & Saltzman, W. M. Bioengineering approaches to controlled protein delivery. *Pediatr. Res.* **63**, 513–519 (2008).
137. Censi, R., Di Martino, P., Vermonden, T. & Hennink, W. E. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *J. Control. Release* **161**, 680–692 (2012).
138. Amsden, B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules* **31**, 8382–8395 (1998).
139. Pakulska, M. M., Ballios, B. G. & Shoichet, M. S. Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomed. Mater.* **7**, 1–13 (2012).
140. Penn, R. D., York, M. M. & Paice, J. A. Catheter systems for intrathecal drug delivery. *J. Neurosurg.* **84**, 713 (1995).

141. Macaya, D. & Spector, M. Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review. *Biomed. Mater.* **7**, 1–22 (2012).
142. Gelain, F., Unsworth, L. D. & Zhang, S. Slow and sustained release of active cytokines from self-assembling peptide scaffolds. *J. Control. Release* **145**, 231–239 (2010).
143. Yokoi, H., Kinoshita, T. & Zhang, S. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 8414–8419 (2005).
144. Guthrie, S. & Lumsden, A. Collagen gel coculture of neural tissue. *Neuroprotocols* **4**, 116–120 (1994).
145. Meijering, E. *et al.* Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry. A* **58A**, 167–176 (2004).
146. Schmidt, E. R. E., Morello, F. & Pasterkamp, R. J. Dissection and culture of mouse dopaminergic and striatal explants in three-dimensional collagen matrix assays. *J. Vis. Exp.* **61**, 1–5 (2012).
147. Ramos-Mejía, V. *et al.* HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood* **124**, 3065–3076 (2014).
148. Tamariz, E. *et al.* Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *J. Neurosci. Res.* **88**, 971–980 (2010).
149. Kolodkin, A. L. *et al.* Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor. *Cell* **90**, 753–762 (1997).
150. Yoshii, S. *et al.* Restoration of function after spinal cord transection using a collagen bridge. *J. Biomed. Mater. Res. A* **70**, 569–575 (2004).
151. Xu, T. *et al.* Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials* **30**, 4377–4383 (2009).
152. Gil, V. & del Río, J. A. Analysis of axonal growth and cell migration in 3D hydrogel cultures of embryonic mouse CNS tissue. *Nat. Protoc.* **7**, 268–280 (2012).
153. Wakita, S. *et al.* Reconstruction and quantitative evaluation of dopaminergic innervation of striatal neurons in dissociated primary cultures. *J. Neurosci. Methods* **192**, 83–89 (2010).
154. Kim, H. J. *et al.* Integrated microfluidics platforms for investigating injury and regeneration of CNS axons. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 1268–1276 (2012).
155. Taylor, A. M. *et al.* A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* **2**, 599–605 (2005).
156. Taylor, A. M. *et al.* A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* **2**, 599–605 (2005).
157. Lampe, K. J., Mooney, R. G., Bjugstad, K. B. & Mahoney, M. J. Effect of macromer weight percent on neural cell growth in 2D and 3D nondegradable PEG hydrogel culture. *J. Biomed. Mater. Res. A* **94**, 1162–1171 (2010).

158. Cheng, W.-L. & Lin, C.-C. K. The Effects of Different Electrical Stimulation Protocols on Nerve Regeneration Through Silicone Conduits. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* **56**, 1241–1246 (2004).
159. Bamber, N. I., Li, H., Aebischer, P. & Xu, X. M. Fetal spinal cord tissue in mini-guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisectioned adult rat spinal cords. *Neural Plast.* **6**, 103–121 (1999).
160. Vasconcelos, B. C. & Gay-Escoda, C. Facial nerve repair with expanded polytetrafluoroethylene and collagen conduits: an experimental study in the rabbit. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **58**, 1257–1262 (2000).
161. Aebischer, P., Valentini, R. F., Dario, P., Domenici, C. & Galletti, P. M. Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Res.* **436**, 165–168 (1987).
162. Tang, X., Davies, J. E. & Davies, S. J. A. Changes in Distribution, Cell Associations, and Protein Expression Levels of NG2, V2, and Tenascin-C During Acute to Chronic Maturation of Spinal Cord Scar Tissue. *J. Neurosci. Res.* **444**, 427–444 (2003).
163. Nishimura, A. *et al.* Controlled release of insulin from self-assembling nanofiber hydrogel, PuraMatrix™: Application for the subcutaneous injection in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**, 1–7 (2012).
164. Koutsopoulos, S., Unsworth, L. D., Nagai, Y. & Zhang, S. Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4623–4628 (2009).
165. Kim, M. *et al.* Pioneer midbrain longitudinal axons navigate using a balance of Netrin attraction and Slit repulsion. *Neural Dev.* **9**, 1–14 (2014).
166. Lee, W., Frank, C. W. & Park, J. Directed axonal outgrowth using a propagating gradient of IGF-1. *Adv. Mater.* **26**, 4936–4940 (2014).
167. Alsmadi, N. Z. *et al.* Coiled polymeric growth factor gradients for multi-luminal neural chemotaxis. *Brain Res.* **1619**, 72–83 (2015).
168. Curley, J. L., Catig, G. C., Horn-ranney, E. L. & Moore, M. J. Sensory axon guidance with semaphorin 6A and nerve growth factor in a biomimetic choice point model. *Biofabrication* **6**, 1–14 (2014).
169. Freeman, T. B. *et al.* Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra. *Exp. Neurol.* **113**, 344–353 (1991).
170. Shin, H. S. *et al.* Compartmental culture of embryonic stem cell-derived neurons in microfluidic devices for use in axonal biology. *Biotechnol. Lett.* **32**, 1063–1070 (2010).
171. Lee, N. *et al.* Monitoring the differentiation and migration patterns of neural cells derived from human embryonic stem cells using a microfluidic culture system. *Molecules and cells* **37**, 497–502 (2014).
172. Zahavi, E. E. *et al.* A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system

- reveals spatial aspects of GDNF functions. *J. Cell Sci.* **128**, 1241–52 (2015).
173. Joanne Wang, C. *et al.* A microfluidics-based turning assay reveals complex growth cone responses to integrated gradients of substrate-bound ECM molecules and diffusible guidance cues. *Lab Chip* **8**, 227–237 (2008).
 174. Kim, J.-H. *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50–56 (2002).
 175. Rodríguez-Gómez, J. A. *et al.* Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* **25**, 918–928 (2007).
 176. Baier, P. C. *et al.* Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. *Stem Cells* **22**, 396–404 (2004).
 177. Yurek, D. M. & Fletcher-Turner, A. Comparison of embryonic stem cell-derived dopamine neuron grafts and fetal ventral mesencephalic tissue grafts: morphology and function. *Cell Transpl.* **13**, 295–306 (2004).
 178. Grealish, S. *et al.* Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* **15**, 653–665 (2014).
 179. Steece-Collier, K. *et al.* Embryonic mesencephalic grafts increase levodopa-induced forelimb hyperkinesia in parkinsonian rats. *Mov. Disord.* **18**, 1442–1454 (2003).
 180. Maries, E. *et al.* Focal not widespread grafts induce novel dyskinetic behavior in parkinsonian rats. *Neurobiol. Dis.* **21**, 165–180 (2006).
 181. Gaillard, A. & Jaber, M. Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **34**, 124–133 (2011).
 182. Cheng, T., Chen, M., Chang, W., Huang, M. & Wang, T. Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering. *Biomaterials* **34**, 2005–2016 (2013).

Apéndice

El trabajo descrito fué publicado en forma de artículo original de investigación:

Semaphorin 3C Released from a Biocompatible Hydrogel Guides and Promotes Axonal Growth of Rodent and Human Dopaminergic Neurons.

Carballo-Molina OA, Sánchez-Navarro A, López-Ornelas A, Lara-Rodarte R, Salazar P, Campos-Romo A, Ramos-Méjía V, Velasco I.

Tissue Eng Part A. 2016 Jun;22(11-12):850-61. doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0008.

Adicionalmente, se publicó un artículo de revisión acerca del papel de los hidrogeles en la reparación del tejido nervioso después de determinados daños.

Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries

Carballo-Molina OA, Velasco I

Front Cell Neurosci. 2015 Feb 17;9:13. doi: 10.3389/fncel.2015.00013. eCollection 2015

ORIGINAL ARTICLE

Semaphorin 3C Released from a Biocompatible Hydrogel Guides and Promotes Axonal Growth of Rodent and Human Dopaminergic Neurons

Oscar A. Carballo-Molina, BS,^{1,2} Andrea Sánchez-Navarro, BS,^{1,2} Adolfo López-Ornelas, MD, PhD,^{1,2} Rolando Lara-Rodarte, BS,^{1,2} Patricia Salazar, MS,³ Aurelio Campos-Romo, MD, PhD,⁴ Verónica Ramos-Mejía, PhD,³ and Iván Velasco, PhD^{1,2}

Cell therapy in experimental models of Parkinson's disease replaces the lost dopamine neurons (DAN), but we still need improved methods to guide dopaminergic axons (DAX) of grafted neurons to make proper connections. The protein Semaphorin 3C (Sema3C) attracts DAN axons and enhances their growth. In this work, we show that the hydrogel PuraMatrix, a self-assembling peptide-based matrix, incorporates Sema3C and releases it steadily during 4 weeks. We also tested if hydrogel-delivered Sema3C attracts DAX using a system of rat midbrain explants embedded in collagen gels. We show that Sema3C released by this hydrogel attracts DAX, in a similar way to pretectum, which is known to attract growing DAN axons. We assessed the effect of Sema3C on the growth of DAX using microfluidic devices. DAN from rat midbrain or those differentiated from human embryonic stem cells showed enhanced axonal extension when exposed to hydrogel-released Sema3C, similar to soluble Sema3C. Notably, DAN of human origin express the cognate Sema3C receptors, Neuropilin1 and Neuropilin2. These results show that PuraMatrix is able to incorporate and release Sema3C, and such delivery guides and promotes the axonal growth of DAN. This biocompatible hydrogel might be useful as a Sema3C carrier for *in vivo* studies in parkinsonian animal models.

Introduction

AXONS GROW WITH spatiotemporal specificity through the response to different cues during embryonic stages. Such growth is directed by the expression of ligands and their cognate receptors. The large family of Semaphorins (Sema) includes both soluble and membrane-bound proteins that mediate axonal guidance through Rho-related G proteins.^{1,2} Class 3 Sema (Sema 3) are guide molecules well conserved in several species.³ Sema3A was initially reported as Collapsin, as exposure of sensory neuron explants of the chick dorsal root ganglia to this protein produced growth cone collapse.⁴

Although initially characterized as inhibitors of axonal growth, it was later discovered that Sema3 can induce either repulsive or attractive effects depending on the cellular context.¹ Sema3A on cortical axons⁵ or Sema3E on retinal

ganglion cells⁶ produced repulsive effects. On the contrary, Semaphorin 3C (Sema3C) secreted by a transient neuronal population exerted an attractive influence on crossing callosal axons during development.⁷ Exposure of developing mouse hippocampal subicular neurons to Sema3E promotes and attracts the axonal growth, an effect mediated by Neuropilin (NRP) 1.⁸

Several Sema proteins influence the growth of mesencephalic dopaminergic axons (DAX) during development: Sema3A,^{9–11} Sema3C,^{10,11} Sema3F,^{9,10} Slit-2,^{12–15} and Netrin-1^{12,14–16} are all implicated in the guidance of DAX to reach the striatal area. Growing DAX respond differentially to Sema3 signaling: Sema3F is repulsive for DAX emanating from mesencephalic explants embedded in collagen gells.¹⁰ In contrast, Sema3C and Sema3A increase the axonal growth of DAX, whereas Sema3C also attracts DAX of mesencephalic

¹Instituto de Fisiología Celular—Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

²Laboratorio de Reprogramación Celular IFC/UNAM en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez,” México, D.F., México.

³GENYO: Centre for Genomics and Oncological Research Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía, PTS Granada, Spain.

⁴Unidad Periférica de Neurociencias Facultad de Medicina-UNAM en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez,” México, D.F., México.

neurons and those derived *in vitro* from mouse embryonic stem (ES) cells.¹¹ Neutralizing antibodies for the Sema3C receptors NRP1 and NRP2 block Sema3C effects on rodent DAx.¹¹

The low ability of axon regeneration in the adult central nervous system (CNS) has been widely documented and is mainly due to the lack of signals present during development and to the expression of inhibitory molecules by reactive glial cells.^{17–19} These impediments become relevant when axonal regeneration in the CNS is needed to repair the damaged or diseased brain. In Parkinson's disease (PD), DAx that form the nigrostriatal pathway are lost, secondary to the death of dopamine neurons (DAN) in the substantia nigra (SN). Grafting of DAN in the striatum, the region originally innervated by DAx, causes behavioral recovery in adult parkinsonian rats.^{20–25} However, this strategy applied to PD patients did not cause consistent recovery.^{26,27}

In contrast, when DAN are grafted in the SN, they are unable to project their axons to the striatum^{28–30} probably due to the adverse environment for axonal growth. Enhancing and directing DAx growth is an appealing idea to be tested when grafting neurons in PD models. In a rat model of PD, we previously demonstrated that transfected HEK-293 cells could release Sema3C along an artificial trajectory between the SN and the striatum, promoting the DAx growth of neurons grafted in the SN, resulting in behavioral improvement.²⁵

The use of biomaterial scaffolds might constitute an ideal strategy to replace transfected cells for delivery of Sema3C to the brain. Hydrogels are polymers that incorporate large quantities of water in their structure^{31,32} and gels in response to several physiological conditions, such as temperature^{33,34} or osmolarity.^{35,36} Recent studies have shown the usefulness of hydrogels as drug carriers due to their ability for *in vivo* or *in vitro* release (reviewed in Carballo-Molina and Velasco³⁷). For example, neurotrophic factors such as glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF),³⁸ brain-derived neurotrophic factor (BDNF),³⁹ or ciliary neurotrophic factor⁴⁰ can be incorporated to the hydrogel and then released.

Hydrogels are also a good substrate for neural cells, allowing their survival, growth and proliferation (reviewed in Carballo-Molina and Velasco³⁷). Neural stem cells can proliferate and differentiate when embedded in hydrogels *in vitro*^{41,42} and *in vivo*.⁴³ Some researchers have investigated the use of hydrogels as cell carriers of rat neurons⁴⁴ and human neural progenitor cells.⁴⁵ Several groups have reported that the implantation of hydrogels to rodent and primate brains does not cause tissue rejection and promotes axonal growth (reviewed in Carballo-Molina and Velasco³⁷).

The hydrogel PuraMatrix is a synthetic molecule constituted by self-assembling peptides with the sequence arginine-alanine-aspartate-alanine repeated 16 times (RADA16).⁴⁶ This hydrogel promoted recovery in a hamster model of blindness when implanted in the brain³⁶ and helped recover from cortical lesions,^{43,47} mainly by allowing axonal growth and the formation of synapses *in vitro*.⁴⁶ Furthermore, PuraMatrix can incorporate different proteins into its structure and release them *in vitro*.^{35,48} In this study, we evaluated if PuraMatrix can release Sema3C and guide/promote DAx growth. We show that PuraMatrix-embedded Sema3C is stably released and that such delivery causes attraction of DAx from midbrain DAN.

Quantification of the growth of DAx of rat and human origin showed that Sema3C released by this hydrogel caused significant larger axons, compared to controls.

Materials and Methods

Conjugation of proteins to hydrogel and release assays

We used the RADA16 BD PuraMatrix hydrogel (1% w/v solution) based on self-assembling peptides. The hydrogel was diluted with sterile water to obtain a 0.15% w/v final concentration as recommended by the manufacturer. The hydrogel was combined with recombinant human Sema3C peptide (Abcam) and incubated at 37°C in a sterile saline solution for 28 days; an aliquot of the solution was recovered and the same volume was added every day. The experiment was repeated five times for each concentration. Sema3C was mixed with this hydrogel solution previous to the gelling process, which was triggered by adding saline solution (0.9% NaCl).⁴⁹ To measure the release of Sema3C conjugated at 5 and 10 µg/mL with hydrogel, an ELISA was performed, according to the manufacturer's protocol (Cloud-Clone Corp).

Animals

Adult Wistar rats and embryos at 14 days of gestational age (E14) were used. The animals were maintained and handled in accordance with the local animal care and use committee and complied local (NOM-062-ZOO-1999) and international guidelines (Animal Welfare Assurance A5281-01). Rats were housed with a 12-h light–12-h dark cycle at room temperature (RT, 22°C ± 2°C). Water and food were freely available. Animals were euthanized. All efforts were made to minimize the number of animals used and to avoid pain or discomfort.

Collagen extraction from rat tails

The collagen extraction procedure was made as reported previously.⁵⁰ Four adult frozen rat tails were rinsed with 70% ethanol. Tendons were extracted using sterile tweezers and rinsed with 70% ethanol. We obtained 2 g of tendons that were cut into 0.5 cm fragments. The dry tendons were transferred to 60 mL of ice-cold 0.1% acetic acid solution. Tendons were stirred for 20 h at 4°C. The solution was diluted with 80 mL of sterile water and centrifuged at 9000 rpm for 30 min at 4°C. This solution was used to prepare collagen gels.

Assays of explants in collagen gels to measure axonal attraction

Ventral midbrain (Mb), isthmic region (Ist), and pretectum (PT) explants were obtained from E14 embryos as described¹⁰ and were maintained in Krebs solution. Ventral Mb explants were embedded in a collagen matrix by mixing 300 µL of N2 medium (DMEM/F12 1:1, supplemented with 25 µg/L of human insulin, 30 nM sodium selenite, 100 µM putrescine, 20 nM progesterone, and 100 mg/L of apotransferrin) with 100 µL of collagen solution, 10 µL of 1.537 M NaCl solution (final concentration of 36.6 mM), and 10 µL of 0.89 M of NaHCO₃ (final concentration of 21.2 mM); this mixture was maintained on ice before the gelling process. The Mb explants were embedded together with PT ($n = 23$) or with Ist ($n = 17$) explants, on four-well dishes (Nunc), and let to polymerize at 37°C for 1 h. Special care was taken to keep a distance of 500–

1000 μm between explants before adding another layer of collagen and let to polymerize for an additional hour. Finally, 700 μL of N2 medium was added.

For hydrogel experiments, a drop of PuraMatrix coupled to either Sema3C ($n=21$) or gelatin from pig skin coupled to Oregon Green[®] 488 (Molecular Probes) as a control protein (Cp), since this protein has a similar weight and charge to Sema3C ($n=11$), both at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was jellified for 1 h by adding medium at RT. A layer of collagen was added and immediately the Mb explants were introduced. After 1 h at 37°C, an additional layer of collagen was added and let to polymerize for 1 h, and finally, 700 μL of N2 medium was added. Explants were cultured for 5 days without medium change.

To determine the attraction/repulsion effects on Mb explants, the TH+ axon length was measured with ImageJ software (National Institutes of Health) using NeuronJ plugin.⁵¹ The Mb explants were divided into two areas, proximal (P) or distal (D) (as indicated in the scheme of Fig. 2A). In cases where explants extended many axons, only the 10 largest were considered; when axons were fewer than 10, all axons were measured. The average axonal length for D and P sides was obtained to calculate the P/D ratio. When the value was greater than 1.0, it was considered an attractive effect; values smaller than 1.0 were considered repulsive.⁵² When the Mb explant does not present axonal growth, a zero value was registered. One methodological problem we encountered in the hydrogel groups was that the gel often fragmented when collagen was placed on top. We discarded experiments where many pieces of hydrogel were present.

Dopaminergic differentiation of H9 human ES cells

The ES cell line H9 was used after lentiviral transduction for GFP expression as reported.⁵³ Dopaminergic neuron differentiation was made with the dual-SMAD inhibition and floor plate induction.⁵⁴ Briefly, H9 cells were plated on Matrigel (BD), grown for 11 days in a knockout serum replacement medium (KSR) containing knockout DMEM, 15% serum replacement, 2 mM GlutaMAX, 1X nonessential amino acids, and 10 μM β -mercaptoethanol. Cultures were exposed to LDN193189 (100 nM, Stemgent; days 0–11), SB431542 (10 μM , Tocris; days 0–5), the sonic agonists SAG (1 μM , Sigma; days 1–9) and Purmorphamine (2 μM , Stemgent; days 1–9), FGF8 (100 ng/mL, Prepotech; days 1–7) and CHIR99021 (3 μM , Stemgent; days 3–13). The KSR medium was gradually shifted to N2 medium starting on day 5. On day 11, the medium was changed to the Neurobasal medium with B27 supplement (NB/B27; Invitrogen) supplemented with BDNF (20 ng/mL, Prepotech), ascorbic acid (0.2 mM, Sigma), GDNF (20 ng/mL, Prepotech), TGF β 3 (1 ng/mL, Prepotech), dibutyryl cAMP (0.5 mM; Sigma), and DAPT (10 μM ; Sigma) for 10 days. On day 21, cells were dissociated using TrypLE Express (Life Technologies) and replated on microfluidic devices.

Axonal growth chambers

Polydimethylsiloxane microfluidic devices were purchased from Xona Microfluidics (Standard Neuron Device Cat.No: SND900) and were used according to the manufacturer's protocol. Briefly, they were attached by pressure to a coverslip precoated with poly-L-ornithine (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/laminin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/fibronectin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The ventral Mb

region was dissected from E14 rat embryos in Krebs solution and dissociated with TrypLE Express (Gibco) to obtain DAN. Cells were plated (250,000 cells/5 μL) in the cell compartment (Fig. 3A). After 10 min, 100 μL of N2 medium was added. The other side of the chamber was filled with 200 μL of N2 medium alone (control) or with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sema3C. For hydrogel experiments, 100 μL of the medium was first added in one supply well in the opposite compartment where cells were plated (Fig. 3A), then 3.5 μL of the hydrogel containing 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Sema3C or Cp and 100 μL of medium were added. The cultures were maintained at 37°C in humidified 5% CO₂/95% air for 5 days. Each chamber contains a variable number of axons, although the cells were plated at the same initial density; the total numbers of axons measured were as follows: medium alone ($n=48$), medium plus soluble Sema3C ($n=59$), hydrogel with Cp ($n=90$), and hydrogel coupled to Sema3C ($n=92$). Axonal growth in the microgrooves of the chambers was measured by ImageJ software using NeuronJ plugin.⁵¹ We decided to use this software because it allows the measurement of axons inside the microgrooves, the axons entering the microgrooves, and also axons emerging from the channels. Human DAN were introduced to microfluidic devices at day 21 of differentiation and kept for 14 days.

Calcein staining, immunocytochemistry, and microscopy

To visualize live rat cells by fluorescence, cultures were incubated with 1 μM calcein-AM (R&D Systems) for 15 min. This assay allowed us to clearly identify the growing axons inside the microgrooves of microfluidic devices, which in some cases were difficult to observe in phase-contrast microscopy. For immunodetection, cells in microfluidic devices were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at RT or with methanol for 5 min at -20°C. Cells were permeabilized and blocked for 1 h at RT with 0.3% Triton X-100 and 10% normal goat serum in PBS. Cells were incubated overnight with the following primary antibodies in PBS plus 10% normal serum: mouse anti- β III Tubulin 1:1000 (Covance); rabbit polyclonal anti-TH 1:1000 (Pel-freez). Secondary antibodies were incubated for 2 h at RT: Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit 1:1000 (Molecular Probes); Alexa 568 goat anti-mouse 1:1000 (Molecular Probes). For human cells expressing GFP, Alexa 488 was substituted by Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit 1:500 (Jackson ImmunoResearch). In all experiments, negative controls that included the addition of only secondary antibodies did not show unspecific staining.

In parallel experiments, the same cell suspensions of human DAN that were used for microfluidic devices were plated on coverslips. After 28 or 35 days of differentiation, immunostaining for NRP1 or NRP2 receptors was made according to published protocols.¹¹ In brief, cells were blocked with 10% horse serum for half an hour, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 5% horse serum, and incubated with anti-TH, combined with anti-NRP1 1:500 (R&D Systems) or anti-NRP2 (1:2500⁵⁵) overnight. Secondary antibodies were incubated for 2 h at RT (1:1500; Molecular Probes). We calculated the percentage of neurons that coexpress TH/NRP1 (cells counted were 130 for day 28 and 134 for day 35) or TH/NRP2 (total cells assessed were 95 for day 28 and 98 for day 35), in two independent experiments.

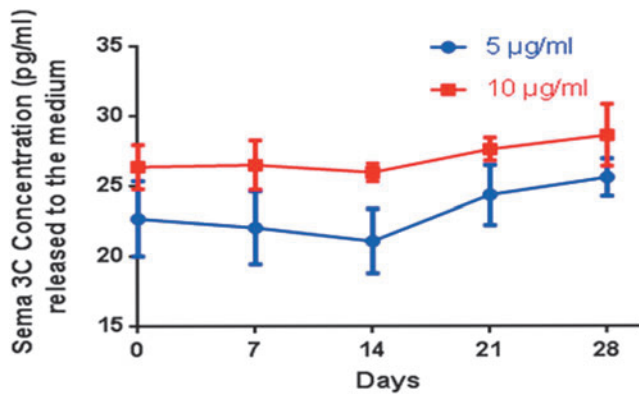


FIG. 1. Release of Semaphorin 3C (Sema3C) embedded in PuraMatrix. Quantification of Sema3C released by the hydrogel at 5 or 10 µg/mL by ELISA. The hydrogel can release Sema3C to the medium at constant levels for 28 days at both tested concentrations. Color images available online at www.liebertpub.com/tea

Explants were processed following reported methods.¹⁰ Briefly, collagen gels were fixed with 4% paraformaldehyde for 2 h at RT. Explants were permeabilized and blocked for 3 h at RT with 0.3% Triton X-100 and 10% normal goat serum in PBS. Collagen gels were exposed to the same primary and secondary antibodies used in microfluidic devices. The times of incubation were extended: explants were exposed to primary antibodies for 2 days and secondary antibodies for 1 day.

Pictures of microfluidic assays with rat cells were taken with a confocal microscope Olympus FV-1000. Microphotographs for experiments with human cells were taken with a confocal microscope Zeiss LSM510. All the capture parameters were the same within groups.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± standard error of mean for experiments performed in duplicate for at least three independent times. Statistics was made by one-way ANOVA following multiple comparisons test. GraphPad Prism version 6.0 was used for graph and statistical analysis. Statistical differences were considered with a significant $p < 0.05$.

Results

Hydrogel releases proteins to the medium

We conjugated recombinant human Sema3C to PuraMatrix hydrogel at two different concentrations (5 or 10 µg/mL) and measured the release of the protein. We collected the solution in contact with the hydrogel every week and quantified the amount of Sema3C released by ELISA. After 28 days, we detected constant levels of the protein for both concentrations (Fig. 1).

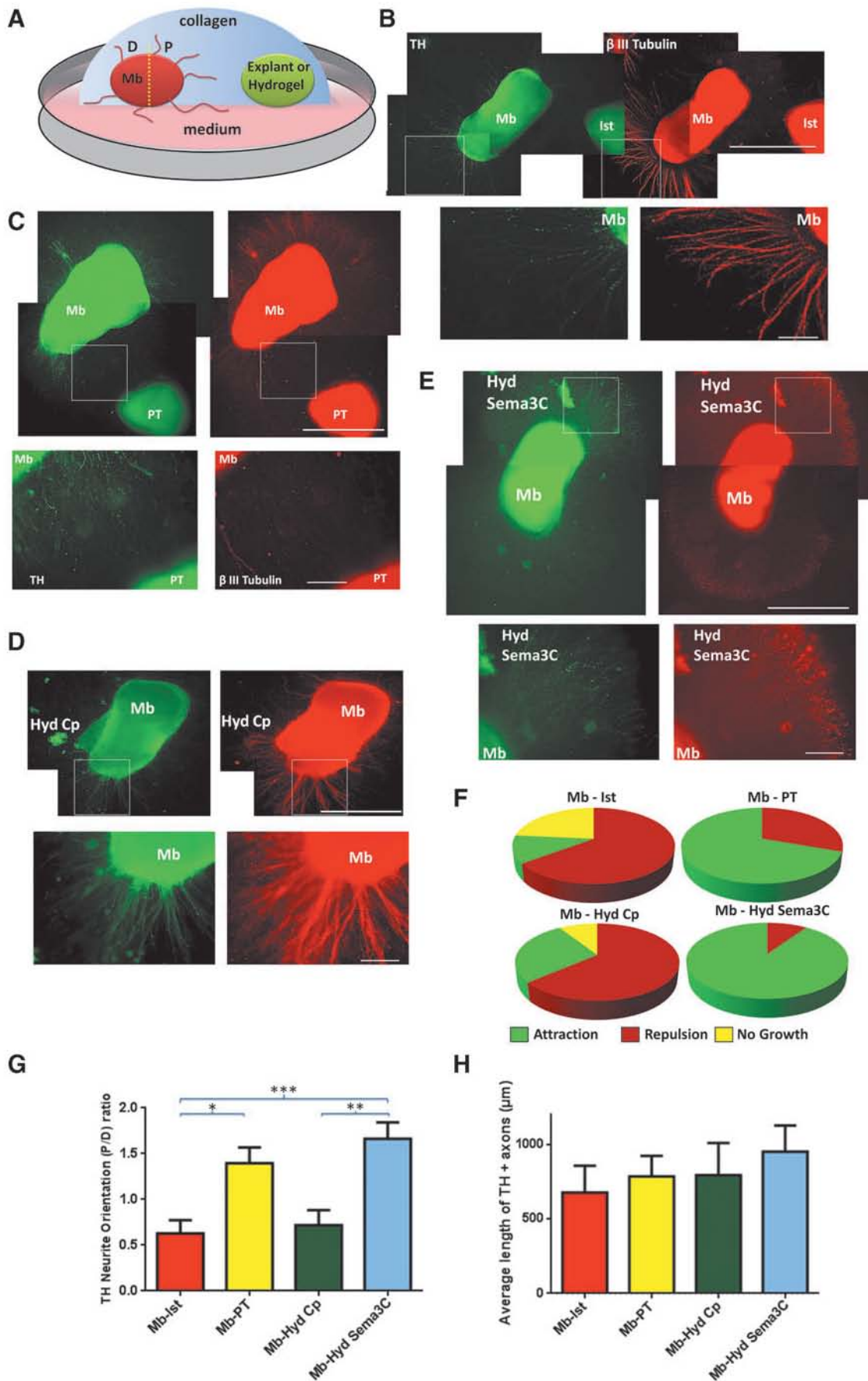
Sema3C released by hydrogel induces attraction of DAX

Collagen gels form a permissive three-dimensional environment for axonal growth^{50,56–58} and also allow the diffusion of molecules.^{10,16,59} To test if hydrogel-released Sema3C could influence the direction of DAX growth, we used a collagen gel culture system that included ventral Mb explants, which contain DAN, together with preteum (PT) or isthmus region (Ist) explants. We also combined the Mb explants growing in collagen with the polymerized PuraMatrix hydrogel containing either Sema3C or a Cp. We used Mb-PT explants as a positive control because this embryonic region exerts axonal dopaminergic attraction^{10,60}; as a negative control, we combined Mb with Ist, which does not attract DAX.¹⁰ In parallel, we cocultured Mb explants with hydrogel coupled to either Cp or Sema3C (Fig. 2A). After 5 days, we immunostained for TH and β III Tubulin to visualize the direction of dopaminergic axonal growth. A proximal/distal attraction ratio was calculated as described in Methods (Fig. 2A).

We did not observe growing axons toward Ist in cocultured Mb-Ist explants (Fig. 2B). In contrast, we observed an attractive effect on DAX when Mb was cocultured with PT (Fig. 2C). We observed a similar attractive effect when Mb was exposed to the Sema3C-embedded hydrogel, where DAX reached mainly the P area, and the larger axons grew toward the hydrogel (Fig. 2D). DAX grew in random directions when exposed to hydrogels conjugated to Cp (Fig. 2E).

Seventy percent of axons in the Mb-PT cocultures showed axonal attraction and 30% repulsion. In contrast, for the Mb-Ist group, Mb DAX showed repulsion in 65% of cases, in 12% attraction, and in 23% no growth (Fig. 2F). Mb explants exposed to Sema3C-embedded hydrogel presented 90% of attraction and 10% of repulsion, in contrast to DAX exposed to hydrogel with Cp, which showed 64% of repulsion, 27% attraction, and 9% without growth (Fig. 2F).

FIG. 2. Sema3C embedded in PuraMatrix attracts dopaminergic axonal growth. (A) Scheme of collagen gel coculture, including the ventral Mb explant combined with (i) isthmus (Ist); (ii) preteum (PT); (iii) hydrogel (Hyd) with Sema3C; (iv) Hyd with control protein (Cp). The rat midbrain (Mb) explants were divided into proximal (P) or distal (D) areas as represented. (B) Mb explant cultured with Ist region. Immunostaining with β III Tubulin and TH shows that dopaminergic axons (DAX) do not grow toward Ist explant. In all cases, the top pictures are reconstructions of low magnification and the images below are enlargements of the boxed areas. (C) Mb explant cultured with PT. DAX grew toward the PT. (D) Mb explant exposed to Hyd with Sema3C. DAX are preferentially present toward the hydrogel. (E) Mb explant cocultured with Hyd Cp. The axons grow randomly. (F) DAX were classified as proximal, distal, or absence of growth and the proportion of attraction, repulsion, or no growth was calculated. PT and Hyd with Sema3C mainly promote dopaminergic attraction; in contrast, Ist and Hyd with Cp mostly induced repulsion. (G) P/D ratios were plotted for the different conditions. PT and Hyd Sema3C promoted attraction, whereas Ist and Hyd Cp conditions induced repulsion. No significant differences were found between PT and Hyd Sema3C. (H) The length of DAX regardless of the direction of growth did not change between all the analyzed conditions. Mean ± standard error of mean * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test). Scale bars: 1000 µm (reconstruction images) and 100 µm (magnification images). Color images available online at www.liebertpub.com/tea



We calculated the proximal/distal ratio to measure dopaminergic attraction in each condition (Fig. 2G). Mb-PT and Mb-hydrogel Sema3C presented proximal/distal ratio values above 1 (Fig. 2G), indicating that Sema3C released by hydrogel attracts DAX similarly to PT. Mb-Ist and Mb-hydrogel Cp cocultures had values below 1 (Fig. 2G). We also measured the length of TH+ axons regardless of their proximal or distal position and found that it was similar in all groups (Fig. 2H).

Sema3C released by hydrogel promotes axonal growth of rat DAN

To evaluate if Sema3C released by hydrogel could increase DAX length, we used commercial microfluidic devices de-

signed to assess the axonal response to soluble molecules. These chambers contain two sides that are separated by microgrooves of 900 μm of length (Fig. 3A), since it has been established that only axons are able to grow this distance.^{61,62} One side of the chamber contains more culture medium than the other, creating a hydrostatic force that allows the one-direction movement of soluble molecules from the axonal to the soma compartment (Fig. 3A). As indicated by the scheme, we plated DAN in the soma side of the chamber and Sema3C was present in the axonal compartment. One key advantage of these devices is that axons follow a linear trajectory, in contrast to three-dimensional approaches such as collagen gels. We measured DAX of dissociated rat Mb DAN after 5 days of exposure to different treatments: (1) medium alone; (2) medium plus soluble Sema3C (20 μg/mL); (3) hydrogel

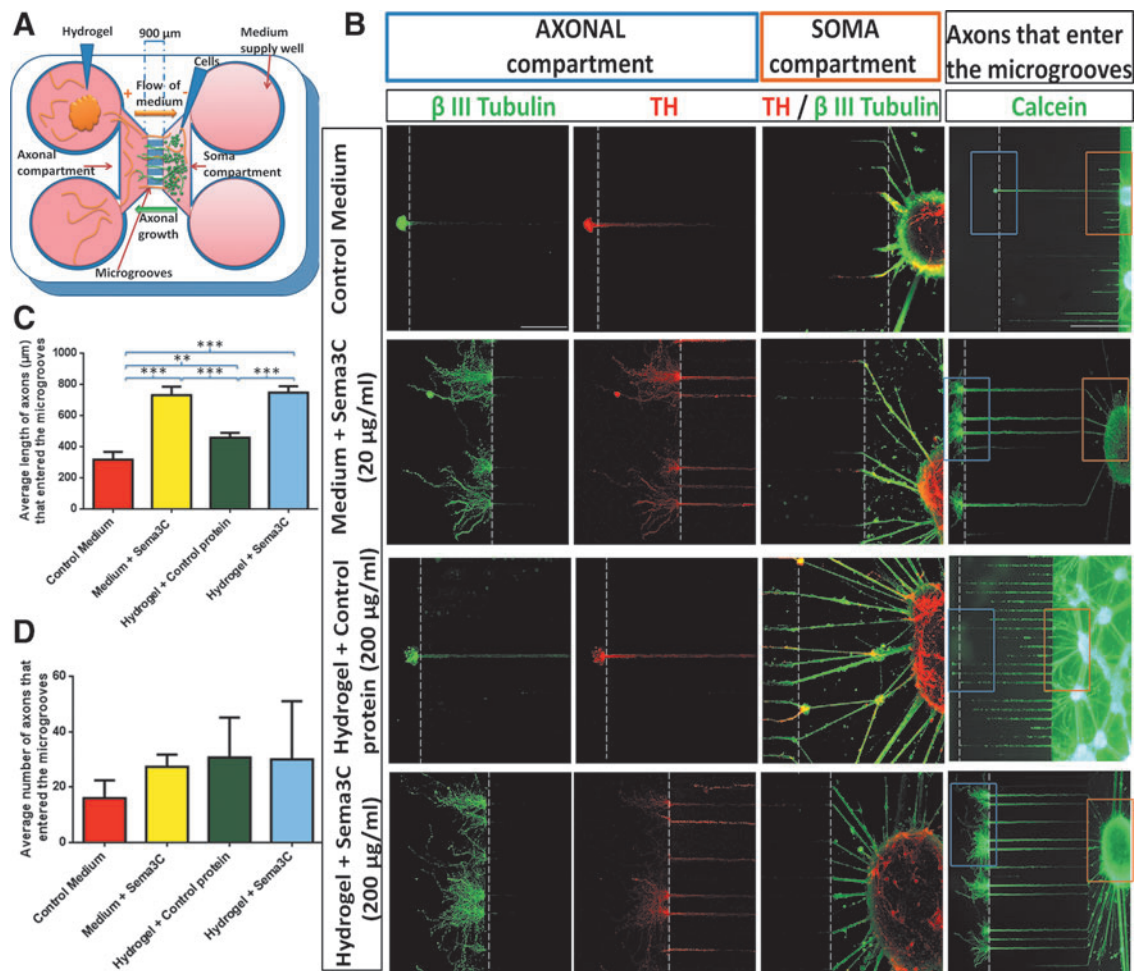


FIG. 3. Axonal growth of embryonic rat dopamine neurons (DAN) is promoted by soluble Sema3C and Sema3C released by hydrogel in microfluidic devices. (A) Scheme of neurons cultured into the microfluidic device. (B) Immunostaining with β III Tubulin and TH antibodies shows that in the axonal compartment, there are more and larger DAX in Medium + Sema3C and Hydrogel + Sema3C conditions, compared to control medium and Hydrogel + Cp, respectively. In the soma compartment, the density of TH/β III Tubulin double-positive cells close to the zone of microgrooves is similar in all conditions. In the right panel, a low-magnification picture after live calcein staining is presented. In all cases, axons that entered the microgrooves were similar in number. The orange and blue boxes correspond to the areas in the soma and axonal compartments, respectively. (C) Quantification of total dopaminergic axonal length. Medium + Sema3C and Hydrogel + Sema3C conditions exert a similar effect on axonal growth, in contrast to control medium and Hydrogel + Cp, which had significantly lower levels. (D) In all conditions, the number of DAX that entered to the microgrooves was not statistically different. Mean ± standard error of mean ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 (one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparisons test). Scale bars: 100 and 300 μm (low-magnification image of calcein staining). Color images available online at www.liebertpub.com/tea

coupled to Cp (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); and (4) hydrogel coupled to Sema3C (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Calcein staining of live cells revealed that the cell density was similar in all conditions and that neurons group in clusters. A few growing axons of unknown identity can be observed entering and crossing to the axonal compartment (Fig. 3B).

β III Tubulin and TH staining after fixation allowed the identification of DAx. In medium alone, only a few TH+ axons reached the axonal compartment (Fig. 3B). In the case of soluble Sema3C, we observed an increase in the crossing DAx; remarkably, the length and number of branches also increased compared to controls (Fig. 3B). The hydrogel combined with Cp presented a similar growth as the medium alone. For the Sema3C-hydrogel condition, we found more axons with a higher structural complexity (Fig. 3B). We measured the length of TH+ axons that enter and those that crossed the microgrooves with the ImageJ software. Considering all DAx that enter the microgrooves, soluble Sema3C and Sema3C-hydrogel had significantly longer axons than the corresponding control groups (Fig. 3C). Hydrogel embedded with Cp increased the length of TH+ processes when compared to control medium. Notwithstanding, the hydrogel + Sema3C condition significantly extended 1.6-fold DAx relative to Cp. The average number of DAx that entered the microgrooves was not different between groups (Fig. 3D).

Dopamine neurons differentiated from human ES cells express NRP1 and NRP2 receptors

We differentiated GFP-expressing H9 human ES cells, according to a published protocol to produce DAN.⁵⁴ Using this protocol, after 28 days, 36.6% of neurons were TH+, and this proportion increased to 46.6% at day 35 of differentiation. To determine if DAN obtained from human ES cells express NRP1 or NRP2, receptors required to respond to Sema3C, we immunostained cells derived from the same cell suspension used for the assays with microfluidic devices presented below. At day 28, we quantified TH+ neurons and observed that NRP1 was present in 86% of DAN and 87.6% of cells were double-positive for NRP2 and TH. This high proportion was preserved in differentiated cultures of 35 days (Fig. 4), where we observed 88.8% and 90% of colocalization of TH with NRP1 or NRP2, respectively.

Sema3C released by hydrogel promotes dopaminergic axonal growth in neurons differentiated from human ES cells

At 21 days of differentiation, human ES cells were dissociated and plated on microfluidic devices. Immunostaining for β III Tubulin and TH showed that treatments with soluble Sema3C or Sema3C-hydrogel promoted the growth of more and larger DAx, in sharp contrast to treatments with medium only and hydrogel-Cp (Fig. 5A). In the soma compartment, the density of TH/ β III Tubulin double-positive neurons was similar in all conditions. The right column of Fig. 5A shows a low-magnification GFP image, where it can be appreciated that the proportion of axons that entered the microgrooves is similar in all conditions. The orange and blue boxes correspond to the areas in the soma and axonal compartments, respectively. Similar to the ob-

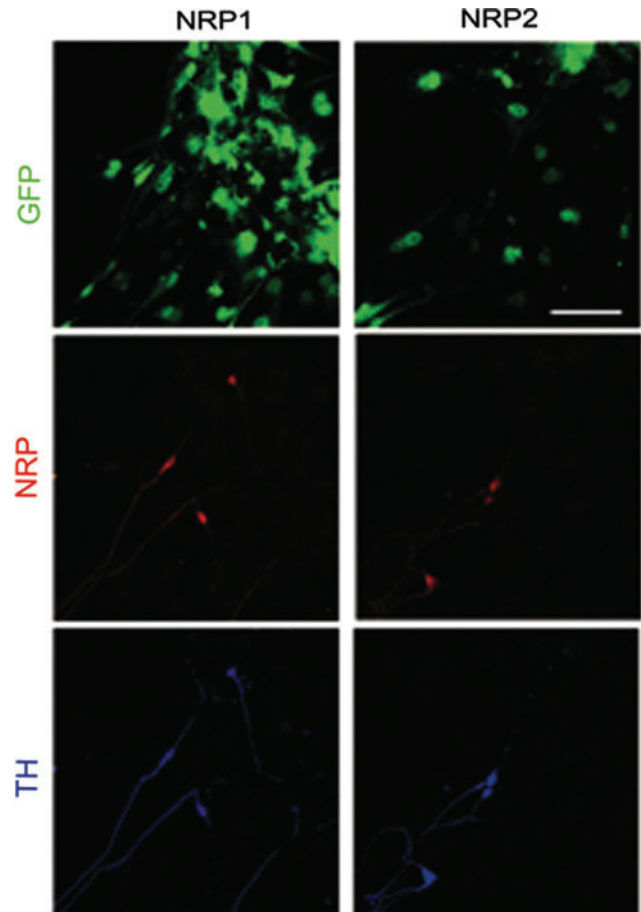


FIG. 4. Dopaminergic neurons differentiated from human embryonic stem (ES) cells express NRP1 and NRP2 in a high proportion. Immunostaining with specific antibodies for TH and either NRP1 or NRP2 shows that DAN from day 35 of differentiation presented a high proportion of cells positive for NRP1 and NRP2. GFP is also shown to observe cell density. Scale bar: 100 μm . Color images available online at www.liebertpub.com/tea

servations in the rat mesencephalic neurons, the average length of axons was significantly higher in soluble Sema3C and Sema3C-hydrogel than in their corresponding controls (Fig. 5B). The axons located in the microgrooves were similar in all studied conditions (Fig. 5C).

Discussion

In this study, we show that hydrogel-embedded Sema3C is released to the medium maintaining constant levels of the protein for at least 28 days. PuraMatrix was reported to incorporate and release different molecules such as basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, BDNF, bovine serum albumin, immunoglobulin G, and insulin.^{48,63,64} Our results confirm that proteins released by this hydrogel are functional as they exert the expected function *in vitro*.^{48,63} All these proteins have molecular weights between 7 and 38 kDa; Sema3C has a higher mass (82 kDa), but still can be released by PuraMatrix.

Using a three-dimensional collagen assay, we demonstrated *in vitro* that DAx of neurons differentiated from

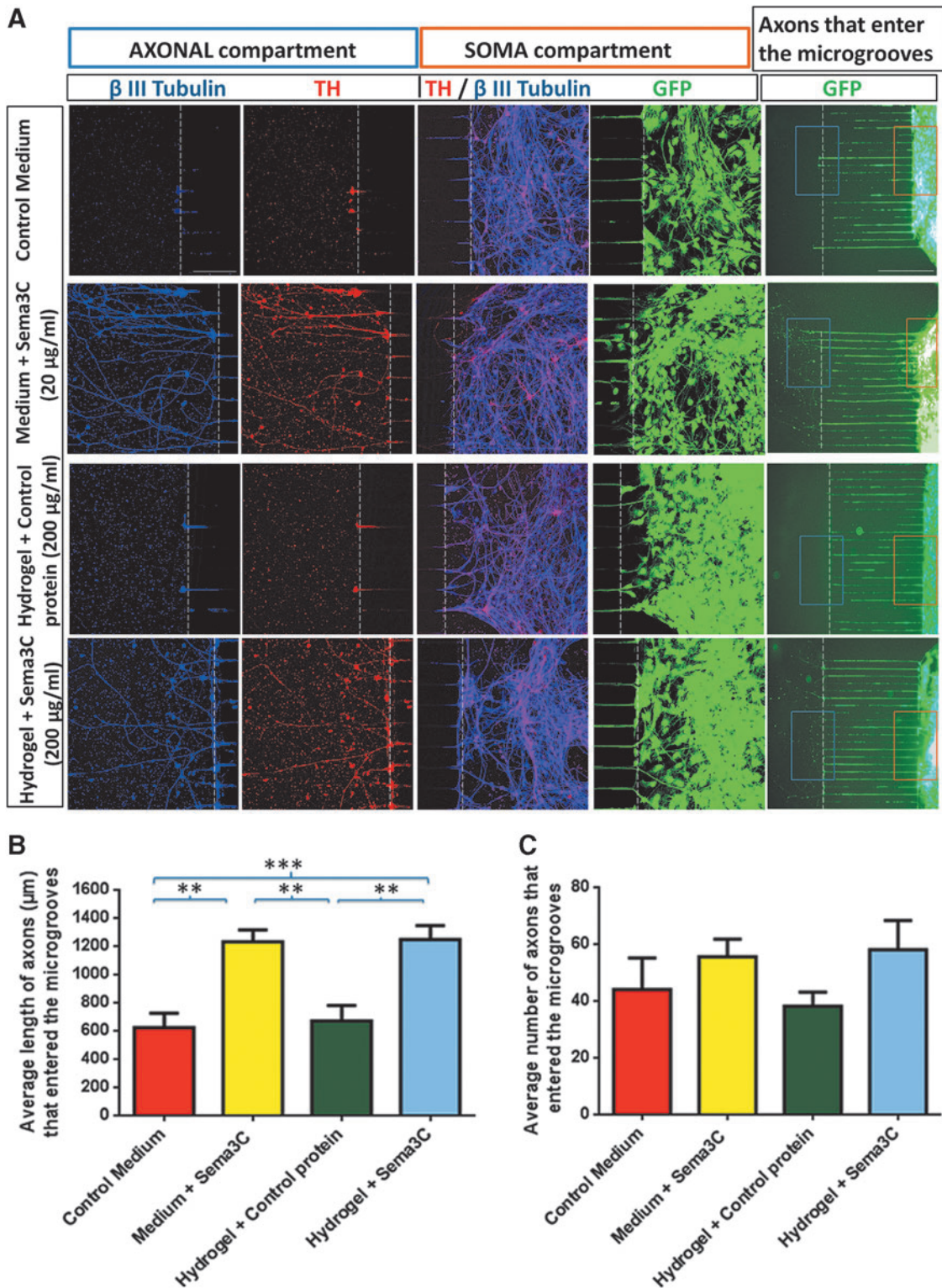


FIG. 5. The axonal growth of human ES cells differentiated to DAN is promoted by Sema3C. Dopamine cells were studied in microfluidic devices in control (medium alone or hydrogel-Cp) or Sema3C (either soluble or coupled to hydrogel) conditions. (A) Immunostaining for β III Tubulin and TH shows that in the axonal compartment, there are more DAx in Medium + Sema3C and in Hydrogel + Sema3C conditions, compared to control medium and Hydrogel + Cp, respectively. In the soma compartment, a similar density of neurons positive for both TH and β III Tubulin is found close to the zone of microgrooves. The H9 ES cells express GFP that was used to visualize cell density in the soma compartment. In the *right*-most panel, a low magnification picture of the GFP+ axons in the microgrooves is shown. Note that in Medium + Sema3C and Hydrogel + Sema3C conditions, many axons were larger than the microgroove length (900 μ m). (B) Quantification of total dopaminergic axonal length. Medium + Sema3C and Hydrogel + Sema3C conditions exert a positive effect in length, in contrast to control medium and Hydrogel + Cp, which had significantly shorter axons. (C) In all conditions, a similar number of DAx entered the microgrooves. Mean \pm standard error of mean $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ (one-way ANOVA following Tukey's multiple comparisons test). Scale bars: 100 and 300 μ m. Color images available online at www.liebertpub.com/tea

mouse ES cells are attracted by Sema3C released by aggregated HEK cells.¹⁰ The current study shows that the PT embryonic region exerts axonal attraction, in contrast to the Ist region, which does not. Exposure of Mb explants to hydrogels coupled to Sema3C generates a similar attractive effect to that observed in PT. Conversely, hydrogel with Cp has analogous effects to that of Ist explants. These results indicate that the use of hydrogel coupled to Sema3C guides DAx growth, with a comparable efficiency to PT, which attracts these axons during development. Using a similar methodological approach, other groups have demonstrated that Netrin-1 exerts dopaminergic axonal attraction.^{12,14,16} To our knowledge, the current report is the first in which an hydrogel alone is able to deliver a molecule that guides dopaminergic axonal growth. Some articles showed that hydrogels can be used as scaffolds that require the combination with other particles that release molecules *in vitro*: a scaffold of synthetic poly(ethylene glycol) gel conjugated with biodegradable poly-lactic-co-glycolic acid particles with different concentrations of insulin-like growth factor directed the axonal growth of mouse ES cell-derived neurons.⁶⁵ An increase of the axonal length of peripheral nervous system neurons with a scaffold of agarose hydrogel, combined with collagen and poly-lactic-co-glycolic acid particles that released nerve growth factor (NGF), has been also demonstrated.⁶⁶ On the contrary, the guidance of axons during development is influenced by several molecules that interplay, sometimes with opposite effects, to direct axonal growth. The use of a choice point system allows the assessment of various cues simultaneously. A device based on immobilized and soluble proteins with different gradients was recently developed to test the effects of Sema6A and NGF on the axonal growth of dorsal root ganglia.⁶⁷ Sema6A induces repulsion of neurite growth of sensory neurons of the lumbosacral region, but not other spinal regions, and NGF can attenuate this effect.

Collagen gels have been used previously to evaluate axonal growth.¹¹ In such a matrix, axons can develop in all directions, making difficult to follow a trajectory in one plane. Thus, the measurement even with specialized software can be challenging. Therefore, we decided to use microfluidic devices, in which axons follow a linear trajectory for 900 μm in one plane. This system has been used to evaluate the effect of diffusible molecules on growing axons.^{61,62} In this work, we specifically looked at the effects of Sema3C using these devices, which unequivocally identify growing axons. Using DAN of rodent and human origin, we found that exposure of such neurons to hydrogel embedded with Sema3C results in an increase of DAx length, similar to soluble Sema3C. Therefore, Sema3C released by PuraMatrix seems to be equally functional as the soluble form, with regard to promotion of DAx growth, although with a 10-fold higher initial concentration. It is noteworthy that the times required to observe axonal growth in rodent and human neurons were different. PuraMatrix-released Sema3C was effective for rat cells (5 days) and also for human neurons (15 days), strongly suggesting that the delivery time of Sema3C by the hydrogel was optimal for these assays.

Microfluidic devices have been used to isolate axons of neurons differentiated from human ES cells, to observe mitochondrial movement across axons,⁶⁸ to evaluate axonal injury, regeneration, and transport,⁶² to assess differentiation

and neuronal entrance to microgrooves,⁶⁹ and to identify bidirectional communication between motor neurons and muscle cells.⁷⁰ Microfluidic systems with different characteristics in design have also been successfully used for generating chemical gradients and evaluating axonal growth cone responses.⁷¹ Previous data from our group have indicated that Sema3C increases DAx growth *in vitro*¹¹ of DAN obtained from mouse ES. This is the first report on the positive effects of Sema3C on DAN derived from human ES cells, suggesting similar responses between human and rodent cells. We show that the dopaminergic differentiation protocol for human cells⁵⁴ used in this study, as well as the protocol for rodent cells used previously,²¹ generates DAN neurons that respond to Sema3C. In fact, this response of human DAN was correlated with a high proportion of TH+ neurons that express the Sema3C receptors NRP1 and NRP2.

Previously, the presence of NRP1 and NRP2 has been demonstrated in DAN obtained from the developing rat ventral Mb and DAN differentiated from mouse ES. These rodent DAN presented similar high proportions of TH+ neurons that express NRP1 (77% for rat and 82% for mouse) or NRP2 (48 for rat and 59% for mouse). Blocking antibodies for these receptors inhibit the action of Sema3C on attraction and axonal extension.¹¹ Therefore, it was of interest to analyze if human DAN express NRP1 and NRP2 since no previous reports were available. Our results show that approximately 90% of DAN derived from human ES presented immunoreactivity to anti-NRP1 or anti-NRP2 antibodies, suggesting that the effects of Sema3C to promote axonal growth are mediated by these receptors.

Grafting DAN into the striatum of parkinsonian rats provides recovery in apomorphine- or amphetamine-induced rotational test.²⁰⁻²⁵ However, this ectopic graft induces behavioral complications such as increasing levodopa-induced dyskinesias.^{72,73} Furthermore, grafts in the putamen do not cause a consistent and steady recovery in PD patients.^{26,27} An alternative to such ectopic grafts in experimental animals is placing DAN in the SN and guiding DAx to reach the dorsal striatum. Previous data from our group have demonstrated that the intranigral graft of DAN derived from mouse ES cells, combined with HEK cells transfected with Sema3C, along an artificial trajectory from SN to striatum, promotes behavioral recovery of parkinsonian rats lesioned with 6-OHDA after 3 weeks.²⁵ We report that Sema3C release was maintained during 4 weeks *in vitro*, so we can speculate that the use of this biomaterial scaffold could replace HEK cells to promote and guide axonal growth *in vivo*.

We used a biocompatible and biodegradable hydrogel that has been implanted into rodent brain^{36,43,47} with negligible glial reaction. This is a key issue, because hydrogels should incorporate and release proteins but without adverse tissue reactions. For example, a Poly-(ethylene glycol)-silica hydrogel has been used to release Sema3A, which *in vitro* promotes DAx growth; however, when it was implanted into the rat brain, the hydrogel produced an inflammatory response.⁷⁴ Our results suggest that it might be possible to use PuraMatrix combined with Sema3C to promote and guide axonal growth in animal models of PD, using of DAN differentiated from human ES cells.

In addition to the effect of Sema3C on axonal growth, this protein can influence the development of new vessels, which has implications on vision. Sema3C inhibits the formation

of pathological endothelial tufts in an animal model of retinopathy of prematurity. This protein, acting through NRP1 and Plexin D1, prevented AKT- and P38 MAPK-induced phosphorylations, resulting in apoptosis of developing microvasculature, decreased branching, loss of sprouting tips, and abnormal cell junctions.⁷⁵ It might be of interest to test if the controlled release of Sema3C by a hydrogel could be applied in this model.

Conclusion

In this study, we demonstrate that Sema3C can be embedded in the PuraMatrix hydrogel and this protein is released for at least 28 days *in vitro*. Hydrogel-released Sema3C can attract the growth of rodent embryonic DAX in a similar way to that of PT in collagen gels and also increases the axonal growth of human and rodent DAN. Remarkably, the response of these human neurons to Sema3C is very similar to that of rodent cells. This is the first time that a hydrogel is used as a protein carrier to increase dopaminergic axonal length.

Acknowledgments

The work in the laboratory of I.V. is supported by grants from Conacyt (131281 and Red Temática Células Troncales y Medicina Regenerativa) and Papiit-UNAM (IN208713 and IN213716). O.A.C.-M. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship 256229 from Conacyt. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of O.A.C.-M., V.R.-M. is supported by the FIS/ISCIH-FEDER CP12/03175 and PI14/01412. The support of Dr. J. Adolfo García-Sáinz to obtain human ES cells is highly appreciated. We thank Dr. Alfredo Varela Echavarría for technical support in collagen extraction and donation of antibodies for Neuropilin1 and Neuropilin2. We also thank the technical support of Dr. Daniel Cortés, Dr. Humberto Gutiérrez and Dr. Fabián Díaz.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Liu, B.P., and Strittmatter, S.M. Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 619, 2001.
- Goldberg, J.L. How does an axon grow? *Genes Dev* **17**, 941, 2003.
- Chisholm, A., and Tessier-Lavigne, M. Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 603, 1999.
- Luo, Y., Raible, D., and Raper, J.A. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* **75**, 217, 1993.
- Castellani, V., Chédotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., and Rougon, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* **27**, 237, 2000.
- Steinbach, K., Volkmer, H., and Schlosshauer, B. Semaphorin 3E/Collapsin-5 inhibits growing retinal axons. *Exp Cell Res* **279**, 52, 2002.
- Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J., Otsmane, B., Parras, C., *et al.* Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS Biol* **7**, 1, 2009.
- Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Sophie, C., *et al.* VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* **2**, 205, 2010.
- Torre, E.R., Gutekunst, C.A., and Gross, R.E. Expression by midbrain dopamine neurons of Sema3A and 3F receptors is associated with chemorepulsion *in vitro* but a mild *in vivo* phenotype. *Mol Cell Neurosci* **44**, 135, 2010.
- Hernández-Montiel, H.L., Tamariz, E., Sandoval-Minero, M.T., and Varela-Echavarría, A. Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon. *J Comp Neurol* **506**, 387, 2008.
- Tamariz, E., Díaz-Martínez, N.E., Díaz, N.F., García-Peña, C.M., Velasco, I., and Varela-Echavarría, A. Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *J Neurosci Res* **88**, 971, 2010.
- Lin, L., Rao, Y., and Isacson, O. Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* **28**, 547, 2005.
- Dugan, J.P., Stratton, A., Riley, H.P., Farmer, W.T., and Mastick, G.S. Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals. *Mol Cell Neurosci* **46**, 347, 2011.
- Kim, M., Farmer, W.T., Bjorke, B., McMahon, S.A., Fabre, P.J., Charron, F., *et al.* Pioneer midbrain longitudinal axons navigate using a balance of Netrin attraction and Slit repulsion. *Neural Dev* **9**, 1, 2014.
- Kastenhuber, E., Kern, U., Bonkowsky, J.L., Chien, C.-B., Driever, W., and Schweitzer. J. Netrin-DCC, Robo-Slit, and heparan sulfate proteoglycans coordinate lateral positioning of longitudinal dopaminergic diencephalospinal axons. *J Neurosci* **29**, 8914, 2009.
- Li, J., Duarte, T., Kocabas, A., Works, M., McConnell, S.K., and Hynes, M.A. Evidence for topographic guidance of dopaminergic axons by differential Netrin-1 expression in the striatum. *Mol Cell Neurosci* **61**, 85, 2014.
- Gurgo, R.D., Bedi, K.S., and Nurcombe, V. Current concepts in central nervous system regeneration. *J Clin Neurosci* **9**, 613, 2002.
- Yiu, G., and He, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* **7**, 617, 2006.
- Fitch, M.T., and Silver, J. CNS injury, glial scars, and inflammation: inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* **209**, 294, 2008.
- Rodríguez-Gómez, J.A., Lu, J.-Q., Velasco, I., Rivera, S., Zoghbi, S.S., Liow, J.-S., *et al.* Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* **25**, 918, 2007.
- Kim, J.-H., Auerbach, J.M., Rodríguez-Gómez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50, 2002.
- Baier, P.C., Schindehütte, J., Thinyane, K., Flügge, G., Fuchs, E., Mansouri, A., *et al.* Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation

- of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. *Stem Cells* **22**, 396, 2004.
23. Yurek, D.M., and Fletcher-Turner, A. Comparison of embryonic stem cell-derived dopamine neuron grafts and fetal ventral mesencephalic tissue grafts: morphology and function. *Cell Transpl* **13**, 295, 2004.
 24. Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramouille, Y., *et al.* Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* **15**, 653, 2014.
 25. Díaz-Martínez, N.E., Tamariz, E., Díaz, N.F., García-Peña, C.M., Varela-Echavarría, A., and Velasco, I. Recovery from experimental parkinsonism by semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. *Mol Ther* **21**, 1579, 2013.
 26. Olanow, C.W., Goetz, C.G., Kordower, J.H., Stoessel, A.J., Sossi, V., Brin, M.F., *et al.* A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**, 403, 2003.
 27. Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.-Y., DuMouchel, W., Kao, R., *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**, 710, 2001.
 28. Mendez, I., Sadi, D., and Hong, M. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J Neurosci* **16**, 7216, 1996.
 29. Mukhida, K., Baker, K.A., Sadi, D., and Mendez, I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci* **21**, 3521, 2001.
 30. Olsson, M., Nikkha, G., Bentlage, C., and Björklund, A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* **15**, 3863, 1995.
 31. Aurand, E.R., Lampe, K.J., and Bjugstad, K.B. Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering. *Neurosci Res* **72**, 199, 2012.
 32. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* **64**, 18, 2012.
 33. Jeong, B., Bae, Y.H., and Kim, S.W. In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof. *J Biomed Mater Res* **50**, 171, 2000.
 34. He, S., Yaszemski, M.J., Yasko, A.W., Engel, P.S., and Mikos, A.G. Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)-dimethacrylate. *Biomaterials* **21**, 2389, 2000.
 35. Nagai, Y., Unsworth, L.D., Koutsopoulos, S., and Zhang, S. Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold. *J Control Release* **115**, 18, 2006.
 36. Ellis-Behnke, R.G., Liang, Y.-X., You, S.-W., Tay, D.K.C., Zhang, S., So, K.-F., *et al.* Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5054, 2006.
 37. Carballo-Molina, O.A., and Velasco, I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Front Cell Neurosci* **9**, 13, 2015.
 38. Fon, D., Al-Aboodi, A., Chan, P.P.Y., Zhou, K., Crack, P., Finkelstein, D.I., *et al.* Effects of GDNF-loaded injectable gelatin-based hydrogels on endogenous neural progenitor cell migration. *Adv Healthc Mater* **3**, 761, 2014.
 39. Jain, A., Kim, Y.-T., McKeon, R.J., and Bellamkonda, R. V. In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury. *Biomaterials* **27**, 497, 2006.
 40. Burdick, J.A., Ward, M., Liang, E., Young, M.J., and Langer, R. Stimulation of neurite outgrowth by neurotrophins delivered from degradable hydrogels. *Biomaterials* **27**, 452, 2006.
 41. Banerjee, A., Arha, M., Choudhary, S., Ashton, R.S., Bhatia, S.R., Schaffer, D. V., *et al.* The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials* **30**, 4695, 2009.
 42. Egawa, E.Y., Kato, K., Hiraoka, M., Nakaji-Hirabayashi, T., and Iwata, H. Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor. *Biomaterials* **32**, 4737, 2011.
 43. Cheng, T., Chen, M., Chang, W., Huang, M., and Wang, T. Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering. *Biomaterials* **34**, 2005, 2013.
 44. Novikova, L.N., Mosahebi, A., Wiberg, M., Terenghi, G., Kellner, J., and Novikov, L.N. Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A* **77**, 242, 2006.
 45. Ortinau, S., Schmich, J., Block, S., Liedmann, A., Jonas, L., Weiss, D.G., *et al.* Effect of 3D-scaffold formation on differentiation and survival in human neural progenitor cells. *Biomed Eng Online* **9**, 70, 2010.
 46. Holmes, T.C., de Lacalle, S., Su, X., Liu, G., Rich, A., and Zhang, S. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6728, 2000.
 47. Guo, J., Leung, K.K., Su, H., Yuan, Q., Wang, L., Chu, T.-H., *et al.* Self-assembling peptide nanofiber scaffold promotes the reconstruction of acutely injured brain. *Nanomedicine* **5**, 345, 2009.
 48. Gelain, F., Unsworth, L.D., and Zhang, S. Slow and sustained release of active cytokines from self-assembling peptide scaffolds. *J Control Release* **145**, 231, 2010.
 49. Yokoi, H., Kinoshita, T., and Zhang, S. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8414, 2005.
 50. Guthrie, S., and Lumsden, A. Collagen gel coculture of neural tissue. *Neuroprotocols* **4**, 116, 1994.
 51. Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.-C.F., Steiner, P., Hirling, H., and Unser, M. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* **58A**, 167, 2004.
 52. Schmidt, E.R.E., Morello, F., and Pasterkamp, R.J. Dissection and culture of mouse dopaminergic and striatal explants in three-dimensional collagen matrix assays. *J Vis Exp* **61**, e3691, 2012.
 53. Ramos-Mejía, V., Navarro-Montero, O., Bueno, C., Romero, T., Real, P.J., and Menendez, P. HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood* **124**, 3065, 2014.
 54. Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., *et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **480**, 547, 2011.
 55. Kolodkin, A.L., Levengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y., Giger, R.J., and Ginty, D.D. Neuropilin is a Semaphorin III receptor. *Cell* **90**, 753, 1997.
 56. Koutsopoulos, S., and Zhang, S. Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide

- hydrogels, matrigel and collagen I. *Acta Biomater* **9**, 5162, 2013.
57. Yoshii, S., Oka, M., Shima, M., Taniguchi, A., Taki, Y., and Akagi, M. Restoration of function after spinal cord transection using a collagen bridge. *J Biomed Mater Res A* **70**, 569, 2004.
 58. Xu, T., Molnar, P., Gregory, C., Das, M., Boland, T., and Hickman, J.J. Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. *Biomaterials* **30**, 4377, 2009.
 59. Gil, V., del Río, J.A. Analysis of axonal growth and cell migration in 3D hydrogel cultures of embryonic mouse CNS tissue. *Nat Protoc* **7**, 268, 2012.
 60. Wakita, S., Izumi, Y., Matsuo, T., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Sawada, H., *et al.* Reconstruction and quantitative evaluation of dopaminergic innervation of striatal neurons in dissociated primary cultures. *J Neurosci Methods* **192**, 83, 2010.
 61. Kim, H.J., Park, J.W., Park, J.W., Byun, J.H., Vahidi, B., Rhee, S.W., *et al.* Integrated microfluidics platforms for investigating injury and regeneration of CNS axons. *Ann Biomed Eng* **40**, 1268, 2012.
 62. Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., and Jeon, N.L. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* **2**, 599, 2005.
 63. Nishimura, A., Hayakawa, T., Yamamoto, Y., Hamori, M., Tabata, K., Seto, K., *et al.* Controlled release of insulin from self-assembling nanofiber hydrogel, PuraMatrixTM: application for the subcutaneous injection in rats. *Eur J Pharm Sci* **45**, 1, 2012.
 64. Koutsopoulos, S., Unsworth, L.D., Nagai, Y., and Zhang, S. Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4623, 2009.
 65. Lee, W., Frank, C.W., and Park, J. Directed axonal outgrowth using a propagating gradient of IGF-1. *Adv Mater* **26**, 4936, 2014.
 66. Alsmadi, N.Z., Patil, L.S., Hor, E.M., Lofti, P., Razal, J.M., Chuong, C.-J., *et al.* Coiled polymeric growth factor gradients for multi-luminal neural chemotaxis. *Brain Res* **1619**, 72, 2015.
 67. Curley, J.L., Catig, G.C., Horn-Ranney, E.L., and Moore, M.J. Sensory axon guidance with semaphorin 6A and nerve growth factor in a biomimetic choice point model. *Biofabrication* **6**, 035026, 2014.
 68. Shin, H.S., Kim, H.J., Min, S.K., Kim, S.H., Lee, B.M., and Jeon, N.L. Compartmental culture of embryonic stem cell-derived neurons in microfluidic devices for use in axonal biology. *Biotechnol Lett* **32**, 1063, 2010.
 69. Lee, N., Park, J.W., Kim, H.J., Yeon, J.H., Kwon, J., Ko, J.J., *et al.* Monitoring the differentiation and migration patterns of neural cells derived from human embryonic stem cells using a microfluidic culture system. *Mol Cells* **37**, 497, 2014.
 70. Zahavi, E.E., Ionescu, A., Gluska, S., Gradus, T., Ben-Yaakov, K., and Perlson, E. A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system reveals spatial aspects of GDNF functions. *J Cell Sci* **128**, 1241, 2015.
 71. Wang, J.C., Li, X., Lin, B., Shim, S., Ming, G.-L., and Levchenko, A. A microfluidics-based turning assay reveals complex growth cone responses to integrated gradients of substrate-bound ECM molecules and diffusible guidance cues. *Lab Chip* **8**, 227, 2008.
 72. Steece-Collier, K., Collier, T.J., Danielson, P.D., Kurlan, R., Yurek, D.M., and Sladek, J.R. Embryonic mesencephalic grafts increase levodopa-induced forelimb hyperkinesia in parkinsonian rats. *Mov Disord* **18**, 1442, 2003.
 73. Maries, E., Kordower, J.H., Chu, Y., Collier, T.J., Sortwell, C.E., Olanow, E., *et al.* Focal not widespread grafts induce novel dyskinetic behavior in parkinsonian rats. *Neurobiol Dis* **21**, 165, 2006.
 74. Tamariz, E., Wan, A.C.A., Pek, Y.S., Giordano, M., Hernández-Padrón, G., Varela-Echavarría, A., *et al.* Delivery of chemotropic proteins and improvement of dopaminergic neuron outgrowth through a thixotropic hybrid nano-gel. *J Mater Sci Mater Med* **22**, 2097, 2011.
 75. Yang, W., Hu, J., Uemura, A., Tetzlaff, F., Augustin, H.G., and Fischer, A. Semaphorin-3 C signals through Neuropilin-1 and PlexinD 1 receptors to inhibit pathological angiogenesis. *EMBO Mol Med* **7**, 1267, 2015.

Address correspondence to:

Iván Velasco, PhD
Instituto de Fisiología Celular-Neurociencias
Universidad Nacional Autónoma de México
México D.F.-04510
México

E-mail: ivelasco@ifc.unam.mx

Received: January 8, 2016

Accepted: May 12, 2016

Online Publication Date: June 1, 2016



Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries

Oscar A. Carballo-Molina and Iván Velasco *

Instituto de Fisiología Celular-Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F., Mexico

Edited by:

Victoria Campos, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico

Reviewed by:

Ertugrul Kilic, Istanbul Medipol University, Turkey
Carlo Di Cristo, University of Sannio, Italy

*Correspondence:

Iván Velasco, Instituto de Fisiología Celular-Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, México, D.F.-04510, México
e-mail: ivelasco@ifc.unam.mx

Damage caused to neural tissue by disease or injury frequently produces a discontinuity in the nervous system (NS). Such damage generates diverse alterations that are commonly permanent, due to the limited regeneration capacity of the adult NS, particularly the Central Nervous System (CNS). The cellular reaction to noxious stimulus leads to several events such as the formation of glial and fibrous scars, which inhibit axonal regeneration in both the CNS and the Peripheral Nervous System (PNS). Although in the PNS there is some degree of nerve regeneration, it is common that the growing axons reinnervate incorrect areas, causing mismatches. Providing a permissive substrate for axonal regeneration in combination with delivery systems for the release of molecules, which enhances axonal growth, could increase regeneration and the recovery of functions in the CNS or the PNS. Currently, there are no effective vehicles to supply growth factors or cells to the damaged/diseased NS. Hydrogels are polymers that are biodegradable, biocompatible and have the capacity to deliver a large range of molecules *in situ*. The inclusion of cultured neural cells into hydrogels forming three-dimensional structures allows the formation of synapses and neuronal survival. There is also evidence showing that hydrogels constitute an amenable substrate for axonal growth of endogenous or grafted cells, overcoming the presence of axonal regeneration inhibitory molecules, in both the CNS and PNS. Recent experiments suggest that hydrogels can carry and deliver several proteins relevant for improving neuronal survival and axonal growth. Although the use of hydrogels is appealing, its effectiveness is still a matter of discussion, and more results are needed to achieve consistent recovery using different parameters. This review also discusses areas of opportunity where hydrogels can be applied, in order to promote axonal regeneration of the NS.

Keywords: axotomy, growth factors, injury response, grafting, surgical intervention

INTRODUCTION

The nervous system (NS) is responsible for the interaction between organisms and their environment; it confers the ability to respond to external stimuli. However, when an injury occurs in this system, such ability is impaired. Understanding fundamental mechanisms involved in the response to damage might be used to design therapeutic interventions aimed to promote functional recovery. Axonal regeneration capacity is very limited in the Central Nervous System (CNS; Gurgo et al., 2002; Case and Tessier-Lavigne, 2005). Although the Peripheral Nervous System (PNS) is able to grow axons after a nerve injury, the lost function is not always restored, because the regenerated axons are unable to reinnervate areas previously connected by them (Johnson et al., 2005). This review describes first the elements that impede axonal regeneration following injury in CNS and PNS, and later discuss how hydrogels might attenuate the inhibitory elements for axonal regeneration in both systems.

NERVOUS SYSTEM RESPONSE TO INJURY AND ITS ROLE IN AXONAL GROWTH INHIBITION

An injury in the NS could imply a loss of tissue, interrupted communication caused by damage of synaptic contacts or disrupted information flow between cell soma and axons. Different events occur after NS damage, depending on several factors, such as the type of injury. Many of these events are responsible for the inhibitory environment during axonal regeneration. We next describe the differential responses to lesion of CNS and PNS.

CNS

Glial and fibrous scar formation

The disruption of the blood brain barrier (BBB) after damage allows the infiltration of blood proteins to the CNS, which triggers an inflammatory reaction (Kawano et al., 2012). White cells and macrophages enter through the lesion site and migrate to the surrounding neural tissue, releasing various cytokines

and chemokines (Merrill and Benveniste, 1996; Donnelly and Popovich, 2008). These events lead to the activation of astrocytes, microglia and oligodendrocyte progenitor cells, to form the glial scar around the lesion site (Shearer and Fawcett, 2001; Kawano et al., 2012; **Figure 1A**). These activated cells release different molecules involved in inflammation, BBB restoration and neuroprotection (Yiu and He, 2006; Rolls et al., 2009). Glial scar isolates the damage area from adjacent tissue (**Figure 1A**); this contributes to maintaining homeostatic functions as ion and fluids balances, production of pro- and anti-inflammatory molecules, secretion of growth factors and free radicals elimination (Yiu and He, 2006; Rolls et al., 2009). In addition, a fibrotic scar (**Figure 1A**), which is produced by the intrusion of fibroblasts from the damaged meninges and that release extracellular matrix (ECM) proteins such as type IV Collagen, Fibronectin and Laminin, also forms around the site of lesion (Kawano et al., 2012). Moreover, fibroblasts and astrocytes cooperate to establish a continuous basal lamina around the glial scar (Mathewson and Berry, 1985; Shearer and Fawcett, 2001). The barrier formed by the glial and fibrous scars helps to contain the damage, preventing it from spreading and affecting surrounding tissue. The functions of these barriers are not fully understood yet, but their inhibitory effect on axonal growth has been extensively documented (Fawcett and Asher, 1999; Sandvig et al., 2004; Silver and Miller, 2004; Yiu and He, 2006; Fitch and Silver, 2008).

Inhibitory elements for axonal growth

Various elements have been described as being responsible of the adverse environment for axonal growth. The glial scar constitutes a physical barrier that impedes passage of axons across the lesion site (**Figure 1A**). In addition, the activated glial cells in the scar secrete ECM components, especially chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs) such as Neurocan, Brevican, Versican and NG2 (Fawcett and Asher, 1999; Tang et al., 2003), which exert an inhibitory influence on axonal growth (Shearer and Fawcett, 2001; Tang et al., 2003; Silver and Miller, 2004). Activation of Rho small GTPase proteins which are recognized by CSPGs blocks actin polymerization in growing neurites (Sandvig et al., 2004; Díaz-Martínez and Velasco, 2009). Some of the inhibitory molecules over-expressed in the site of lesion are Myelin-associated glycoprotein, Oligodendrocyte-myelin glycoprotein, Nogo protein and its receptor Nogo-66, Semaphorin 4D, Ephrin B3 (Kawano et al., 2012), Semaphorin 3D (Pasterkamp et al., 1999) and Ephrin B2 (Bundesen et al., 2003). The lesion site has been shown to secrete chemo-repulsive molecules like Tenascin (McKeon et al., 1991) and Semaphorin 3A (Pasterkamp et al., 1999). The fibrotic scar also produces inhibitory elements: it has been reported that fibroblasts express NG2 proteoglycan (Tang et al., 2003), Phosphocan (Tang et al., 2003), Tenascin-C (Tang et al., 2003), Semaphorin 3A (Pasterkamp et al., 1999) and Ephrin B2 (Bundesen et al., 2003). These data indicate that glial and fibrous scars contribute to the low rate of axonal regeneration. One option to bypass these inhibitory effects would be to prevent scar formation, but this could imply secondary effects, such as spreading of the damage. Alternatively, a modification of the

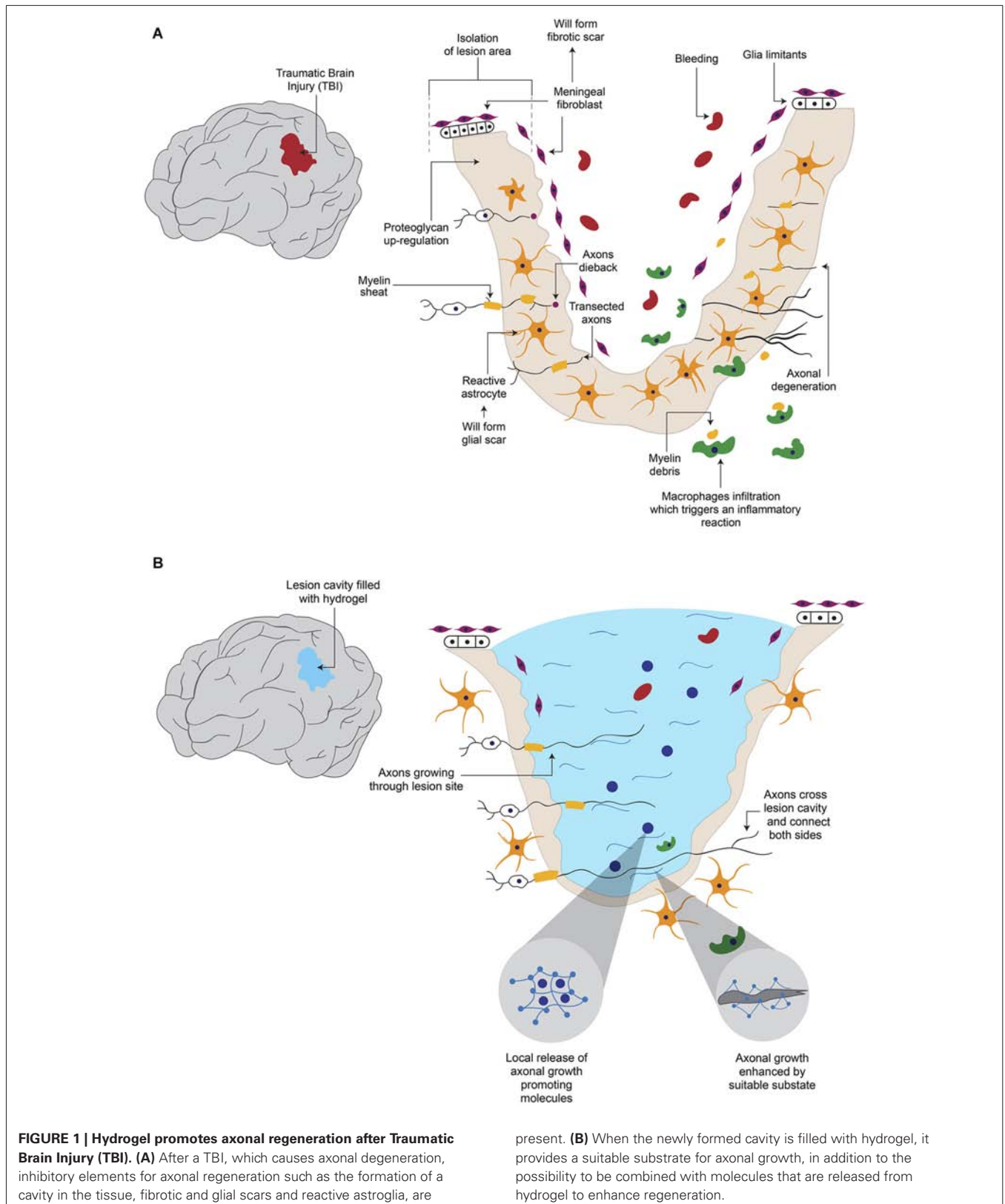
lesion environment by introducing a device that is a permissive for axonal growth is feasible.

PNS

The damage produce diverse signals that indicate the neuronal cell to either go into regeneration processes or to undergo programmed cell death (Maripuu et al., 2012). Ca^{2+} entry (Maripuu et al., 2012) and the interruption of the retrograde transport system are the initial signals of neuronal damage (Dahlin, 2008). Damage to axons also release growth factors such as Ciliary Neurotrophic Factor, Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 in the site of injury (Hanz and Fainzilber, 2006; Raivich and Makwana, 2007). After a peripheral axon is cut or crushed, the distal part of the severed axon suffers a degenerative processes (**Figure 2A**) termed Wallerian degeneration (Mietto et al., 2008; Freeman, 2014), that consists in the degradation of axonal organelles and proteins, and disintegration of axonal structures (Mietto et al., 2008). In order to obtain successful axon regeneration, activation and proliferation of Schwann cells (SC) are needed (Dahlin, 2008). SC and macrophages phagocytose the disrupted myelin sheath and cell debris (**Figure 2A**) to clear the zone (Johnson et al., 2005). In addition, SC have been shown to provide a favorable substrate for regenerating axons (Maripuu et al., 2012). As a part of the regenerative processes, several axon growth cones emerge from the proximal stump (**Figure 2A**) and their growth is guided by Bugner bands, which are SC apposed around the basement membrane (Valls-Sole et al., 2011). Basement membrane is constituted by ECM proteins such as Laminin and contributes to the adhesion and guidance of cells during development (Silver and Miller, 2004). These emerging sprouts grow to reach the distal stump across the site of lesion. However, because the adverse environment, most of these developments disperse in various directions and become abortive (Johnson et al., 2005; Valls-Sole et al., 2011; **Figure 2A**). The few sprouts that successfully reach the distal stump grow in close apposition with SC (Johnson et al., 2005). To complete this processes, the regenerated axon is myelinated by SC to produce junctional nodes of Ranvier and internodal Schmidt-Lanterman incisures (Johnson et al., 2005). After the regeneration process, SC release Nerve Growth Factor (NGF) and Glial cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) in the regenerated site (Maripuu et al., 2012).

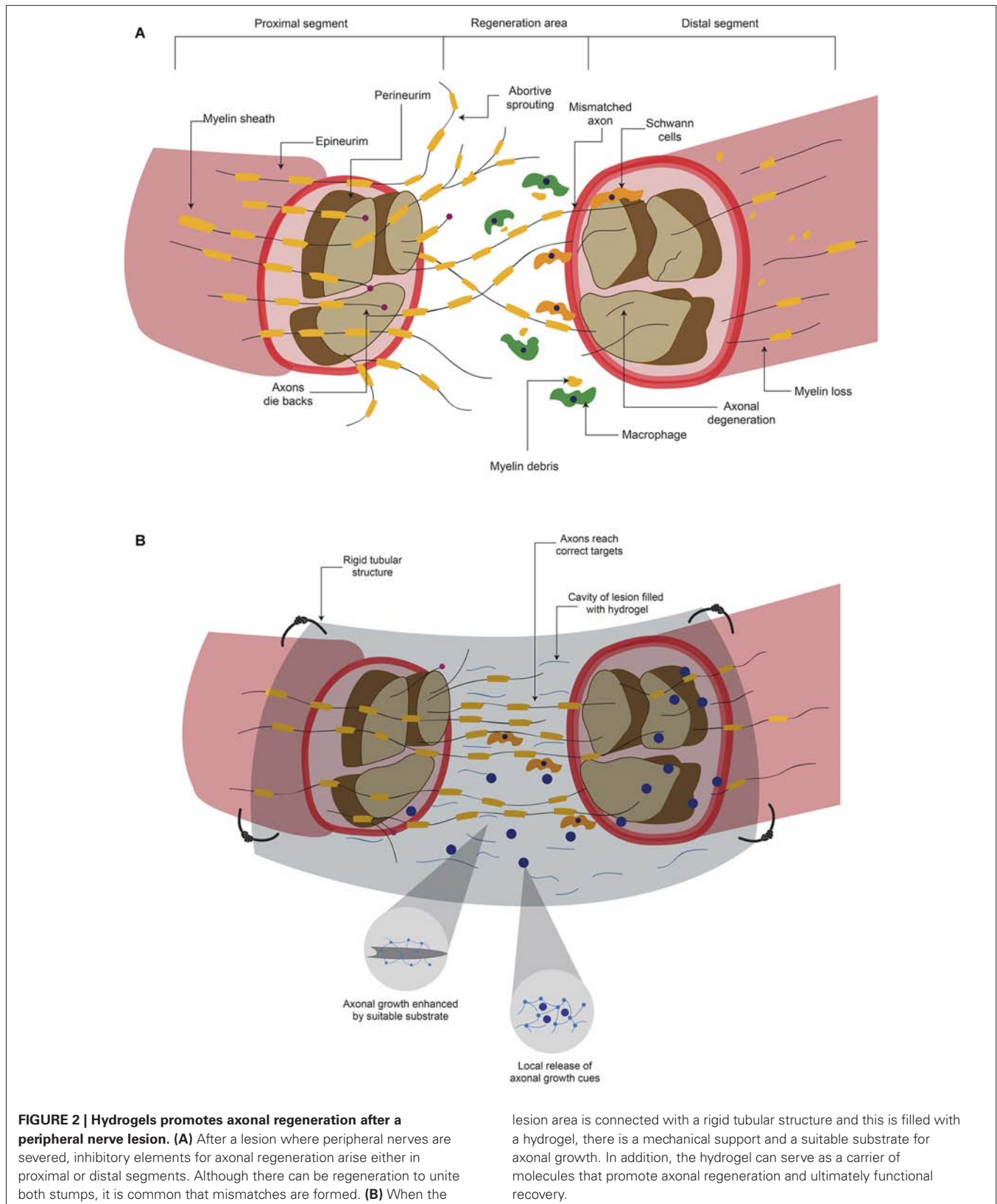
Elements involved in the axonal regeneration process in the clinic

Although the PNS has some regeneration capacity, functional restoration is not always achieved (Hill et al., 2011; Valls-Sole et al., 2011). Factors involved in the recovery are age (Lundborg and Rosén, 2001; Ruijs et al., 2005), the period of time between injury and medical assistance (Ruijs et al., 2005), the type of nerve that is damaged and the magnitude of injury (Lundborg, 2004); for example, when the lesion consists in a moderate compression, the chances of regeneration are higher (Lundborg, 2004) than when the axon has been transected (Maripuu et al., 2012). Current treatments trying to reconnect the severed nerve offer a low success rate. One major problem in these surgical procedures is that axons do not innervate the correct area, since many axons



compete to connect and this lead to loss of selectivity (Valls-Sole et al., 2011). These mismatches could convey disturbances in

signaling between CNS neurons and PNS neurons, which result in sensorimotor alterations (Valls-Sole et al., 2011). Although



PNS has more permissive environment in contrast to CNS, the majority of regeneration processes do not reach to innervate

the pre-lesional area (**Figure 2A**), which leads to several adverse consequences.

SCAFFOLDS THAT PROMOTE AND GUIDE AXONAL GROWTH BIOMATERIALS

Biomaterials possess properties that make them biocompatible, meaning that they do not produce cytotoxic or immunologic reactions; their components should be susceptible to modifications, and the process of its production ideally should be easy and reliable (Holmes, 2002). It is important to mention that the specific requirements will dictate the origin of biomaterials. Natural biomaterials such as collagen matrix mimic largely the extracellular environment. However, natural materials present disadvantages such as lot variability (Zhang et al., 2005b), the generation of immune reactions and they may contain pathogenic agents (Holmes, 2002). On the other hand, synthetic materials can have a more consistent quality control but are not always compatible with host tissue (Metcalf and Ferguson, 2007). Other advantages of synthetic materials are that they are free of pathogenic agents (Holmes, 2002) and could be readily modified in order to elicit a tissue response, for example, it is possible to add the isoleucine-lysine-valine-alanine-valine (IKVAV) motif which enhances cellular adhesion (Cheng et al., 2013).

SCAFFOLDS

The purpose of implanting a biomaterial in a tissue is to provide suitable physical support to cells in order to achieve regeneration. This substrate should mimic as much as possible the natural matrix, so it should constitute a three-dimensional (3D) structure with porous size that allows the exchange of nutrients and oxygen (Hollister, 2005; Zhang et al., 2005b). Furthermore, it needs to provide a substrate for cellular adhesion, and in selected cases, could promote guided growth, proliferation, differentiation or apoptosis by scaffold-cell or by cell-cell interactions (Hollister, 2005; Zhang et al., 2005a). Some scaffolds such as hydrogels, as we will see later, have the ability to deliver several components. Therefore, the scaffold is a dynamic element that might play an important role in the regenerative process.

EARLY ATTEMPTS TO PROMOTE AXONAL REGENERATIONS USING SCAFFOLDS

The first studies, aimed to promote axonal growth after injury, were performed in the PNS using rigid materials. These attempts mainly used tubular structures to protect and guide the growth of regenerating axons. However, the used materials were not biocompatible, such as silicone conduits (Cheng and Lin, 2004), mini guide channels of a polyacrylonitrile:polyvinylchloride copolymer (Bamber et al., 1999), polytetrafluoroethylene and collagen conduits (Vasconcelos and Gay-Escoda, 2000), guidance channels of polyvinylidene fluoride (Aebischer et al., 1987), cylinders made of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (Gautier et al., 1998) and poly (D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds (Patist et al., 2004). Although in some cases a partial axonal regeneration was achieved, most of them did not induce successful regeneration, even after addition of trophic factors. These materials did not possess the required properties to support cell attachment, axonal growth, and some of them even induced an immune reaction. Although many biomaterials, natural or synthetic, have been proved to possess some of

these properties, currently there is not a consistent strategy to induce a complete axonal regeneration either in the CNS or in the PNS.

SYNTHESIS AND DEGRADATION OF HYDROGELS POLYMERIZATION

Hydrogels are hydrophilic polymers that can incorporate up to 90% of its dry weight of water in its structure (Aurand et al., 2012; Hoffman, 2012). Water incorporation occurs during the gelling process, in which a liquid polymer solution turns into a gel structure, by polymerization of monomers (Aurand et al., 2012). Gelling involves the formation of cross-links in response to different stimuli (Sawheny et al., 1993; Aurand et al., 2012). The density of a gel can be modified, and the change in stiffness or porosity impact on the interaction of gels with cells (Lee and Mooney, 2001; Aurand et al., 2012; Kirschner and Anseth, 2013).

Several stimuli trigger the polymerization of hydrogels: temperature (He et al., 2000; Jeong et al., 2000; Tate et al., 2001), pH (Srividya et al., 2001; Cheng et al., 2009; Chiu et al., 2009), UV light exposure (Sawheny et al., 1993; Mellott et al., 2001; Bryant and Anseth, 2002; Chatterjee et al., 2010), or ionic concentration (Ellis-Behnke et al., 2006; Nagai et al., 2006; Koutsopoulos and Zhang, 2012, 2013). The formation of gels *in situ* in living tissue limits the use of UV light, extreme pH or non-physiological temperatures. Therefore, many hydrogels have been devised to initiate the gelling process when in contact with physiological temperature (Jeong et al., 2000; Tate et al., 2001), ionic concentration (Ellis-Behnke et al., 2006; Nagai et al., 2006; Koutsopoulos and Zhang, 2012, 2013) or pH (Srividya et al., 2001; Chiu et al., 2009). The *in situ* gelling process of hydrogels is unique, because the resulting polymer can take the form of the receiving tissue. This is particularly important for some lesions of the NS, in which an irregular cavity is formed and this discontinuity impedes axonal regeneration as described previously. Hydrogels can fill completely the space, whereas pre-formed structures are not suitable for this application (Macaya and Spector, 2012).

DEGRADATION

Degradation of hydrogels occurs by breaking of covalent bonds (Aurand et al., 2012). Several factors influence the rate of degradation. Water access is one of them: it has been shown that when hydrogels are exposed to *in vitro* conditions, hydrolysis is the main reason of bond disruption due to high availability of water; in contrast, when hydrogels are in *in vivo* conditions, enzymatic activity, in particular metalloproteases, is the principal cause of degradation (Lutolf et al., 2003; Patterson and Hubbell, 2010). Properties of hydrogel also influence this process: in high-bond density hydrogels the disruption begins from the surface, in contrast to low-bond density hydrogel, where it begins from the interior of the structure, due to the ability of water or enzymes to penetrate the hydrogel (von Burkersroda et al., 2002).

HYDROGELS AS DELIVERY SYSTEMS

Hydrogels have properties that could make them a good alternative as a drug release system. During the gelling process it is possible to incorporate different types of molecules or cells

into the gel structure (Nagai et al., 2006; Kobsa and Saltzman, 2008; Censi et al., 2012; Koutsopoulos and Zhang, 2012). The incorporation of molecules into hydrogel is facilitated by the high quantity of water that permits the uptake and diffusion of soluble molecules (Nagai et al., 2006; Censi et al., 2012; Koutsopoulos and Zhang, 2012). The incorporation and release process is dictated by the characteristics of the hydrogel such as the size of porous and the molecular properties such as the monomer's molecular weight and its electrical charge (Nagai et al., 2006; Censi et al., 2012). In the case where the porous size is bigger than the molecule, the release occurs by diffusion (Amsden, 1998). On the other hand, when the molecule is larger than the porous, degradation, swelling and erosion of hydrogel permit the delivery of the molecule (Censi et al., 2012).

Administration of drugs is a necessity in the treatment of many injuries and diseases; however, commonly these drugs inside the body are metabolized and therefore have a limited time window to exert their actions. A local and controlled delivery of drugs could improve the treatments of many diseases or injuries, especially those that occur in the CNS. The delivery of drugs in the CNS implies a great challenge because the presence of BBB and the blood–spinal cord barrier, that impede the passage of many substances to the CNS (Pakulska et al., 2012). Some current delivery drugs methods into the CNS are bolus injection and catheter/minipump systems (Pakulska et al., 2012). Bolus injection into the intrathecal space is affected by the constant flow of cerebrospinal liquid, which disperse the drug, reducing its local effect (Pakulska et al., 2012). On the other hand, the use of a catheter/minipump system has high infection probabilities, due to the external minipump location. Furthermore, it is frequent that catheters suffer dislodgement, kinking, tearing and disconnection (Penn et al., 1995).

Because of the *in situ* gelling process, it is possible to use hydrogels as a local delivery system (Censi et al., 2012; Koutsopoulos and Zhang, 2012; Macaya and Spector, 2012; Pakulska et al., 2012), although it will be necessary to find out the best alternative to introduce the hydrogel into the brain or another site of the NS. It is feasible to put the hydrogel in a damaged area and release molecules there, allowing the local delivery of a drug, which could enhance the effectiveness of treatment. In addition, the use of biodegradable hydrogels is especially relevant for long-term treatments, since it will prevent repetitive invasive interventions. The data demonstrate that hydrogels are a very versatile release system because is possible to manipulate the rate of delivery and the rate of degradation. Hydrogels could be modified to release some medicament depending on the specific circumstances, like the half-life of the medicament, the dosage or the time that is required for treatment.

HYDROGELS PROMOTE AXONAL REGENERATION

Hydrogels present characteristics that make them good candidates to fulfill the needs required to promote axonal regeneration after lesions of the CNS, such as filling up the cavity of a lesion with a suitable substrate (**Figure 1B**). Although the PNS environment is less restrictive for axonal growth, as described previously, there are many challenges to achieve a successful regeneration. It is essential to reduce the probability of mismatches by providing guidance

cues for correct reinnervation, and hydrogels can help to attain this task (**Figure 2B**). However, a note of caution is appropriate because, in addition to act as scaffold and delivery tools, hydrogels might represent a physical barrier for both cellular and axonal reorganization. In this section we review the published evidence showing that hydrogels promote axonal regeneration both *in vitro* and *in vivo*.

IN VITRO STUDIES

Hydrogels properties such as its high water content, their porous constitution and the three dimensional (3D) networks formed during gelling, mimic to some extent the ECM found in tissues (Geckil et al., 2011; Aurand et al., 2012; Kirschner and Anseth, 2013), making possible to culture cells in 3D structures *in vitro*. These structures are closer to the *in vivo* environment than the classic two-dimensional cultures (Zhang et al., 2005b).

Early work (Holmes et al., 2000) aimed to obtain self-assembling peptides with motifs similar to the arginine-glycine-aspartate (RGD) present in several ECM proteins. The authors substituted glycine with alanine (A) and repeated the RADA sequence several times. To assess the suitability of this self-assembling peptide hydrogel, a direct comparison with Matrigel (a commercial substrate containing ECM derived from carcinoma cells) was made after culturing rat hippocampal neurons. No differences in synaptic activity measured by the endocytosis marker FM1-43 were found, showing that this hydrogel can support neuronal maturation. Recently, RADA-containing peptides were used to form 3D structures to allocate neural stem progenitor cells (NSPC) in order to evaluate proliferation and neuronal differentiation (Koutsopoulos and Zhang, 2013). Both Matrigel and the self-assembled peptide-based hydrogels sustained these parameters. Matrigel was efficient during the first 2 weeks, but the hydrogel allowed neuronal survival for over 5 months. These data demonstrate that hydrogels support neuronal differentiation and long-term survival with signs of maturity.

In another study, using dopaminergic cells, Semaphorin 3A was coupled to a PEG hydrogel containing silica particles to assess the effects on axonal growth. Semaphorin 3A is a soluble protein implicated in the axonal growth of dopaminergic neurons during brain development (Hernández-Montiel et al., 2008). Application of recombinant Semaphorin 3A to these dopaminergic neurons obtained from the developing midbrain or from *in vitro* differentiated mouse embryonic stem cells caused increased growth of axons in a collagen gel system in culture. This effect was neutralized by anti-Neuropilin receptors (Tamariz et al., 2010). A significant increase in axonal length was observed with the PEG hydrogel containing either 2 or 5 $\mu\text{g/ml}$ Semaphorin 3A compared to controls (Tamariz et al., 2011). Recently, a PEG hydrogel device was designed to evaluate the influence of distance in the application of a potential axonal growth-promoting molecule on murine embryonic stem cell-derived neurons. These authors conjugated Insulin-like Growth Factor 1 to poly-lactic-co-glycolic acid particles with several admixtures that resulted in different release kinetics: early, intermediate and late. The optimal conditions were: (i) a distance up to 2 mm between the poly-lactic-co-glycolic acid particles and

neurons; (ii) a sequential array of early, intermediate and late release conjugates; (iii) the early release particles placed closer to the cells and those with late kinetics placed away (Lee et al., 2014).

An intermediate step between two-dimensional *in vitro* cultures and *in vivo* studies is the culture of organotypic slices, because they maintain the ECM and the 3D organization. In cultured spinal cord slices placed on different substrates such as membrane inserts, Collagen gel, soluble hyaluronic acid and hyaluronic acid-based hydrogel, different cell-type specific markers were analyzed. The hydrogel group preserved better than the other groups the characteristics of the slice: more neurons (NeuN+), a greater proportion of choline acetyltransferase-positive neurons, well-preserved astroglia and less number of activated microglial cells were reported (Schizas et al., 2014). The data of these works confirmed that hydrogels could be used as a delivery system to promote axonal growth, and preserve better the organotypic cultures. These characteristics might be useful to promote a successful axonal regeneration *in vivo*.

IN VIVO STUDIES

Hydrogels as a strategy for promoting regeneration in the brain

Several groups have assessed the biocompatibility of hydrogels in the absence of a lesion. PEG hydrogels with 13% and 20% macromer weight, and 20% PEG conjugated with GDNF were implanted into the cortex and striatum of nonhuman primates. Four months after implantation the astroglial and microglial reactions were present around the implant site of all groups, including sham. The 13% PEG hydrogel generated fewer reactions, probably due to its faster degradation (Bjugstad et al., 2008). This same group evaluated the biocompatibility of different weight percent of PEG hydrogel implanted as strands across the rat brain. The analysis in striatum revealed that both 13% and 20% hydrogels attenuate the acute response of reactive glia, compared to the sham group after 56 days (Bjugstad et al., 2010). However, when PEG was conjugated with silica particles and implanted into striatum, a higher amount of macrophages and glial cells were founded around the injection site after 30 days, compared to controls. The authors correlated this enhanced glial reaction with the presence of silica particles that were not degraded (Tamariz et al., 2011).

In some cases, one important limitation for axonal regeneration is the presence of a cavity in the damaged tissue (Figure 1A). Hydrogels have been proved to be able to fill such cavity and promote axonal growth (Figure 1B). After resection of a fraction of the cerebral cortex, the resulting cavity was filled with a hydrogel based on self-assembling peptides or with saline solution. After 6 weeks the hydrogel significantly reduced the lesion volume, and cellular ingrowth was detected. A significant decrease in astrocytic cells and macrophages was observed in the first 2 weeks, compared to the saline group (Guo et al., 2009). Hou et al. also caused a cortical damage in rats, but they used hyaluronic acid-based hydrogel, either alone or modified to incorporate Laminin in its structure, to fill the cavity. After six and twelve weeks hydrogels allow cell infiltration, angiogenesis and inhibition of the glial scar; however, only the hydrogel

with Laminin was permissive for neurite growth (Hou et al., 2005).

One of the first attempts to evaluate the implantation of hydrogels together with living cells in the brain was made by Woerly et al. (1996). In this study SC, neonatal astrocytes or cells dissociated from embryonic cerebral hemispheres were entrapped in (N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide)-based hydrogel. Hydrogels containing SC were implanted into the rat neocortex, and promoted cellular and axonal ingrowth within the polymer. In another study, NSPC were encapsulated into self-assembling peptide hydrogels modified to include the IKVAV motif derived from Laminin (Cheng et al., 2013). Such cell-containing hydrogels were used to fill the cavity caused by a mechanical lesion in the neocortex of rats. Hydrogels made with the IKVAV motif and NSPC promoted better tissue regeneration and presented neurogenesis, compared to hydrogels without the motif, which promoted modest tissue regeneration and had prevalent glial differentiation. This study is in agreement with previous data (Hou et al., 2005) that demonstrate that the Laminin or Laminin-derived motif incorporated to hydrogel structure allow the recovery of tissue continuity. Another group tried to promote tissue recovery with a different strategy, which consisted in incorporating GDNF to gelatin-based hydrogels, with the objective to attract to the site of lesion the endogenous NSPC present in the adult subventricular zone. The hydrogel loaded with GDNF attenuated the astroglial reaction, promoted neurite growth into the site of lesion and induced the migration of neuroblasts towards the lesion site. However, cells did not reach the site of lesion, and the migration effect was observed only at 7 days post-lesion, disappearing after 21 days (Fon et al., 2014).

Probably the most important aspect in the CNS is to achieve re-connection of damaged areas, which in the long run might positively impact behavior. In a model where hamsters' optic tracts were severed and the resulting cavity was filled with a self-assembling peptide hydrogel or with saline solution, researchers observed that the hydrogel helped to reconnect the areas around the lesion after 6 weeks, in contrast to saline-treated animals. More importantly, vision was improved in the hydrogel-treated group (Ellis-Behnke et al., 2006). Although the degree of axonal re-growth varies depending on the strategy used, hydrogels have been demonstrated to be able to fill the lesion cavity with a suitable substrate for axonal growth, and the further addition of trophic factors or cells increases the possibilities of improvement after traumatic lesions in the brain (Figure 1B). However, in general terms, the evidence is still insufficient to say that hydrogels would substitute current treatments for brain lesions.

Hydrogels promote regeneration in the spinal cord

The studies showing that hydrogels promote axonal growth *in vitro* prompted investigators to test if implantation of hydrogels into the damaged spinal cord could promote recovery. A hyaluronic acid hydrogel was evaluated *in vitro* and *in vivo* to investigate if it was able to promote neurite growth. Although this hydrogel promoted neurite growth *in vitro*, it was not sufficient to achieve functional recovery when implanted in rats with complete

transected thoracic spinal cord (Horn et al., 2007). Transection of the spinal cord in cats followed by filling of the cavity with NeuroGel hydrogel (N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide) permitted the formation of neural tissue with myelinated axons across the damaged area, connecting both sides of the cavity, and allowing infiltration of glial cells and capillary vessels (Woerly et al., 2001). In additional work, the authors found that the hydrogel prevented scar formation and that the gliosis reaction was reduced in the interface between tissue and hydrogel (Woerly et al., 2004).

One possibility in the design of a suitable scaffold is the combination of two different types of hydrogels, to obtain a better substrate. A combined poly lactic acid (PLA) and poly (2-hydroxyethyl methacrylate, PHEMA) hydrogel was devised to obtain a degradable porous structure. This mixed hydrogel was implanted in the hemisectioned spinal cord of rats and demonstrated to promote axonal growth into the lesion area; moreover, animals improved in the widely used behavioral Basso, Beattie and Bresnahan scale (Pertici et al., 2014). Another strategy evaluated to bridge the two stumps after a spinal cord lesion is the use of tubular structures, which provide mechanical support for axonal regeneration. A tubular device made with poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate, PHEMA-MMA) hydrogel was used to join the transected spinal cord of rats and this strategy resulted in the re-establishment of tissue continuity, allowing axon regeneration with minimal scar tissue. Although the empty tubular structure promoted recovery by itself, it was proposed that filling the tubular structure with a suitable substrate could be a better option to promote recovery (Tsai et al., 2004). The same group evaluated this approach (Tsai et al., 2006), filling the tubular structure used previously with matrices of Collagen, Fibrin, Matrigel, methylcellulose or smaller PHEMA-MMA tubes. In addition, Fibrin and Collagen were supplemented with Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and NT-3. It was observed that almost all the matrices used promoted more axonal regeneration compared to unfilled structures. The addition of FGF-1 increased the axonal regeneration of vestibular neurons, and the addition of NT-3 decreased the total number of axons regenerating from brainstem neurons.

In addition to promote axonal regeneration, hydrogels can incorporate into its structure trophic factors and release them on site after a spinal cord lesion. PHEMA hydrogels soaked with BDNF and control PHEMA hydrogels were implanted into the hemisectioned spinal cords of rats. Only the BDNF-containing hydrogel allowed axonal growth into the polymer structure (Bakshi et al., 2004). Similarly, BDNF was embedded into agarose hydrogel and implanted into hemisectioned spinal cords of rats. It was demonstrated that it promoted greater axonal growth in contrast to hydrogels without BDNF (Jain et al., 2006). Another trophic factor evaluated in spinal cord lesions is NT-3, which was combined to a hydrogel of acrylated PLA-b-PEG-b-PLA to release it in hemisectioned cord of rats. Animals treated with hydrogel and NT-3 presented more axonal growth into the lesion site and improved in the behavioral parameters, in contrast to animals treated only with hydrogel (Piantino et al., 2006). Collectively, these experiments strongly suggest that

incorporation of molecules that promote axonal growth and/or cell survival increases the possibilities of recuperation after a spinal cord lesion.

As mentioned earlier, hydrogels can incorporate living cells, making grafting of cells together with hydrogel an additional strategy to promote recovery. SC and NSPC have been implanted with and self-assembling peptide-based hydrogel into transected spinal cord of rats. The ingrowth of tissue to the lesion was better in animals treated with hydrogel-embedded cells than those treated with hydrogel alone. NSPC and SC can survive, migrate, and differentiate into the site of lesion, with SC promoting greater axonal growth into damaged area (Guo et al., 2007). Another study demonstrated that when the same hydrogel was implanted with SC in a moderate spinal cord contusion model in rats, there was a reduction of astrogliosis reaction, a motor recovery and infiltration of endogenous SC to the lesion site was observed (Moradi et al., 2012).

Hydrogels promote regeneration in the PNS

Although the PNS allows some degree of regeneration, mismatches are frequent and limit its recovery. The best strategy to promote axonal regeneration in peripheral nerve injuries is the use of autografts, but this convey some problems such as donor tissue morbidity and loss of function in the tissue innervated by donor nerve (Schlosshauer et al., 2006). Some attempts have been made to substitute the autografts with variable results. Hydrogel porous tubes constructed with PHEMA-MMA were implanted into interrupted sciatic nerves. At early times the autografts were more effective as evaluated by histomorphology and electrophysiology. However, after 8 weeks the scaffold showed a bimodal recovery: 60% of animals surpassed the autografts but rest did not, probably due to tube collapse (Belkas et al., 2005). A more rigid hybrid conduit was designed with poly (3,4-ethylenedioxythiophene, PEDOT) and agarose hydrogel. This device was implanted in 10 mm peroneal nerve gaps and the regeneration was evaluated by muscle mass, contractile force measurements and nerve histomorphometry. The hybrid conduits promoted better regeneration compared to agarose-only hydrogel, but autografts presented much better results (Abidian et al., 2012).

Filling of conduits with a substrate, which allows axonal growth, could enhance the regenerative process (**Figure 2B**). An empty blood vessel filled with a self-assembling peptide hydrogel, implanted in a sciatic nerve gap of 10 mm, promoted higher numbers of growing and re-myelinated axons, more SC infiltration, less presence of lymphocytes and macrophages, greater gastrocnemius muscle recovery and better behavioral improvement, compared to empty conduits. However, the recovery was not comparable in retrograde labeling and electrophysiology, to unlesioned animals (Zhan et al., 2013). Another group developed a Keratin-based hydrogel to fill commercial tubular conduits, which improved histological characteristics such as number of blood vessels, axons per area, and axon size. Furthermore, electrophysiological features such as conduction delay and impulse amplitude were better than with the empty tubular structures, and comparable to autografts. These results were obtained in mice with a 4 mm gap in the tibial nerve

(Sierpinski et al., 2008) and in rabbits with a 2–3 cm sciatic nerve break (Hill et al., 2011). The same group characterized the early cellular response after implantation of a commercial tubular structure filled with Keratin-based hydrogel, Matrigel or saline solution in rats presenting a 1 cm sciatic nerve injury. Significant differences present in the hydrogel group compared to others were: an earlier migration of dedifferentiated endogenous SC from the proximal end, faster SC dedifferentiation, higher myelin debris clearance, and decreased macrophage infiltration. However, others parameters, such as axon density, SC labeling or the amount of cells in the distal nerve did not present differences (Pace et al., 2013). It is worth mentioning that this is the only study in which the cellular response was characterized post-hydrogel implantation after peripheral nerve injury.

The release of molecules *in situ* after a lesion could enhance axonal growth through the lesion, contributing to reinnervation of correct areas (Macaya and Spector, 2012), increasing the possibilities of recovery (Figure 2B). Animals suffering from a 10 mm gap in the sciatic nerve were implanted with PHEMA-MMA hydrogel porous tubes, filled with Collagen matrices supplemented with NT-3, BDNF and FGF-1. The rats treated with growth factors presented better axonal regeneration compared to animals receiving empty tubes, or Collagen without factors. Tubes filled with collagen and 10 μ g/ml FGF-1 presented similar number of fibers with diameters similar to animals that received autografts (Midha et al., 2003). Similarly, polysulfone tubes filled with agarose hydrogel containing Laminin-1 and NGF, implanted in the severed sciatic nerve caused equivalent recovery to animals that received autografts in parameters such as morphology of the regenerated nerve and the density of myelinated axons. However, although the functional recoveries of sciatic nerve were similar after hydrogel or autograft treatment, these values were significantly lower than the non-lesioned condition (Yu and Bellamkonda, 2003).

Ultrafiltration membrane conduits filled with a self-assembling peptide hydrogel containing SC were implanted into the damaged sciatic nerve. This device caused better axonal growth and linear alignment of nerve fibers with SC than conduits filled with: (a) self-assembling peptide-only hydrogel; (b) alginate/Fibronectin hydrogel or (c) alginate/Fibronectin with SC. (McGrath et al., 2010). These studies demonstrated that the combination of a tubular structure, which provides mechanical support, filled with hydrogels increases the possibilities of axonal regeneration after peripheral nerve injury. In addition, this system could be improved by the addition of trophic factors or cells (Figure 2B). The reported recoveries are to some extent similar to those resulting from autografts, the current gold standard to treat peripheral nerve damage. However, further studies that evaluate the recovery with additional parameters, such as electrophysiological studies and anterograde/retrograde labeling through regenerated axons across the damaged area are still needed.

CONCLUSION

Increasing the possibilities for axonal regeneration after neuronal damage is a complex challenge, because it is necessary to

overcome several limitations, which might imply different strategies. Hydrogels have demonstrated to be useful to overcome some of these barriers, particularly by providing an adequate substrate for axonal growth. Their versatility allows modification of important parameters, which can positively impact on axonal regeneration, and this is a significant advantage compared to other biomaterials. Although different strategies such as implantation of hydrogel, alone or combined with trophic factors or with cells, have proved to promote axonal regeneration in different animal models, more research is needed to determine if hydrogels can be applied in the clinical setting in the future. Tissue regeneration seems to consistently occur after hydrogel application, but other parameters, particularly the electrophysiological and behavioral tests show more variable results, and these shortcomings will hopefully be resolved soon.

ACKNOWLEDGMENTS

The work in the laboratory of I.V. is supported by grants from Conacyt (131281) and Papiit-UNAM (IN208713). Oscar A. Carballo-Molina received a graduate fellowship from Conacyt. We thank Drs. Francisco Fernández de Miguel and Alfredo Varela-Echavarría for critical reading on early stages of this manuscript.

REFERENCES

- Abidian, M. R., Daneshvar, E. D., Egeland, B. M., Kipke, D. R., Cederna, P. S., and Urbanek, M. G. (2012). Hybrid conducting polymer—hydrogel conduits for axonal growth and neural tissue engineering. *Adv. Healthc. Mater.* 1, 762–767. doi: 10.1002/adhm.201290030
- Aebischer, P., Valentini, R. F., Dario, P., Domenici, C., and Galletti, P. M. (1987). Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Res.* 436, 165–168. doi: 10.1016/0006-8993(87)91570-8
- Amsden, B. (1998). Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. *Macromolecules* 31, 8382–8395. doi: 10.1021/ma980765f
- Aurand, E. R., Lampe, K. J., and Bjugstad, K. B. (2012). Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering. *Neurosci. Res.* 72, 199–213. doi: 10.1016/j.neures.2011.12.005
- Bakshi, A., Fisher, O., Dagci, T., Himes, B. T., Fischer, I., and Lowman, A. (2004). Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* 1, 322–329. doi: 10.3171/spi.2004.1.3.0322
- Bamber, N. I., Li, H., Aebischer, P., and Xu, X. M. (1999). Fetal spinal cord tissue in mini-guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisectioned adult rat spinal cords. *Neural Plast.* 6, 103–121. doi: 10.1155/np.1999.103
- Belkas, J. S., Munro, C. A., Shoichet, M. S., and Midha, R. (2005). Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube. *Restor. Neurol. Neurosci.* 23, 19–29.
- Bjugstad, K. B., Lampe, K., Kern, D. S., and Mahoney, M. (2010). Biocompatibility of poly (ethylene glycol)-based hydrogels in the brain : an analysis of the glial response across space and time. *J. Biomed. Mater. Res. A* 95, 79–91. doi: 10.1002/jbm.a.32809
- Bjugstad, K. B., Redmond, D. E., Lampe, K. J., Kern, D. S., Sladek, J. R., and Mahoney, M. J. (2008). Biocompatibility of PEG-Based hydrogels in primate brain. *Cell Transplant.* 17, 409–415. doi: 10.3727/096368908784423292
- Bryant, S. J., and Anseth, K. S. (2002). Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* 59, 63–72. doi: 10.1002/jbm.1217
- Bundesden, L. Q., Scheel, T. A., Bregman, B. S., and Kromer, L. F. (2003). Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J. Neurosci.* 23, 7789–7800.
- Case, L. C., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Regeneration of the adult central nervous system. *Curr. Biol.* 15, R749–R753. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.008

- Censi, R., Di Martino, P., Vermonden, T., and Hennink, W. E. (2012). Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *J. Control. Release* 161, 680–692. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.002
- Chatterjee, K., Lin-Gibson, S., Wallace, W. E., Parekh, S. H., Lee, Y. J., Cicerone, M. T., et al. (2010). The effect of 3D hydrogel scaffold modulus on osteoblast differentiation and mineralization revealed by combinatorial screening. *Biomaterials* 31, 5051–5062. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.024
- Cheng, T., Chen, M., Chang, W., Huang, M., and Wang, T. (2013). Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering. *Biomaterials* 34, 2005–2016. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.043
- Cheng, W.-L., and Lin, C.-C. K. (2004). The effects of different electrical stimulation protocols on nerve regeneration through silicone conduits. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* 56, 1241–1246. doi: 10.1097/01.ta.0000071289.11767.22
- Cheng, E., Xing, Y., Chen, P., Yang, Y., Sun, Y., Zhou, D., et al. (2009). A pH-Triggered, fast-responding DNA Hydrogel. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 7660–7663. doi: 10.1002/anie.200902538
- Chiu, Y.-L., Chen, S.-C., Su, C.-J., Hsiao, C.-W., Chen, Y.-M., Chen, H.-L., et al. (2009). pH-triggered injectable hydrogels prepared from aqueous N-palmitoyl chitosan: in vitro characteristics and in vivo biocompatibility. *Biomaterials* 30, 4877–4888. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.052
- Dahlin, L. B. (2008). Techniques of peripheral nerve repair. *Scand. J. Surg.* 97, 310–316. doi: 10.1177/145749690809700407
- Díaz-Martínez, N. E., and Velasco, I. (2009). Inhibición del crecimiento axonal por proteoglicanos de condroitin sulfato en el sistema nervioso central. [Axonal growth inhibition by chondroitin sulfate proteoglycans in the central nervous system] *Rev. Invest. Clín.* 61, 140–149.
- Donnelly, D. J., and Popovich, P. G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 209, 378–388. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.009
- Ellis-Behnke, R. G., Liang, Y.-X., You, S.-W., Tay, D. K. C., Zhang, S., So, K.-F., et al. (2006). Nano neuro knitting : peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 5054–5059. doi: 10.1016/s1474-4422(06)70430-6
- Fawcett, J. W., and Asher, R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49, 377–391. doi: 10.1016/s0361-9230(99)00072-6
- Fitch, M. T., and Silver, J. (2008). CNS injury , glial scars and inflammation : inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp. Neurol.* 209, 294–301. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.05.014
- Fon, D., Al-Abboodi, A., Chan, P. P. Y., Zhou, K., Crack, P., Finkelstein, D. I., et al. (2014). Effects of GDNF-loaded injectable gelatin-based hydrogels on endogenous neural progenitor cell migration. *Adv. Healthc. Mater.* 3, 761–774. doi: 10.1002/adhm.201300287
- Freeman, M. R. (2014). Signaling mechanisms regulating Wallerian degeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 224–231. doi: 10.1016/j.conb.2014.05.001
- Gautier, S. E., Oudega, M., Frago, M., Chapon, P., Plant, G. W., Bunge, M. B., et al. (1998). Poly(alpha-hydroxyacids) for application in the spinal cord: resorbability and biocompatibility with adult rat Schwann cells and spinal cord. *J. Biomed. Mater. Res.* 42, 642–654. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19981215)42:4<642::aid-jbm22>3.3.co;2-b
- Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S., and Demirci, U. (2011). Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)* 5, 469–484. doi: 10.2217/nmm.10.12
- Guo, J., Leung, K. K., Su, H., Yuan, Q., Wang, L., Chu, T.-H., et al. (2009). Self-assembling peptide nanofiber scaffold promotes the reconstruction of acutely injured brain. *Nanomedicine* 5, 345–351. doi: 10.1016/j.nano.2008.12.001
- Guo, J., Su, H., Zeng, Y., Liang, Y.-X., Wong, W. M., Ellis-Behnke, R. G., et al. (2007). Reknitting the injured spinal cord by self-assembling peptide nanofiber scaffold. *Nanomedicine* 3, 311–321. doi: 10.1016/j.nano.2007.09.003
- Gurgo, R. D., Bedi, K. S., and Nurcombe, V. (2002). Current concepts in central nervous system regeneration. *J. Clin. Neurosci.* 9, 613–617. doi: 10.1054/jocn.2002.1080
- Hanz, S., and Fainzilber, M. (2006). Retrograde signaling in injured nerve—the axon reaction revisited. *J. Neurochem.* 99, 13–19. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04089.x
- He, S., Yaszemski, M. J., Yasko, A. W., Engel, P. S., and Mikos, A. G. (2000). Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)-dimethacrylate. *Biomaterials* 21, 2389–2394. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00106-x
- Hernández-Montiel, H. L., Tamariz, E., Sandoval-minero, M. T., and Varela-chavarría, A. (2008). Semaphorins 3A , 3C and 3F in mesencephalic dopaminergic axon. *J. Comp. Neurol.* 506, 387–397. doi: 10.1002/cne.21503
- Hill, P. S., Apel, P. J., Barnwell, J., Smith, T., Koman, L. A., Atala, A., et al. (2011). Repair of peripheral nerve defects in rabbits using keratin hydrogel scaffolds. *Tissue Eng. Part A* 17, 1499–1505. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0184
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 18–23. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010
- Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* 4, 518–524. doi: 10.1038/nmat1421
- Holmes, T. C. (2002). Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 20, 16–21. doi: 10.1016/s0167-7799(01)01840-6
- Holmes, T. C., de Lacalle, S., Su, X., Liu, G., Rich, A., and Zhang, S. (2000). Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 6728–6733. doi: 10.1073/pnas.97.12.6728
- Horn, E. M., Beaumont, M., Shu, X. Z., Harvey, A., Prestwich, G. D., Horn, K. M., et al. (2007). Influence of cross-linked hyaluronic acid hydrogels on neurite outgrowth and recovery from spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* 6, 133–140. doi: 10.3171/spi.2007.6.2.133
- Hou, S., Xu, Q., Tian, W., Cui, F., Cai, Q., Ma, J., et al. (2005). The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *J. Neurosci. Meth.* 148, 60–70. doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.04.016
- Jain, A., Kim, Y.-T., McKeon, R. J., and Bellamkonda, R. V. (2006). In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects and local delivery of BDNF after spinal cord injury. *Biomaterials* 27, 497–504. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.008
- Jeong, B., Bae, Y. H., and Kim, S. W. (2000). In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof. *J. Biomed. Mater. Res.* 50, 171–177. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(200005)50:2<171::aid-jbm11>3.0.co;2-f
- Johnson, E. O., Zoubos, A. B., and Soucacos, P. N. (2005). Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury* 36, S24–S29. doi: 10.1016/j.injury.2005.10.012
- Kawano, H., Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Yoshioka, N., Li, H. P., Kawamura, K., et al. (2012). Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 349, 169–180. doi: 10.1007/s00441-012-1336-5
- Kirschner, C. M., and Anseth, K. S. (2013). Hydrogels in healthcare: from static to dynamic material microenvironments. *Acta Mater.* 61, 931–944. doi: 10.1016/j.actamat.2012.10.037
- Kobsa, S., and Saltzman, W. M. (2008). Bioengineering approaches to controlled protein delivery. *Pediatr. Res.* 63, 513–519. doi: 10.1203/pdr.0b013e318165f14d
- Koutsopoulos, S., and Zhang, S. (2012). Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *J. Control. Release* 160, 451–458. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.014
- Koutsopoulos, S., and Zhang, S. (2013). Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, matrigel and collagen I. *Acta Biomater.* 9, 5162–5169. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.010
- Lee, W., Frank, C. W., and Park, J. (2014). Directed axonal outgrowth using a propagating gradient of IGF-1. *Adv. Mater.* 26, 4936–4940. doi: 10.1002/adma.201305995
- Lee, K. Y., and Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.* 101, 1869–1880. doi: 10.1021/cr00108x
- Lundborg, G. (2004). *Nerve Injury and Repair: Regeneration, Reconstruction and Cortical Remodeling*. 2nd Edn. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone.
- Lundborg, G., and Rosén, B. (2001). Sensory relearning after nerve repair. *Lancet* 358, 809–810. doi: 10.1016/s0140-6736(01)06001-9
- Lutolf, M. P., Lauer-Fields, J. L., Schmoekel, H. G., Metters, A. T., Weber, F. E., Fields, G. B., et al. (2003). Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion

- characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 5413–5418. doi: 10.1073/pnas.0737381100
- Macaya, D., and Spector, M. (2012). Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review. *Biomed. Mater.* 7:012001. doi: 10.1088/1748-6041/7/1/012001
- Maripuu, A., Björkman, A., Björkman-Burtscher, I. M., Mannfolk, P., Andersson, G., and Dahlin, L. B. (2012). Reconstruction of sciatic nerve after traumatic injury in humans - factors influencing outcome as related to neurobiological knowledge from animal research. *J. Brachial Plex. Peripher. Nerve Inj.* 7:7. doi: 10.1186/1749-7221-7-7
- Mathewson, A. J., and Berry, M. (1985). Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res.* 327, 61–69. doi: 10.1016/0006-8993(85)91499-4
- McGrath, A. M., Novikova, L. N., Novikov, L. N., and Wiberg, M. (2010). BDTM PuraMatrixTM peptide hydrogel seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Brain Res. Bull.* 83, 207–213. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.07.001
- McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., and Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 7, 3398–3411.
- Mellott, M. B., Searcy, K., and Pishko, M. V. (2001). Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials* 22, 929–941. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00258-1
- Merrill, J. E., and Benveniste, E. N. (1996). Cytokines in inflammatory helpful and harmful. *Trends Neurosci.* 19, 331–338. doi: 10.1016/0166-2236(96)10047-3
- Metcalfe, A. D., and Ferguson, M. W. J. (2007). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface* 4, 413–437. doi: 10.1098/rsif.2006.0179
- Midha, R., Munro, C. A., Dalton, P. D., Tator, C. H., and Shoichet, M. S. (2003). Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J. Neurosurg.* 99, 555–565. doi: 10.3171/jns.2003.99.3.0555
- Mietto, B. S., Costa, R. M., de Lima, S. V., Ferreira, S. T., and Martinez, A. M. B. (2008). “Wallerian degeneration in injury and diseases: concepts and prevention,” in *Advanced Understanding of Neurodegenerative Diseases*, ed R. C.-C. Chang (Rijeka, Croatia: InTech), 351–364.
- Moradi, F., Bahktiari, M., Joghataei, M. T., Nobakht, M., Soleimani, M., Hasanzadeh, G., et al. (2012). BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration. *J. Neurosci. Res.* 90, 2335–2348. doi: 10.1002/jnr.23120
- Nagai, Y., Unsworth, L. D., Koutsopoulos, S., and Zhang, S. (2006). Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold. *J. Control. Release* 115, 18–25. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.06.031
- Pace, L. A., Plate, J. F., Smith, T. L., and Van Dyke, M. E. (2013). The effect of human hair keratin hydrogel on early cellular response to sciatic nerve injury in a rat model. *Biomaterials* 34, 5907–5914. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.024
- Pakulska, M. M., Ballios, B. G., and Shoichet, M. S. (2012). Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomed. Mater.* 7:024101. doi: 10.1088/1748-6041/7/2/024101
- Pasterkamp, R. J., Giger, R. J., Ruitenber, M.-J., Holtmaat, A. J., De Wit, J., De Winter, F., et al. (1999). Expression of the gene encoding the chemo-repellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 143–166. doi: 10.1006/mcne.1999.0738
- Patist, C. M., Mulder, M. B., Gautier, S. E., Maquet, V., Jérôme, R., and Oudega, M. (2004). Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* 25, 1569–1582. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00503-9
- Patterson, J., and Hubbell, J. A. (2010). Enhanced proteolytic degradation of molecularly engineered PEG hydrogels in response to MMP-1 and MMP-2. *Biomaterials* 31, 7836–7845. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.061
- Penn, R. D., York, M. M., and Paice, J. A. (1995). Catheter systems for intrathecal drug delivery. *J. Neurosurg.* 83, 215–217. doi: 10.3171/jns.1995.83.2.0215
- Pertici, V., Trimaille, T., Laurin, J., Felix, M.-S., Marqueste, T., Pettmann, B., et al. (2014). Repair of the injured spinal cord by implantation of a synthetic degradable block copolymer in rat. *Biomaterials* 35, 6248–6258. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.020
- Piantino, J., Burdick, J. A., Goldberg, D., Langer, R., and Benowitz, L. I. (2006). An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 201, 359–367. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.04.020
- Raivich, G., and Makwana, M. (2007). The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain Res. Rev.* 53, 287–311. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.09.005
- Rolls, A., Shechter, R., and Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 235–241. doi: 10.1038/nrn2591
- Ruijs, A. C., Jaquet, J.-B., Kalmijn, S., Giele, H., and Hovius, S. E. (2005). Median and ulnar nerve injuries: a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plast. Reconstr. Surg.* 116, 484–494. doi: 10.1097/01.prs.0000172896.86594.07
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L. B., Butt, A., and Logan, A. (2004). Myelin-, reactive glia- and scar- derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling and correlation with axon regeneration. *Glia* 46, 225–251. doi: 10.1002/glia.10315
- Sawheny, A. S., Pathak, C. P., and Hubbell, J. A. (1993). Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(a-hydroxy acid) diacrylate macromers. *Macromolecules* 26, 581–587. doi: 10.1021/ma00056a005
- Schizas, N., Rojas, R., Kootala, S., Andersson, B., Pettersson, J., Hilborn, J., et al. (2014). Hyaluronic acid-based hydrogel enhances neuronal survival in spinal cord slice cultures from postnatal mice. *J. Biomater. Appl.* 28, 825–836. doi: 10.1177/0885328213483636
- Schlosshauer, B., Dreesmann, L., Schaller, H.-E., and Sinis, N. (2006). Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. *Neurosurgery* 59, 740–747; discussion 747–748. doi: 10.1227/01.neu.0000235197.36789.42
- Shearer, M. C., and Fawcett, J. W. (2001). The astrocyte/meningeal cell interface - a barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res.* 305, 267–273. doi: 10.1007/s004410100384
- Sierpinski, P., Garrett, J., Ma, J., Apel, P., Klorig, D., Smith, T., et al. (2008). The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials* 29, 118–128. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.023
- Silver, J., and Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 146–156. doi: 10.1038/nrn1326
- Srividya, B., Cardoza, R. M., and Amin, P. D. (2001). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system. *J. Control. Release* 73, 205–211. doi: 10.1016/s0168-3659(01)00279-6
- Tamariz, E., Díaz-Martínez, N. E., Díaz, N. F., García-Peña, C. M., Velasco, I., and Varela-Echavarría, A. (2010). Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *J. Neurosci. Res.* 88, 971–980. doi: 10.1002/jnr.22268
- Tamariz, E., Wan, A. C. A., Pek, Y. S., Giordano, M., Hernández-Padrón, G., Varela-Echavarría, A., et al. (2011). Delivery of chemotropic proteins and improvement of dopaminergic neuron outgrowth through a thixotropic hybrid nano-gel. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22, 2097–2109. doi: 10.1007/s10856-011-4385-5
- Tang, X., Davies, J. E., and Davies, S. J. A. (2003). Changes in distribution, cell associations and protein expression levels of NG2, V2 and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J. Neurosci. Res.* 71, 427–444. doi: 10.1002/jnr.10523
- Tate, M. C., Shear, D. A., Hoffman, S. W., Stein, D. G., and LaPlaca, M. C. (2001). Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. *Biomaterials* 22, 1113–1123. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00348-3
- Tsai, E. C., Dalton, P. D., Shoichet, M. S., and Tator, C. H. (2004). Synthetic hydrogel guidance channels facilitate regeneration of adult rat brainstem motor axons after complete spinal cord transection. *J. Neurotrauma* 21, 789–804. doi: 10.1089/089715041269687
- Tsai, E. C., Dalton, P. D., Shoichet, M. S., and Tator, C. H. (2006). Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *Biomaterials* 27, 519–533. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.025

- Valls-Sole, J., Castillo, C. D., Casanova-Molla, J., and Costa, J. (2011). Clinical consequences of reinnervation disorders after focal peripheral nerve lesions. *Clin. Neurophysiol.* 122, 219–228. doi: 10.1016/j.clinph.2010.06.024
- Vasconcelos, B. C., and Gay-Escoda, C. (2000). Facial nerve repair with expanded polytetrafluoroethylene and collagen conduits: an experimental study in the rabbit. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 58, 1257–1262. doi: 10.1053/joms.2000.16626
- von Burkersroda, F., Schedl, L., and Göpferich, A. (2002). Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 23, 4221–4231. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00170-9
- Woerly, S., Doan, V. D., Sosa, N., de Vellis, J., and Espinosa, A. (2001). Reconstruction of the transected cat spinal cord following NeuroGel implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 63–83. doi: 10.1016/s0736-5748(00)00064-2
- Woerly, S., Doan, V. D., Sosa, N., de Vellis, J., and Espinosa-Jeffrey, A. (2004). Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 75, 262–272. doi: 10.1002/jnr.10774
- Woerly, S., Plant, G. W., and Harvey, A. R. (1996). Cultured rat neuronal and glial cells entrapped within hydrogel polymer matrices: a potential tool for neuronal tissue replacement. *Neurosci. Lett.* 205, 197–201. doi: 10.1016/0304-3940(96)12349-1
- Yiu, G., and He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 617–627. doi: 10.1038/nrn1956
- Yu, X., and Bellamkonda, R. V. (2003). Tissue-engineered scaffolds are effective alternatives to autografts for bridging peripheral nerve gaps. *Tissue Eng.* 9, 421–430. doi: 10.1089/10763270322066606
- Zhan, X., Gao, M., Jiang, Y., Zhang, W., Wong, W. M., Yuan, Q., et al. (2013). Nanofiber scaffolds facilitate functional regeneration of peripheral nerve injury. *Nanomedicine* 9, 305–315. doi: 10.1016/j.nano.2012.08.009
- Zhang, S., Gelain, F., and Zhao, X. (2005b). Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. *Semin. Cancer Biol.* 15, 413–420. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.007
- Zhang, N., Yan, H., and Wen, X. (2005a). Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 48–64. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.11.002

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 21 October 2014; accepted: 09 January 2015; published online: 17 February 2015.

Citation: Carballo-Molina OA and Velasco I (2015) Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Front. Cell. Neurosci.* 9:13. doi: 10.3389/fncel.2015.00013

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Copyright © 2015 Carballo-Molina and Velasco. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).

The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.