

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

---

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

**Función de Netrina1 y Semaforinas  
secretables en la guía neuronal y axonal en el  
hipocampo y el cerebelo**

**Patricia Guijarro Larraz**  
Programa de Doctorado de Biología Celular  
Bienio 1998-2000

**Barcelona, Abril de 2006**

## **RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN: RESUMEN DE RESULTADOS

En la actualidad existen cinco familias principales de factores guía, por su actividad quimiotáctica sobre neuronas y axones *in vitro*, y por su papel clave en la correcta migración neuronal y axonal durante el desarrollo: netrinas, semaforinas, slits, efrinas y Reelina (Barallobre et al., 2005; Brose y Tessier-Lavigne, 2000; Fiore y Puschel, 2003; Martínez y Soriano, 2005; Tissir y Goffinet, 2003). Su expresión se mantiene en el sistema nervioso adulto, y numerosas evidencias experimentales han implicado a prácticamente todas ellas en distintos procesos relacionados con la función nerviosa durante la edad adulta, como plasticidad sináptica, mantenimiento de conexiones o regeneración axonal (Beffert et al., 2005; Cebria y Newmark, 2005; de Wit y Verhaagen, 2003; Hagino et al., 2003; Holtmaat et al., 2002; Klein, 2004; Koeberle y Bahr, 2004; Madison et al., 2000; Okuyama-Yamamoto et al., 2005; Qiu et al., 2005). Los objetivos de este trabajo tienen como denominador común la característica de los factores guía que precisamente mejor les representa: su actividad quimiotáctica.

Así, se ha tratado de averiguar algo más acerca de la acción quimiotáctica de dos familias de factores guía, Netrinas y Semaforinas, en procesos típicos del periodo de desarrollo y de madurez del SNC: la migración de interneuronas inhibitoras y de sus axones durante el desarrollo del cerebelo y de la formación hipocampal, y la regeneración axonal de la conexión entorrino-hipocampal (también conocida por vía perforante), una de las conexiones más importantes de la formación hipocampal adulta. Concretamente, el estudio se ha centrado en conocer:

- a) la acción de *Netrina1* en la migración de interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebelar durante el desarrollo postnatal;
- b) la acción de las semaforinas secretables *Sema3A* y *Sema3F* en la migración de fibras GABAérgicas en la formación hipocampal;
- c) la influencia de *Sema3A* en la capacidad regenerativa de axones de la conexión entorrino-hipocampal o vía perforante.

A continuación se detallan los resultados obtenidos:

- en el ensayo *in vitro* de matriz de colágeno, interneuronas GABAérgicas en explantes de corteza cerebelar de ratón son repelidas por agregados de células heterólogas productoras de *Netrina1*. Dicho efecto repulsivo ocurre a distintas edades postnatales del ratón: P2, P5 y P8.
- El patrón de expresión de *Netrina1* y de sus receptores *Dcc*, *Unc5h1* y *Unc5h2* en el cerebelo del ratón durante las dos primeras semanas postnatales sugieren la participación de *Netrina1*, *Dcc*, *Unc5h1* y *Unc5h2* en la migración de interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebelar.
- *In vivo*, las interneuronas inhibitoras de la corteza cerebelar expresan *Dcc*, *Unc5h1* y *Unc5h2*, lo que refuerza la posibilidad de la influencia *in vivo* de *Netrina1* sobre interneuronas de la corteza cerebelar durante el desarrollo postnatal. Además, dichas interneuronas expresan también *Netrina1*.
- El efecto repulsivo que ejerce *in vitro* *Netrina1* sobre interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebelar a edades postnatales no está mediada por el receptor *Dcc*.
- Las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebelar viajan a través de la capa molecular en desarrollo contiguamente a fibras de la glía de Bergmann.
- En el ensayo *in vitro* de matriz de colágeno, axones GABAérgicos en explantes hipocampales de ratón son repelidos por *Sema3A* y *Sema3F* a edades embrionarias y postnatales, mientras que axones GABAérgicos en explantes entorrinales son repelidos por *Sema3F*, y no por *Sema3A*, a edades embrionarias.
- El patrón de expresión de *Sema3A*, *Sema3F* y sus respectivos receptores *Np1* y *Np2* en el hipocampo embrionario apunta a que *Sema3A* y *Sema3F* pueden influenciar *in vivo* la proyección local de axones GABAérgicos hipocampales.
- Durante el desarrollo embrionario, interneuronas inhibitoras hipocampales expresan *Np1* y *Np2*, lo que refuerza la hipótesis de un posible efecto *in vivo* por parte de *Sema3A* y *Sema3F* sobre interneuronas hipocampales durante la etapa embrionaria.

- En cultivos organotípicos entorrino-hipocampales, *Sema3A* se expresa de forma débil aunque apreciable en el hipocampo y corteza entorrinal, mientras que *Np1* muestra expresión intensa en el hipocampo y moderada en la corteza entorrinal.
- Tras axotomizar la vía perforante en cultivos organotípicos, la expresión de *Sema3A* aumenta considerablemente, especialmente en el hipocampo y de forma más atenuada en la corteza entorrinal; este aumento en el nivel de expresión de *Sema3A* se mantiene a los 10 días post-axotomía. La expresión de *Np1* aumenta en la corteza entorrinal tras axotomía, mientras que permanece igual en el hipocampo; el nivel de expresión vuelve a la normalidad tras 10 días post-axotomía.
- En cultivos entorrino-hipocampales provenientes de ratones homocigotos deficientes en *Sema3A*, la axotomía de la vía perforante da lugar a un aumento estadísticamente significativo de fibras entorrinales que invaden el hipocampo, respecto a ratones salvajes. Las fibras entorrinales regenerantes en cultivos homocigotos *Sema3A* *-/-* tienden a inervar la capa molecular del giro dentado, manteniendo por tanto la especificidad de terminación.

## **2. NETRINA1, SEMA3A Y SEMA3F ACTÚAN COMO FACTORES QUIMIOREPULSIVOS EN LA MIGRACIÓN DE INTERNEURONAS INHIBIDORAS Y DE SUS AXONES DURANTE EL DESARROLLO**

Netrina1 y la clase 3 de semaforinas secretables en vertebrados son conocidas especialmente por su efecto quimiotáctico en distintos tipos de células y axones (Barallobre et al., 2005; Fiore y Puschel, 2003). Netrina1 actúa como agente quimioatractivo o quimiorepulsivo, y está relacionada con la guía de axones y células en la línea media, una función que ha conservado a lo largo de la evolución: Unc6, el homólogo de Netrina1 en nematodos, guía a axones y células hacia la línea media ventral o lejos de ella durante el desarrollo de *C.elegans* (Lim y Wadsworth, 2002), y expresada en la placa del suelo de la médula espinal de vertebrados, Netrina1 atrae axones comisurales y somas y axones de los núcleos precerebelares, a la vez que repele axones trocleares y precursores oligodendrogiales de la medula espinal (Bloch-Gallego et al., 2005; Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995; Jarjour et al., 2003; Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Además, Netrina1 atrae in vitro axones hipocampales y cerebelofugales entre otros, (Barallobre et al., 2000; Shirasaki et al., 1995), así como precursores oligodendrogiales retinales (Spassky et al., 2002), y sin embargo repele neuronas subventriculares estriatales y células granulares del cerebelo postnatal (Alcantara et al., 2000; Hamasaki et al., 2001).

La acción de Sema3A es mayoritariamente repulsiva: repele, entre otros, axones hipocampales, septales y entorrinales a edades embrionarias y postnatales (Chedotal et al., 1998; Pascual et al., 2004b; Pascual et al., 2005; Pozas et al., 2001), y fibras musgosas de origen pontino destinadas al cerebelo (Rabacchi et al., 1999). Sema3A también repele interneuronas subcorticales en ruta hacia la corteza y el hipocampo (Marin et al., 2001; Tamamaki et al., 2003), células de la cresta neural (Eickholt et al., 1999; Gammill et al., 2006; Osborne et al., 2005) y precursores oligodendrogiales en dirección a la retina (Spassky et al., 2002). Sema3F es también un agente básicamente quimiorepulsivo: al igual que Sema3A, repele axones hipocampales y septales a edades embrionarias y postnatales, y repele axones entorrinales aunque sólo en etapas postnatales (Chedotal et al., 1998; Pascual et al., 2004b; Pascual et al., 2005; Pozas et al., 2001). También repele, junto con Sema3A, células de la cresta neural (Eickholt et al., 1999; Gammill et al., 2006; Osborne et al., 2005); en cambio, Sema3F atrae precursores oligodendrogiales en el nervio óptico y estimula su división (Spassky et al., 2002).

Dados los antecedentes de Netrina1, Sema3A y Sema3F en la guía de axones y células del SNC, quisimos averiguar algo más acerca de este aspecto de su función durante el desarrollo. Para ello, centramos nuestro estudio en la corteza cerebelar y la formación hipocampal, dos regiones del cerebro cuyo periodo de desarrollo es ampliamente conocido por nuestro grupo de investigación, tanto a nivel técnico como bibliográfico. Escogimos como protagonista del estudio a un tipo neuronal cuya etapa de migración y extensión axonal durante el desarrollo es aún poco conocida: interneuronas inhibitoras de proyección local.

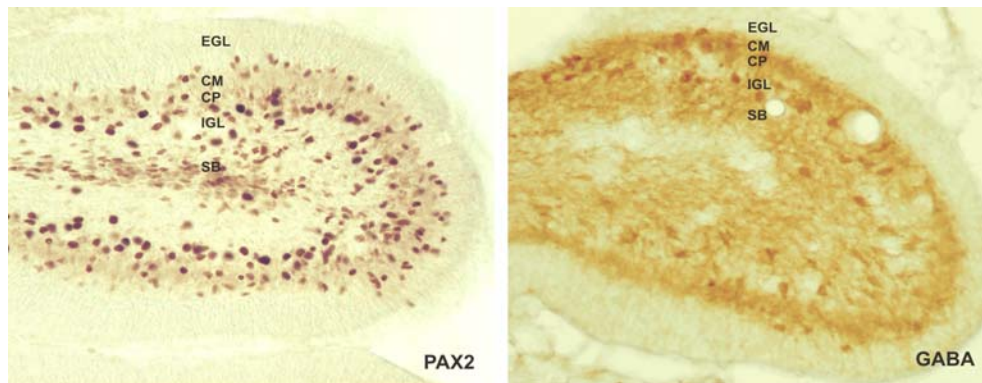
### **2.1. Netrina1 y la migración de interneuronas durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar**

Las interneuronas inhibitoras de la corteza del cerebelo, junto con las células de Purkinje, las pequeñas interneuronas inhibitoras de los núcleos profundos, y las células de la oliva inferior (origen de las fibras trepadoras que contactan con las células de Purkinje), se originan en una región del neuroepitelio romboencefálico situado por encima del cuarto ventrículo y caracterizado por la expresión de *Ptf1*, un factor de transcripción de la familia bHLH (Hatten y Heintz, 1995; Hoshino et al., 2005; Wingate, 2005). De ahí, y a partir de E11 en ratón, los precursores de las interneuronas y de las células de Purkinje migran radialmente a través del primordio cerebelar mediante fibras de la glía radial para formar, junto con los precursores de las células granulares provenientes del labio rómbico por migración tangencial, la corteza cerebelar inmadura (Hatten y Heintz, 1995; Sotelo, 2004; Yuasa et al., 1996).

En la etapa de desarrollo postnatal del cerebelo, que en ratón se extiende aproximadamente hasta la tercera semana, los precursores de las células granulares que constituyen la EGL (provenientes del labio rómbico por migración tangencial embrionaria) dejan de dividirse para migrar radialmente hacia zonas profundas de la corteza cerebelar y formar la IGL, por debajo de las células de Purkinje, que durante el periodo de desarrollo postnatal pasan de la distribución pseudoestratificada típica de edades embrionarias y perinatales, a formar paulatinamente una monocapa de células alineadas paralelamente a la superficie pial (Sotelo, 2004). Durante esta etapa, células pluripotenciales de la sustancia blanca en

activa proliferación dan lugar a precursores de interneuronas que, junto con aquellos ya dispersos por la corteza cerebelar, migran en dirección contraria a las células granulares, o sea, hacia la superficie pial para posicionarse en la IGL y capa molecular nacientes (Schilling, 2000; Sotelo, 2004).

Células granulares (y células de Purkinje en menor medida) han protagonizado hasta la fecha la mayoría de los trabajos basados en el desarrollo de la corteza cerebelar, sobretudo aquellos referentes a la etapa de migración neuronal y axonal (Hatten, 1999; Hatten y Heintz, 1995; Sotelo, 2004). En cambio, poco se conoce actualmente acerca de los mecanismos de migración de las interneuronas inhibitoras de la corteza cerebelar, repartidas entre la capa molecular y la IGL, ni tampoco sobre los factores que las guían en su viaje y determinan su posición final.



**Figura 39. Patrón de expresión de PAX2 y GABA en el cerebelo postnatal del ratón.**

Secciones sagitales de cerebelo de ratón a P5, teñidas con anticuerpos contra Pax2 (izquierda) y contra GABA (derecha). Ambos antígenos marcan interneuronas inhibitoras en la corteza cerebelar, aunque existen diferencias entre las dos poblaciones neuronales: la expresión de *Pax2* es anterior a la síntesis de GABA, por lo que se encuentra presente en aquellos precursores proliferativos de la sustancia blanca que darán lugar a interneuronas GABAérgicas. EGL: capa granular externa. CM: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. IGL: capa granular interna. SB: sustancia blanca.

Varios miembros de las distintas familias de factores guía han sido implicados en el desarrollo embrionario y postnatal del cerebelo (ver más arriba). Concretamente, en la formación de la corteza cerebelar durante el periodo postnatal, numerosas evidencias demuestran que *Netrina1* junto a *Reelina*, semaforinas y efrinas participan en la migración y posicionamiento de células granulares y células de Purkinje, así como en la extensión de sus axones (Alcantara et al., 2000; Blanco et al., 2002; Karam et al., 2000; Kerjan et al., 2005; Magdaleno et al., 2002; Miyata et al., 1996; Miyata et al., 1997). In vitro, *Netrina1* repele a los axones y los somas de las células granulares, y se expresa en la EGL durante el desarrollo postnatal (Alcantara et al., 2000); es posible que *Netrina1* actúe empujando a las células granulares fuera de la EGL, para iniciar así su viaje hacia el interior de la corteza cerebelar. Dicha hipótesis es reforzada por la expresión de receptores de *Netrina1*, *Dcc*, *Unc5h2* y *Unc5h3*, en la EGL durante el periodo postnatal (Alcantara et al., 2000). Teniendo en cuenta el patrón de expresión de *Netrina1* (cuya señal es intensa en la EGL) y que las interneuronas GABAérgicas cerebelares migran durante el mismo periodo en dirección contraria a las células granulares, nos preguntamos si *Netrina1*, además de influir en la migración de células granulares, también tenía algún efecto quimiotáctico sobre interneuronas GABAérgicas durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar.

#### 2.1.1. *Netrina1* in vitro actúa como un factor quimiorepulsivo para interneuronas de la corteza cerebelar

En el ensayo in vitro de matriz de colágeno, explantes de cerebelo postnatal de ratón, que contenían la sustancia blanca sin los núcleos profundos más la corteza cerebelar sin la capa EGL, fueron enfrentados a agregados de células heterólogas que producían *Netrina1* de forma constitutiva; tras 48-72 horas de incubación, las interneuronas GABAérgicas de los explantes cerebelares fueron visualizados mediante tinciones immunoquímicas utilizando dos anticuerpos distintos: anti-GABA y anti-Pax2, un factor de transcripción expresado por interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebelar y también por sus precursores proliferativos de la sustancia blanca durante las dos primeras semanas postnatales en el

ratón (Maricich y Herrup, 1999). Estos anticuerpos marcan dos poblaciones de interneuronas inhibitoras cerebelares algo distintas, aunque ampliamente solapadas: la población Pax2 incluye interneuronas y sus precursores que ya expresan GABA, así como precursores de interneuronas que todavía no lo expresan, algunos de los cuales tienen además capacidad de división (Maricich y Herrup, 1999).

Ambas poblaciones de interneuronas cerebelares (GABA o Pax2) en explantes de todas las edades postnatales testadas (P2, P5 y P8) mostraron una respuesta repulsiva ante Netrina1, reflejada en la diferencia estadísticamente significativa obtenida al comparar el índice del número de células en el cuadrante proximal y distal (índice proximal/distal, P/D) entre la situación control y Netrina1

Por lo tanto, Netrina1 tiene un efecto quimiorrepulsivo in vitro sobre interneuronas GABAérgicas y Pax2-positivas durante el periodo inicial del desarrollo postnatal. El hecho de que ambas poblaciones neuronales respondan de forma similar ante un gradiente de Netrina1 sugiere que las interneuronas cerebelares son sensibles a dicho factor guía desde etapas tempranas de su programa ontogénico, ya que la expresión de Pax2 es anterior al inicio de la síntesis de GABA (figura 39) (Maricich y Herrup, 1999).

### 2.1.2. Posible acción in vivo de Netrina1 en la migración de interneuronas de la corteza cerebelar

A continuación, y después de haber demostrado la acción quimiorrepulsiva de Netrina1 sobre interneuronas inhibitoras in vitro, planteamos la hipótesis de que Netrina1 tuviera algún papel en la guía de interneuronas inhibitoras durante su migración a través de la corteza cerebelar. Para ello, realizamos hibridaciones in situ en cortes de cerebelo de ratón de distintas edades comprendidas en las dos primeras semanas postnatales, usando como sonda oligoribonucleótidos complementarios al RNA mensajero de los genes *Netrina1* y sus receptores *Dcc*, *Unc5h2* y *Unc5h3*.

La expresión de *Netrina1* es evidente en la EGL y de forma puntual en células distribuidas por toda la corteza cerebelar, mientras que el patrón de expresión de *Dcc*, *Unc5h2* y *Unc5h3*, cuya señal está presente en todas las capas de la corteza cerebelar y también en la sustancia blanca, apuntaba a la posibilidad de que las interneuronas inhibitoras expresaran receptores de Netrina1 y, por tanto, fueran in vivo sensibles al factor guía. En ese sentido, demostramos que, efectivamente, interneuronas inhibitoras en la corteza cerebelar postnatal colocalizan Pax2 y el RNA mensajero de *Dcc*, *Unc5h2* y *Unc5h3*, así como el de *Netrina1*.

¿De qué manera podía Netrina1 participar in vivo en la migración postnatal de interneuronas inhibitoras de la corteza cerebelar? Teniendo en cuenta la intensa señal de expresión de *Netrina1* en la EGL postnatal, y el efecto quimiorrepulsivo de Netrina1 in vitro sobre interneuronas también en edades postnatales, proponemos que, in vivo, Netrina1 actúa como un factor repulsivo para interneuronas inhibitoras en migración, impidiendo que éstas invadan erróneamente la EGL y ayudando a mantenerlas en la capa molecular incipiente (figura 40). Aunque en el ensayo de matriz de colágeno parece que Netrina1 funciona como quimiorrepulsor mediante una distribución en gradiente de largo alcance, in vivo Netrina1 probablemente actúe como un factor repulsivo de corto alcance, de manera que permitiría a las interneuronas migrantes acercarse hasta el límite de la EGL, pero sin traspasarlo (como ocurre durante el desarrollo de la corteza cerebelar). La diferencia entre el mecanismo de acción de Netrina1 in vivo e in vitro puede responder a distintos motivos, entre ellos:

- una concentración de Netrina1 en la EGL menor que en los agregados de células heterólogas (sistemas de expresión conocidos por producir en exceso la proteína en cuestión), o una menor cantidad de moléculas de receptor en la superficie de las interneuronas en migración que haría que, in vivo, las interneuronas interpretaran la señal de Netrina1 con retraso o con atenuación respecto a la situación in vitro;
- la presencia de otras señales en la matriz extracelular de la corteza cerebelar, que modulen la respuesta de las interneuronas migrantes ante Netrina1 atenuando su acción quimiorrepulsiva, por lo que las interneuronas, en vez de migrar en dirección contraria a la fuente de Netrina1, simplemente se detienen.



Existen otros factores guía cuya presencia en la corteza cerebelar postnatal puede influir en la migración y posicionamiento de células granulares y células de Purkinje; por lo tanto, cualquiera de estos factores guía podría también participar en algún aspecto de la migración de interneuronas inhibitoras o de sus axones en la corteza cerebelar en desarrollo:

- la expresión de *Reelina* en la NTZ (constituida por neuronas de los núcleos profundos) y en la EGL, junto con el hecho de que la aplicación del anticuerpo anti-Reelina CR50 a rebanadas de cerebelo produce en ellos un fenotipo reeler (Miyata et al., 1997), sugiere que Reelina en la corteza cerebelar actúa de frontera para las células de Purkinje en migración durante edades embrionarias, obligándolas a detenerse, así como de marco de referencia para su correcta alineación durante la etapa postnatal (Jensen et al., 2002; Miyata et al., 1996).

- Efrinas-eph parecen influir en la migración de las células granulares de dos modos: en la migración tangencial dentro de la zona pre-migratoria de la EGL, y en la migración radial hacia la IGL en forma de filas o cintas de células granulares que respetan los límites de las bandas parasagittales establecidas por la expresión de distintas Efrinas-eph (Blanco et al., 2002; Karam et al., 2000).

- La expresión postnatal temprana de *Sema3A* en forma de bandas parasagittales permitiría establecer el inicio del patrón de inervación de las fibras musgosas, en función de su sensibilidad a Sema3A, en compartimientos sagittales tal y como se observa en el cerebelo adulto (Herrup y Kuemerle, 1997; Nieuwenhuys et al., 1998) mientras que la expresión tardía de *Sema3A* y homogénea en la capa de células de Purkinje puede determinar la especificidad de inervación de las aferencias a la corteza cerebelar por parte de las fibras musgosas (sensibles al colapso producido por Sema3A) y fibras trepadoras (que no responden a Sema3A) (Rabacchi et al., 1999).

- Sema6A, una semaforina transmembrana de tipo I sintetizada únicamente en células granulares postmitóticas (situadas en la región profunda de la EGL) parece influir in vivo en el proceso migratorio de las células granulares: se ha propuesto que Sema6A actúe como un factor repelente de contacto que genera la interacción entre células granulares, estimulándolas a iniciar la migración en dirección a la IGL (Kerjan et al., 2005).

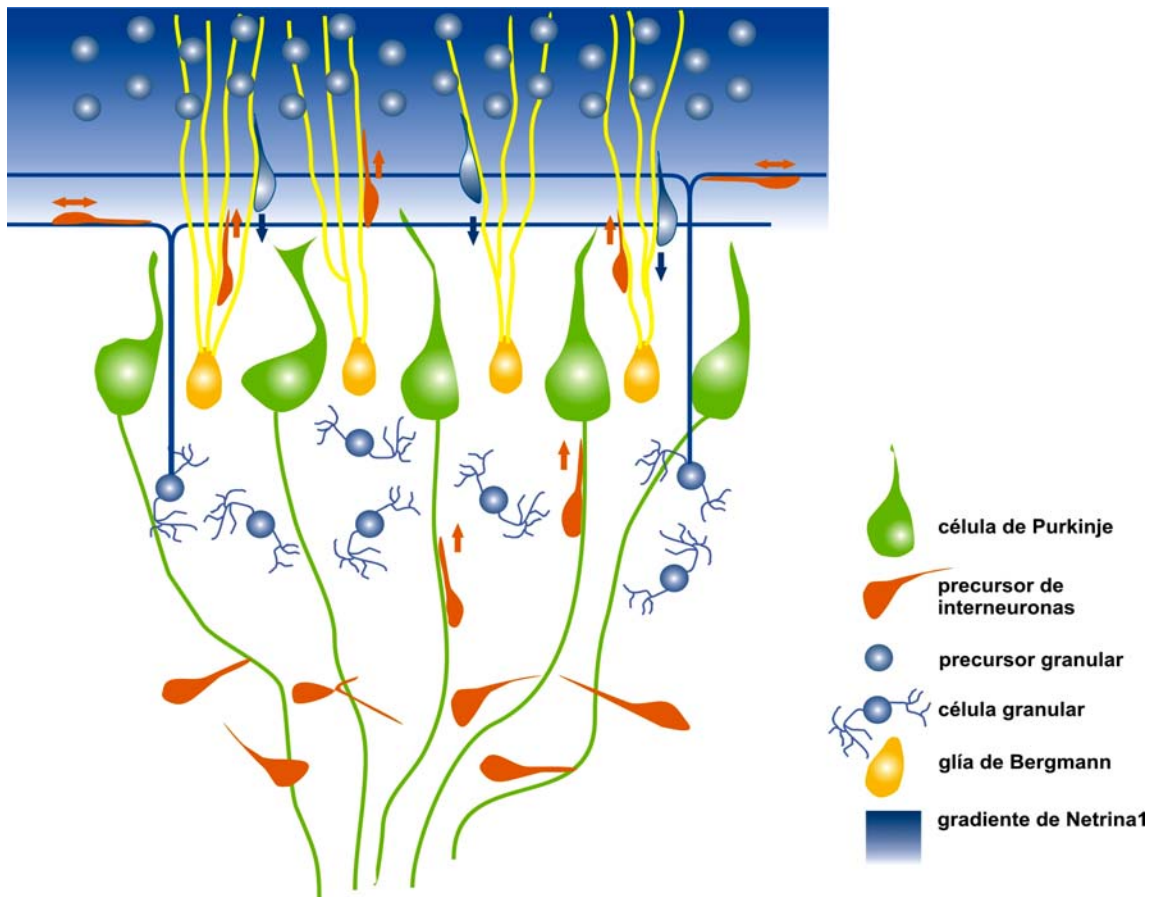
Por último, cabe mencionar un posible efecto atractivo de las células granulares sobre otros tipos celulares de la corteza cerebelar: en ratones quimera en la expresión de  $\beta$ Gal y de una versión mutada del gen *Unc5h3* responsable del fenotipo rcm, las ectopias de tejido cerebelar presentes en zonas mesencefálicas anteriores (colículos y tegmentum) están formadas por células granulares que en un 90% son de origen mutante, mientras que la contribución de células de Purkinje y células de la glía de Bergmann a dichas ectopias es una mezcla de células mutantes y salvajes (Goldowitz et al., 2000). Por lo tanto, son las células granulares las que determinan las ectopias en el animal mutante rcm, liderando la invasión anómala del mesencéfalo por parte de células de Purkinje y gliales. Luego, las células granulares también podrían atraer a interneuronas de la corteza cerebelar in vivo, al igual que células de Purkinje y de la glía de Bergmann; de hecho, las interneuronas en cultivo evitan los acúmulos de células granulares (Koscheck et al., 2003).

### 2.1.3. Dcc no transduce la señal quimiorrepulsiva de Netrina1 en interneuronas de la corteza cerebelar

Del conjunto de proteínas que pueden actuar como receptores de Netrina1, las familias Dcc y Unc5 son las que con más frecuencia han sido relacionadas en procesos de guía celular y axonal inducidos por Netrina1. Dcc media respuestas atractivas, y en combinación con Unc5h transduce señales repulsivas (Barallobre et al., 2005). Sin embargo, existen numerosas evidencias de que Unc5 puede generar repulsión ante Netrina1 en ausencia de Dcc: en *C.elegans*, Unc5 puede funcionar independientemente de Dcc en migraciones dorsales de axones y células (o sea, repulsivas desde la línea media ventral), y que la intervención de Dcc es prescindible en la función quimiorrepulsiva de Unc5 (Hedgecock et al., 1990; Merz et al., 2001); en *Drosophila*, Unc5 puede producir respuestas repulsivas de corto alcance en ausencia de Frazzled (homólogo de Dcc) (Keleman y Dickson, 2001; Winberg et al., 1998a), mientras que en acciones repulsivas de largo alcance participan ambas proteínas (Keleman y Dickson, 2001).

Nos propusimos averiguar si Dcc participaba en la respuesta repulsiva desencadenada por Netrina1 en interneuronas inhibitoras de la corteza cerebelar. Para ello, recurrimos de nuevo al ensayo de matriz de colágeno, con la diferencia de la adición de anticuerpos anti-Dcc bloqueantes de su función (Barallobre et al., 2000; Hamasaki et al., 2001; Tsai et al., 2003). En presencia de anticuerpos

bloqueantes contra Dcc, no se aprecia alteración alguna en la respuesta repulsiva de interneuronas en explantes de cerebelo postnatal ante agregados celulares productores de Netrina1; en cambio, anticuerpos bloqueantes contra Dcc sí consiguen suprimir el efecto atractivo que Netrina1 ejerce sobre axones de explantes hipocampales embrionarios. Por lo tanto, los resultados apuntan a que Dcc transduce la señal atractiva de Netrina1 en axones hipocampales embrionarios, y sin embargo no forma parte de la señalización de la respuesta repulsiva de interneuronas cerebelares ante Netrina1.



**Figura 40. Migración de las interneuronas inhibitorias durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar.**

La población celular de la sustancia blanca del cerebelo continúa proliferando durante la etapa postnatal del cerebelo y generan interneuronas inhibitorias y células de la glía (Zhang y Goldman, 1996). Los precusores de las interneuronas migran hacia la superficie pial, en dirección contraria a los precusores granulares, que en el mismo periodo migran hacia zonas profundas de la corteza para formar la capa granular. Existen tres sustratos candidatos a participar en la migración de las interneuronas GABAérgicas: fibras mielinizadas (axones de las células de Purkinje, fibras musgosas o fibras trepadoras) que les permitirían viajar desde la sustancia blanca hasta la capa de células de Purkinje (Mathis et al., 2003); fibras de la glía de Bergmann, que facilitarían el desplazamiento de interneuronas a través de la capa molecular de forma análoga a las células granulares (Schilling, 2000) (el presente estudio); y por último, las fibras paralelas de las células granulares, que permitirían la expansión de las interneuronas de la capa molecular en el plano coronal (Zhang y Goldman, 1996). Netrina1 repele in vitro a células granulares e interneuronas GABAérgicas (Alcantara et al., 2000) (el presente estudio), y expresada en la EGL, podría funcionar in vivo empujando a células granulares hacia regiones profundas de la corteza, y al mismo tiempo impidiendo que interneuronas inhibitorias invadan erróneamente la EGL.

Otras proteínas, además de Dcc y Unc5, han sido implicadas como receptores de Netrina1: integrinas (Yebra et al., 2003) y el receptor de Adenosina A2b (Corset et al., 2000; Shewan et al., 2002). Sin embargo, creemos que lo más probable es que la señal repulsiva de interneuronas cerebelares ante Netrina1 sea mediada por Unc5h1 o Unc5h2, o ambas a la vez, ya que, al igual que Dcc, las proteínas Unc5 pueden interaccionar entre ellas formando complejos en la superficie celular (Merz et al., 2001). Ya se ha mencionado anteriormente que los receptores Unc5 pueden transducir respuestas repulsivas en ausencia de Dcc (Hedgecock et al., 1990; Merz et al., 2001) y en concreto, ante gradientes de Netrina1 de corto alcance (Keleman y Dickson, 2001; Winberg et al., 1998a), hecho que refuerza nuestra hipótesis sobre la acción de Netrina1 en la migración de interneuronas inhibitorias durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebelar: Netrina1 producida por células de la EGL generaría una respuesta repulsiva de corto alcance en interneuronas migrantes que sería transducida por receptores Unc5h, y que

permitiría a las interneuronas ocupar toda la extensión de la capa molecular sin invadir erróneamente la EGL.

#### 2.1.4. La glía de Bergmann como sustrato para la migración de interneuronas en la corteza cerebelar postnatal

Durante el desarrollo de la corteza cerebelar, las fibras gliales constituyen el principal sustrato utilizado por los distintos tipos celulares en migración: durante el periodo embrionario del desarrollo, las células de Purkinje migran a través del primordio cerebelar en contacto con fibras de la glía radial (Yamada y Watanabe, 2002), y en el periodo postnatal, las células granulares de la EGL migran hacia la IGL estrechamente asociadas a las fibras de la glía de Bergmann (Hatten, 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que la glía de Bergmann también sirve de soporte para las interneuronas que migran en dirección pial, corroborando así previos estudios (Delaney et al., 1996; Magyar-Lehmann et al., 1995; Schilling, 2000): *in vitro*, células inmunopositivas para GABA abandonan el explante cerebelar frecuentemente asociadas a fibras que expresan GFAP, tal y como indican las numerosas zonas de colocalización de los antígenos GABA y GFAP en imágenes obtenidas por microscopía confocal; e *in vivo*, interneuronas en la corteza cerebelar (identificadas inmunohistoquímicamente mediante el marcador Pax2, o bien mediante el marcador  $\beta$ Gal asociado a la expresión del factor de transcripción Ptf1) se encuentran a menudo yuxtapuestas a fibras de la glía de Bergmann (inmunopositivas para GFAP).

Por lo tanto, las interneuronas destinadas a la capa molecular de la corteza cerebelar podrían migrar en dirección contraria a células granulares de la EGL usando ambos tipos neuronales el mismo sustrato: las fibras de la glía de Bergmann. Previos trabajos corroboran dicha suposición: en animales mutantes o tratados en los que la migración de las células granulares resulta interrumpida, las interneuronas migran hasta la capa molecular en ausencia de fibras paralelas (otro de los sustratos candidatos a sustentar la migración de interneuronas de la corteza cerebelar, ver siguiente párrafo) (Schilling, 2000); y en cultivo, se observan interneuronas en migración asociadas a fibras astrogiales (Koscheck et al., 2003; Magyar-Lehmann et al., 1995).

Además de las fibras de la glía de Bergmann, varios estudios proponen otros posibles sustratos para la migración de interneuronas cerebelares: *in vivo* se observa una mayor dispersión de interneuronas de la capa molecular en el plano tangencial/coronal que en el plano sagital/radial, por lo que se ha propuesto que las interneuronas, una vez alcanzada la capa molecular, se distribuyan en ella siguiendo los dos brazos tangenciales de las fibras paralelas, que se extienden tangencialmente (en el plano coronal) (Zhang y Goldman, 1996b); e *in vitro*, las interneuronas abandonan microexplantes cerebelares asociados a axones de células granulares (Magyar-Lehmann et al., 1995). Por otra parte, la ablación selectiva de oligodendrocitos durante la primera semana postnatal produce una drástica disminución del número de interneuronas en la capa molecular; este hecho ha sido atribuido a la posible acción de la glía mielinizante como sustrato de la migración de interneuronas o bien estimulando su supervivencia o diferenciación (Mathis et al., 2003). Hay que tener en cuenta que los explantes utilizados en nuestros experimentos *in vivo* contienen todas las capas de la corteza cerebelar excepto la EGL, por lo que, además de glía de Bergmann, probablemente haya en dichos explantes oligodendrocitos y células granulares. Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo, no podemos descartar que, tanto *in vitro* como *in vivo*, las fibras mielinizadas de la corteza cerebelar (axones de células de Purkinje, fibras trepadoras o fibras musgosas) o bien las fibras paralelas de las células granulares sirvan como sustrato, junto con la glía de Bergmann, en la migración de las interneuronas cerebelares (figura 40).

## **2.2. Sema3A, Sema3F y la migración de axones GABAérgicos hipocampales durante el desarrollo de la formación hipocampal**

En el ratón, las primeras aferencias en llegar al hipocampo son los axones entorrinales, que son detectados inicialmente a E15, y a E16 invaden el hipocampo, formando entre E17 y E19 una densa inervación en la zona marginal externa (futuro estrato lacunosum-moleculare) (Soriano et al., 1994; Super et al., 1998a). A E17 aparecen en el hipocampo los primeros axones provenientes del septum medial, y partir de P0, las fibras septales empiezan a ramificarse por todas las capas del hipocampo, con cierta preferencia por el estrato oriens y la interfase entre los estratos radiado y lacunosum-moleculare; la proyección inicial es colinérgica, mientras que a partir de P0 es mayoritariamente GABAérgica (Soriano et al., 1994). La proyección asociacional inerva la CA1 ipsilateral a partir de E16-17. Por último, los axones comisurales/asociacionales originados en la CA3 aparecen por primera vez en el hipocampo contralateral a E18, y más tarde (P0) invaden el alveus, el estrato oriens (o subplaca) y el estrato radiado (o zona marginal interna), formando así la proyección comisural; (Soriano et al., 1994).

Sin embargo, muy poco se sabe acerca de cómo se desarrollan los axones GABAérgicos en el hipocampo, la mayoría de los cuales son de proyección local. Únicamente una parte de ellos proyecta desde los estratos oriens y radiado al septum medial durante el desarrollo embrionario (Super y Soriano, 1994). Esta proyección es considerada pionera para axones del septum que inervan el hipocampo, y al menos parte de la proyección hipocampo-septal GABAérgica se mantiene en el adulto (Super y Soriano, 1994).

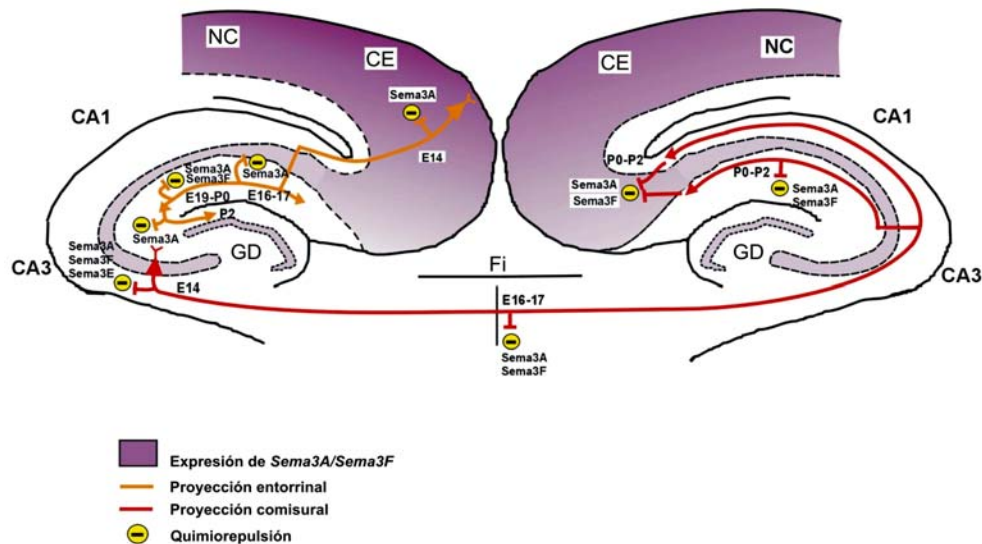
Varios factores guía han sido implicados en la formación de las principales conexiones del hipocampo in vivo, entre ellos algunos miembros de la clase 3 de semaforinas secretables. En ratón, Sema3A repele in vitro axones hipocampales y entorrinales a partir de E14 y hasta P2, mientras que Sema3F repele axones hipocampales durante el mismo periodo, y repele axones entorrinales solamente desde E16 a P0 (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001). Sema3A expresada desde la neocorteza y la corteza entorrinal probablemente repele in vivo axones hipocampales embrionarios hacia la fimbria, iniciando así su trayectoria hacia regiones diana (Chedotal et al., 1998). Sema3A y Sema3F (que al igual que Sema3A se expresa intensamente en neocorteza y corteza entorrinal a edades embrionarias) repelen in vivo axones entorrinales empujándolos hacia el hipocampo (Pozas et al., 2001). Sema3A posiblemente interviene en la formación de la proyección entorrino-hipocampal y de la proyección musgosa desde la capa granular del giro dentado (Steup et al., 2000; Steup et al., 1999), y determina la correcta especificidad en la terminación de axones entorrinales en el hipocampo (Pozas et al., 2001). Sema3A y Sema3F participan en la formación de la conexión septo-hipocampal (Pascual et al., 2004b; Pascual et al., 2005), e inducen la poda axonal de las proyecciones hipocampo-septal y musgosa, respectivamente (Bagri et al., 2003; Chen et al., 2000a; Giger et al., 2000; Liu et al., 2005; Sahay et al., 2003). Sema3C repele axones del septum medial in vitro, y expresada en las capas piramidal del hipocampo, in vivo podría restringir a dichos axones a sus regiones mayoritarias de terminación: estratos oriens y radiado (Steup et al., 2000).

Sema3A y Sema3F parecen ser las semaforinas secretables de mayor peso en la formación de las principales conexiones del hipocampo durante el desarrollo, posiblemente mediante mecanismos quimiorrepulsivos. Nosotros nos propusimos averiguar si, además, también tienen actividad quimiotáctica en la formación de conexiones hipocampales de proyección local, mayoritariamente formadas por fibras GABAérgicas.

### **2.2.1. Sema3A y Sema3F son factores quimiorrepulsivos para axones GABAérgicos hipocampales y entorrinales in vitro**

En el ensayo de matriz de colágeno, explantes embrionarios (E16) y postnatales (P0) de hipocampo enfrentados a agregados de células que producen de forma transitoria Sema3A, y posteriormente teñidos mediante inmunocitoquímica contra GABA tras 72 horas de cultivo, muestran una evidente repulsión axonal, reflejada en la diferencia estadísticamente significativa obtenida al comparar el índice del número de axones en el cuadrante proximal y distal (índice proximal/distal, P/D) entre explantes control, Sema3A y Sema3F. Por lo tanto, Sema3A y Sema3F tienen in vitro un efecto quimiorrepulsivo en axones hipocampales embrionarios y postnatales.

Usando el mismo ensayo *in vitro*, también se testó la actividad quimiotáctica de Sema3A y Sema3F ante explantes de corteza entorrinal embrionaria, y se pudo observar que, mientras Sema3F repele axones entorrinales a E14 y E16, Sema3A no parece tener ningún efecto sobre ellos a esas mismas edades, siendo el crecimiento axonal que emana de los explantes entorrinales básicamente radial. Entonces, únicamente Sema3F repele *in vitro* axones entorrinales a edades embrionarias.



**Figura 41.** Acción *in vivo* de Sema3A y Sema3F en el establecimiento de la proyección entorrinal y comisural de la formación hipocampal de ratón.

Durante el periodo de formación de la proyección entorrino-hipocampal y comisural (E14-P2) la expresión de Sema3A y Sema3F es elevada en neocorteza y corteza entorrinal, y baja en el hipocampo y giro dentado; por lo tanto, ambas semaforinas podrían actuar *in vivo* empujando a los axones entorrinales hacia el hipocampo, e impidiendo la invasión errónea de esas regiones por parte de los axones comisurales. La expresión moderada de ambas semaforinas en la capa piramidal del hipocampo podría participar en la restricción laminar de las aferencias entorrinales y comisurales (adaptado de Pozas et al., 2001). CA: región CA del hipocampo. CE: corteza entorrinal. Fi: fimbria. GD: giro dentado. NC: neocorteza.

### 2.2.2. En el hipocampo, Sema3A y Sema3F actúan de forma similar sobre axones locales y de proyección

De los resultados obtenidos se deduce que, durante el desarrollo embrionario y postnatal, los axones GABAérgicos hipocampales se comportan igual que la población axonal positiva para  $\beta$ tubulina clase III, cuya mayor proporción la componen axones glutamatérgicos. Por lo tanto, la posible función *in vivo* de Sema3A y Sema3F en las conexiones excitatorias del hipocampo en desarrollo, inferido a partir de su efecto quimiorrepulsivo *in vitro* (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001), puede ser en parte, similar sobre axones GABAérgicos: así, Sema3A y Sema3F expresados en la neocorteza y corteza entorrinal actuarían como agentes quimiorrepulsivos sobre axones glutamatérgicos y GABAérgicos, impidiendo la invasión errónea de la neocorteza y la corteza entorrinal; junto con la expresión de ambas semaforinas secretables en la capa piramidal del hipocampo, su efecto repulsivo empujaría fuera del hipocampo embrionario a axones glutamatérgicos de proyección externa, así como a axones GABAérgicos que proyectan al septum medial.

Otros mecanismos mantienen a los axones GABAérgicos de proyección local restringidos en los límites del hipocampo, o bien empujan a los axones de proyección tanto GABAérgicos como glutamatérgicos fuera de él: por ejemplo, los axones hipocampales podrían ser sensibles a un conjunto de señales proporcionadas por el entorno, que incluiría a Sema3A y Sema3F, y que serían interpretadas de forma global dando lugar a una respuesta específica por parte de las interneuronas de proyección local, distinta a la respuesta de neuronas piramidales y GABAérgicas de proyección externa (figura 41). Entre los posibles elementos extracelulares candidatos a influir en la extensión axonal local de interneuronas GABAérgicas se encuentran varios factores guía:

- Netrina1, cuya expresión en la fimbria atrae a axones hipocampales comisurales y a axones septo-hipocampales (Barallobre et al., 2000; Pascual et al., 2004b);
- efrinas/eph, que participan en la formación de la proyección entorrinal y comisural (Martinez y Soriano, 2005);
- slits, cuyo patrón expresión y el de sus receptores Robo en el hipocampo embrionario da a entender que podrían participar en la guía de las principales conexiones de la formación hipocampal (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999).

### 2.2.3. Sema3A y Sema3F pueden actuar en el hipocampo in vivo restringiendo la actividad sináptica inicial a los estratos radiado y lacunosum-moleculare

En el hipocampo, las interneuronas GABAérgicas se generan antes que las neuronas piramidales (Soriano et al., 1986). De igual modo, las sinapsis GABAérgicas excitadoras aparecen también antes que las glutamatérgicas, y son responsables de la actividad eléctrica inicial en el hipocampo ya desde la edad embrionaria (Ben-Ari et al., 2004). De hecho, tanto neuronas piramidales como interneuronas GABAérgicas siguen una secuencia de desarrollo similar según tres fases (Gozlan y Ben-Ari, 2003; Hennou et al., 2002; Tyzio et al., 1999):

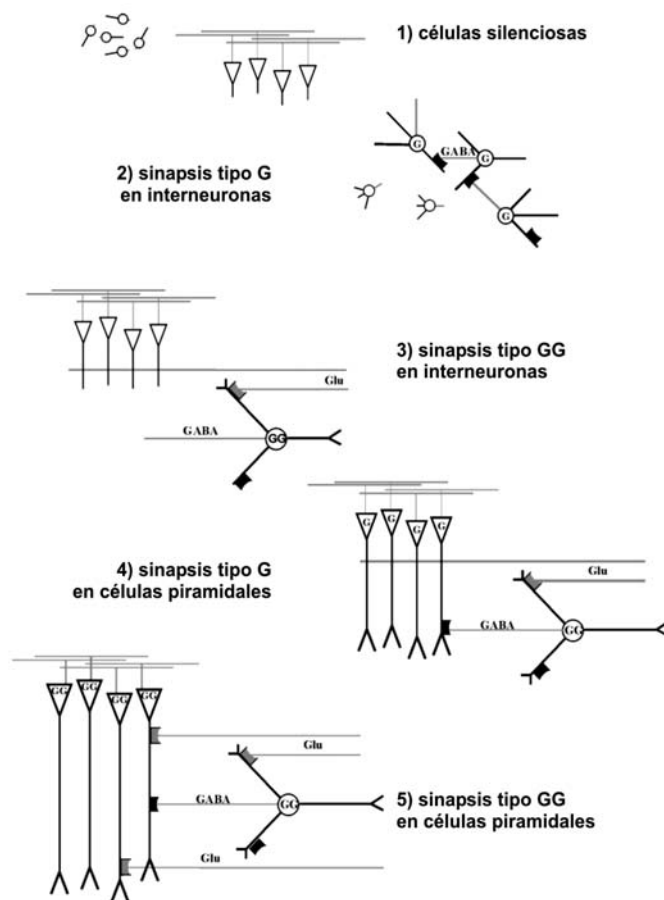
- 1) neuronas silenciosas, sin corrientes postsinápticas evocadas o espontáneas. Las neuronas piramidales muestran en esta fase inicial un soma pequeño, sin dendrita basal y únicamente con un primordio de dendrita apical casi siempre restringida a la capa piramidal; mientras que en las interneuronas GABAérgicas se observa un soma pequeño y axones y dendritas poco desarrollados, restringidos al mismo estrato.
- 2) neuronas con corrientes postsinápticas mediadas por receptores GABA tipo A y morfológicamente más desarrolladas que en la fase anterior: así, las neuronas piramidales muestran un soma de mayor tamaño, una dendrita apical que arboriza en el estrato radiado, y un primordio de dendrita basal en el estrato oriens, mientras que en las interneuronas GABAérgicas (llamadas en esta fase interneuronas G), axón y dendritas son más largos.
- 3) neuronas con corrientes postsinápticas mediadas por receptores GABAA y NMDA (y en algún caso, también AMPA), o sea GABAérgicas y glutamatérgicas. En esta fase, las neuronas piramidales muestran dendritas basales conspicuas y una dendrita apical más desarrollada que ya alcanza el estrato lacunosum-moleculare, mientras que axones y dendritas de las interneuronas GABAérgicas (llamadas en esta fase interneuronas GG) están más extendidos y más ramificados que en la fase anterior.

Por lo tanto, en ambos tipos neuronales, el avance en el desarrollo morfológico se correlaciona con su maduración sináptica, proceso que se traduce en la formación de sinapsis funcionales GABAérgicas primero, y glutamatérgicas más adelante (Gozlan y Ben-Ari, 2003; Hennou et al., 2002; Tyzio et al., 1999). Sin embargo, las interneuronas GABAérgicas empiezan el programa de desarrollo antes que las neuronas piramidales, cosa que concuerda con su temprana generación (también anterior al de las neuronas piramidales, (Soriano et al., 1986)): así, en P0, el 78% de interneuronas y el 8% de neuronas piramidales muestran sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas (o sea, se encuentran en la última fase de desarrollo), mientras que el 5% de interneuronas y el 79% de neuronas piramidales son silenciosas (Gozlan y Ben-Ari, 2003; Hennou et al., 2002; Tyzio et al., 1999).

En la actualidad existe un modelo de establecimiento del circuito eléctrico hipocampal (figura 42) (Gozlan y Ben-Ari, 2003); según éste, la actividad sináptica inicial comienza en el estrato radiado y es generada por conexiones excitatorias entre interneuronas, mediadas por receptores GABA tipo A. En estas mismas interneuronas aparece más tarde actividad eléctrica excitatoria a través de receptores glutamatérgicos, proporcionada por su conexión con fibras aferentes al hipocampo (fibras comisurales/asociacionales (Hennou et al., 2002; Super et al., 1998a)). Para entonces, la dendrita apical de las neuronas piramidales ocupa ya el estrato radiado y parte del lacunosum-moleculare, y empieza a recibir contactos sinápticos excitatorios: primero, a través de receptores GABA A en terminales axónicos de interneuronas GABAérgicas, y más tarde, a través de receptores glutamatérgicos en fibras aferentes de la conexión comisural/asociacional. Según este modelo, en el inicio de la formación del circuito eléctrico hipocampal no resulta esencial la presencia de aferencias al hipocampo (que lo invaden ya a edades tempranas del desarrollo (Soriano et al., 1994)) y sí que resulta especialmente relevante:

a) la presencia de interneuronas GABAérgicas sinápticamente maduras, que inician el circuito eléctrico en el hipocampo al realizar contactos sinápticos entre ellas, y que actúan como dianas intermedias transitorias para la conexión de las aferencias hipocampales con su diana definitiva, la neurona piramidal. En ese sentido, las células de Cajal-Retzius en el estrato lacunosum-moleculare son también dianas sinápticas intermedias, ya que establecen contactos sinápticos con aferencias entorrinales antes de que la dendrita apical de las neuronas piramidales haya crecido hasta el estrato lacunosum-moleculare (Hennou et al., 2002; Super et al., 1998a). Sin embargo, el papel de las interneuronas GABAérgicas como dianas transitorias para aferencias al hipocampo queda cuestionado por el trabajo de Pleasure y colaboradores (Pleasure et al., 2000), donde muestran que las conexiones hipocampales comisurales se forman correctamente en ausencia de toda interneurona GABAérgica.

b) El grado de desarrollo morfológico de la neurona piramidal, ya que es necesaria la extensión de su dendrita apical a través de los estratos radiado y lacunosum-moleculare para poder recibir los contactos sinápticos de interneuronas GABAérgicas primero, y de las aferencias hipocampales después (Hennou et al., 2002).



**Figura 42. Secuencia temporal del establecimiento del circuito sináptico en el hipocampo.**

1) Células piramidales (triangulares) e interneuronas (redondas) no presentan sinapsis funcionales (células silenciosas). 2) interneuronas expresan receptores GABA<sub>A</sub> y establecen sinapsis GABAérgicas excitatorias con otras interneuronas (sinapsis tipo G). 3) interneuronas expresan receptores de glutamato, y además de las sinapsis GABAérgicas, en esta etapa también presentan sinapsis excitatorias glutamatérgicas con las primeras aferencias al hipocampo (sinapsis tipo GG). 4) las dendritas apicales de las células piramidales, ya suficientemente formadas, reciben la conexión GABAérgica excitatoria (mediada por receptores GABA<sub>A</sub>) por parte de interneuronas (sinapsis tipo G). 5) Finalmente, las células piramidales expresan receptores GABA<sub>A</sub> y receptores de glutamato, y forman sinapsis GABAérgicas con interneuronas y sinapsis glutamatérgicas con fibras aferentes al hipocampo (que previamente ya habían contactado con interneuronas) (adaptado de Gozlan y Ben-Ari, 2003).

Nuestros resultados muestran que, en E16 y P0, el efecto in vitro de Sema3A y Sema3F sobre axones GABAérgicos hipocampales es claramente repulsivo; también muestran que la señal de expresión de *Sema3A* y *Sema3F*, igual que la de sus respectivos receptores *Np1* y *Np2*, se distribuye in vivo de forma asimétrica, mostrando un nivel intenso en el alveus, zona intermedia y estratos oriens y piramidal, mientras que en los estratos radiado y lacunosum-moleculare prácticamente no se observa expresión. Es precisamente en el estrato radiado, y posteriormente en el estrato lacunosum-moleculare, por donde se extiende la dendrita apical de las neuronas piramidales (que se desarrolla antes que la dendrita basal en el estrato oriens) y donde empieza la actividad eléctrica en el hipocampo, generada por contactos sinápticos GABAérgicos entre interneuronas primero, y más tarde por contactos sinápticos de interneuronas y aferencias excitadoras con las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Gozlan y Ben-Ari, 2003; Hennou et al., 2002; Tyzio et al., 1999). Por lo tanto, nosotros proponemos que la ausencia de expresión de *Sema3A* y *Sema3F*, y de sus receptores *Np1* y *Np2* en los estratos radiado y

lacunosum-moleculare permiten la elongación axonal de interneuronas GABAérgicas locales y el contacto con las dendritas piramidales apicales en desarrollo, mientras que la expresión de dichas semaforinas y neuropilinas en el resto de estratos, junto con el hecho de que interneuronas en estos estratos expresan *Np1* y *Np2*, actúa impidiendo la extensión neurítica de interneuronas y en consecuencia la formación de contactos sinápticos en el estrato oriens y piramidal, a la espera de que las dendritas piramidales basales, cuyo desarrollo es posterior al de las dendritas apicales, se extiendan lo suficiente. Además, y teniendo en cuenta que las neuronas piramidales en el hipocampo, así como las neuronas estrelladas y piramidales en la corteza entorrinal, también expresan neuropilinas, y que todas ellas responden con repulsión ante una fuente de Sema3A o Sema3F (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001), es posible que Sema3A y Sema3F actúen restringiendo no solamente el crecimiento neurítico de axones GABAérgicos, sino también el de aferencias glutamatérgicas (comisurales/asociacionales en los estratos radiado y oriens, entorrinales en el estrato lacunosum-moleculare), manteniéndolas así también a la espera de la extensión de las dendritas piramidales apicales primero, y basales después. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que en el ratón mutante en *Sema3A*, algunas fibras entorrinales ectópicas invaden el estrato radiado e hilus (Pozas et al., 2001).

#### 2.2.4. En el hipocampo, Sema3A y Sema3F actúan de forma opuesta sobre aferencias entorrinales excitatorias y GABAérgicas.

A edades embrionarias, axones GABAérgicos entorrinales migran in vitro en contra de un gradiente de Sema3F, pero no responden ante Sema3A. Curiosamente, a las mismas edades, el comportamiento in vitro de axones entorrinales glutamatérgicos (que, igual que en el hipocampo, componen la mayoría de la población axonal positiva para  $\beta$ tubulina clase III) es el contrario: son sensibles al efecto repulsivo de Sema3A, pero no responden a Sema3F hasta después de E16 (Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001). Se ha sugerido que Sema3A intervenga in vivo en la guía de la conexión entorrinal a través del hipocampo (Steup et al., 2000; Steup et al., 1999), y la expresión de *Sema3A* y *Sema3F* en la capa piramidal del hipocampo embrionario que muestran éste y otros trabajos (Chedotal et al., 1998) podría influir de algún modo en la correcta terminación de axones entorrinales dentro del estrato lacunosum-moleculare. Teniendo en cuenta que la vía perforante tiene también un componente GABAérgico (Germroth et al., 1989), es plausible suponer que Sema3A y Sema3F influyan de forma independiente en la guía de axones entorrinales glutamatérgicos y GABAérgicos respectivamente, quizás debido a la distinta dotación de receptores entre los dos tipos de axones: a edades embrionarias, los axones excitatorios expresarían *Np1* y no *Np2*, y responderían únicamente a Sema3A, mientras que los inhibitorios expresarían *Np2* y no *Np1*, lo que les haría sensibles únicamente a Sema3F.



### **3. SEMA3A ES UN FACTOR INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO DE AXONES REGENERANTES**

Varios factores guía mantienen una conspicua expresión en la edad adulta, lo que dio a pensar que, además de sus funciones en la guía de células y axones durante el desarrollo, debían intervenir de algún modo en procesos propios del sistema nervioso adulto. De hecho, se ha demostrado la participación de efrinas/eph, Reelina y semaforinas en plasticidad de conexiones neuronales adultas, y por lo tanto, en aprendizaje y cognición (Beffert et al., 2005; Cebria y Newmark, 2005; de Wit y Verhaagen, 2003; Klein, 2004). Reelina también ha sido implicada en varias patologías del SNC adulto, como Alzheimer, esquizofrenia o trastornos bipolares (Beffert et al., 2005; Fatemi et al., 2000; Holtmaat et al., 2002; Klein, 2004; Pappas et al., 2001; Qiu et al., 2005; Tissir y Goffinet, 2003; Weeber et al., 2002).

Uno de los aspectos de la función del sistema nervioso adulto que mayor interés ha despertado es la capacidad de regeneración axonal tras lesión, existente en mayor o menor grado en el SNP adulto y en el SNC postnatal, pero prácticamente nula en el SNC adulto (He y Koprivica, 2004; Sandvig et al., 2004; Silver y Miller, 2004). Recientemente, varios factores guía han sido relacionados con procesos de regeneración axonal en distintas regiones del cerebro y medula espinal en el adulto: efrinas/eph, slits, Netrina, Reelina y semaforinas sufren cambios en su expresión tras la lesión mecánica o química del tejido nervioso (Astic et al., 2002; Bundesen et al., 2003; de Wit y Verhaagen, 2003; Ellezam et al., 2001; Hagino et al., 2003; Madison et al., 2000; Okuyama-Yamamoto et al., 2005; Sandvig et al., 2004). Los factores guía funcionan en la regulación de la regeneración axonal de dos modos:

- contribuyen con su actividad quimiorrepulsiva al ambiente inhibitorio que se genera en la zona lesionada, característico del SNC y una de las causas del fracaso en la regeneración de axones dañados; es el caso de efrinas, slits y semaforinas (de Wit y Verhaagen, 2003; Goldberg et al., 2004; Hagino et al., 2003; Moreau-Fauvarque et al., 2003; Sandvig et al., 2004).
- Por otro lado, la alteración en el patrón y el nivel de expresión de factores guía y de sus receptores específicos permiten a los axones regenerantes ser guiados de nuevo hasta su destino, para restablecer la conexión manteniendo la especificidad y topografía existentes antes de ser lesionada (Koeberle y Bahr, 2004).

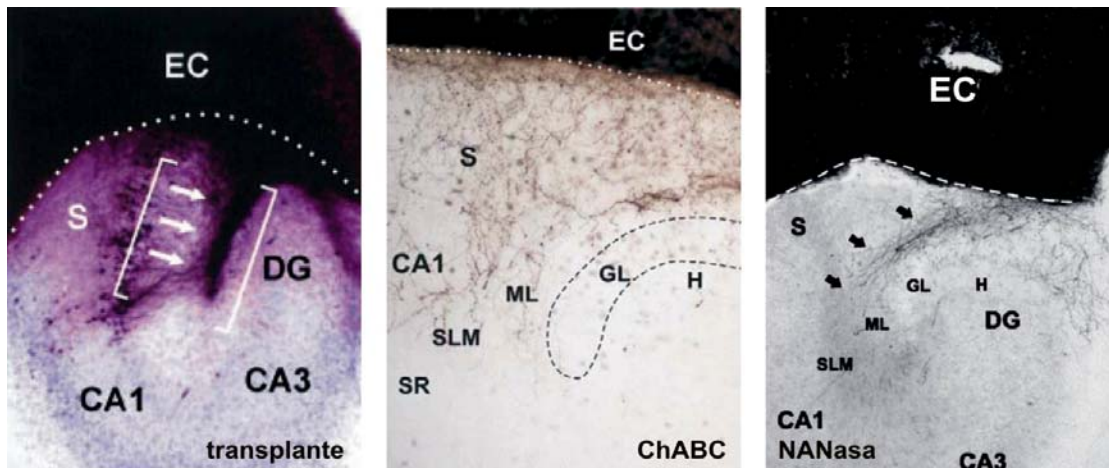
Las evidencias experimentales obtenidas hasta la fecha indican que, tras lesión en el SNC adulto, las semaforinas secretables son sintetizadas por el componente fibroblástico de la cicatriz glial, y actúan mayoritariamente como factores inhibidores del crecimiento axonal, junto con otros elementos también presentes en la zona de lesión como proteoglicanos o inhibidores mielínicos (Sandvig et al., 2004; Silver y Miller, 2004). En concreto, *Sema3A* ha sido implicada en la acción inhibitoria de la cicatriz glial sobre axones olfativos dañados (Kikuchi et al., 2003; Pasterkamp et al., 1998a), sobre axones DRG (Niclou et al., 2003), y en la medula espinal seccionada (De Winter et al., 2002a; Lindholm et al., 2004; Pasterkamp et al., 2001).

Ante tales antecedentes, nosotros quisimos averiguar si *Sema3A* tenía actividad inhibitoria en axones de la vía perforante, una de las principales aferencias del hipocampo adulto (Amaral y Witter, 1995). Para ello utilizamos un modelo *in vitro*: el cultivo organotípico entorrino-hipocampal (del Rio et al., 2002; Li et al., 1994). Se cultivan rebanadas de cerebro de ratones a P0-P1 que contienen corteza entorrinal en continuidad con hipocampo y giro dentado, y tras 7 días de incubación, la aplicación en la corteza entorrinal del trazador anterógrado biocitina marca axones pertenecientes a la vía perforante, que terminan específicamente en el estrato lacunosum-moleculare del hipocampo y en la capa molecular del giro dentado, de manera muy similar al patrón de inervación de la conexión trazada *in vivo* (Amaral y Witter, 1995). La axotomía de la vía perforante en el cultivo organotípico a 7 DIV (días *in vitro*) es seguida de la regeneración de la mayor parte de la conexión lesionada, conservando la especificidad laminar; sin embargo, cuando la axotomía se practica en el cultivo entorrino-hipocampal a partir de la segunda semana *in vitro*, no se observan axones entorrinales invadiendo el hipocampo (del Rio et al., 2002; Li et al., 1994).

Por lo tanto, la vía perforante en el cultivo organotípico tiene plena capacidad de regeneración durante la primera semana *in vitro*, y a partir de entonces dicha capacidad disminuye a medida que transcurre el desarrollo *in vitro*, para acabar siendo nula cuando el cultivo es axotomizado a partir de la segunda semana *in vitro*. En cambio, la conexión recíproca hipocampo-entorrinal (originada en la CA1 y en el subículum) y seccionada al axotomizar la vía perforante, se reestablece en el cultivo organotípico independientemente de la edad en que resulta lesionada (del Rio et al., 2002).

### 3.1. La axotomía in vitro de la vía perforante altera la expresión de *Sema3A* y de su receptor *Np1*

En nuestro intento por saber si *Sema3A* ejerce algún efecto sobre la capacidad regenerativa de axones entorrino-hipocampales lesionados, decidimos conocer en primer lugar el patrón de expresión de *Sema3A* y de su receptor *Np1* en cultivos organotípicos entorrino-hipocampales, y si el nivel de expresión de ambas proteínas cambiaba tras la lesión de la vía perforante. Para ello realizamos hibridaciones in situ sobre cultivos organotípicos sin axotomizar y axotomizados a 15 DIV, usando como sonda oligoribonucleótidos complementarios al RNA mensajero de los genes *Sema3A* y *Np1*.



**Figura 43.** Distintas estrategias para aumentar la regeneración de la vía perforante en cultivos organotípicos entorrino-hipocampales.

**Izquierda:** el transplante del hipocampo de un cultivo organotípico de 15-21 días in vitro (DIV) por el hipocampo de un cultivo organotípico recién obtenido produce el crecimiento masivo de las fibras entorrinales axotomizadas, en un grado comparable al observado en un cultivo organotípico no-axotomizado (adaptado de del Río et al., 2002).

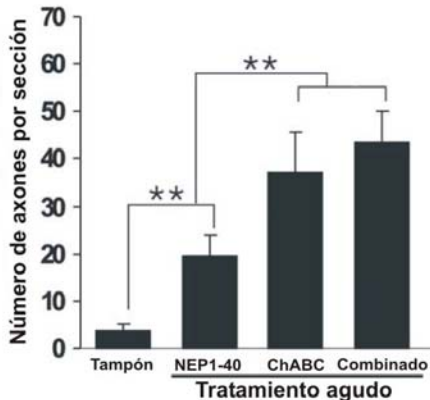
**Centro, derecha:** tratamiento con condroitinasa (ChABC, centro, adaptado de Mingorance et al., 2006) y con neuraminidasa (NANasa, derecha, adaptado de Mingorance et al., 2005) de cultivos organotípicos entorrino-hipocampales axotomizados a 15 DIV. La condroitinasa degrada los proteoglicanos condroitin-sulfato, mientras que la neuraminidasa degrada gangliósidos, que actúan como receptores de MAG. Ambos tratamientos producen un aumento significativo de la regeneración de fibras entorrinales respecto a la situación control, aunque sin alcanzar el nivel de crecimiento axonal obtenido tras el transplante de hipocampo. CA: región CA del hipocampo. DG: giro dentado. EC: corteza entorrinal. GL: capa granular. H: hilus. ML: capa molecular. SLM: estrato lacunosum-moleculare. SR: estrato radiado.

En cultivos sin axotomizar, se detecta una baja aunque apreciable señal de hibridación de *Sema3A* en hipocampo y corteza entorrinal; tras axotomía de la vía perforante, dicha señal aumenta ostensiblemente, especialmente en el hipocampo y en menor medida en la corteza entorrinal, y se mantiene a un nivel elevado a 10 días DPA (días post-axotomía). El nivel de expresión de *Np1* en cultivos sin axotomizar es moderado en el hipocampo, y más atenuado en la corteza entorrinal; tras axotomía se observa un aumento evidente del nivel de expresión únicamente en la corteza entorrinal, que disminuye hasta alcanzar el nivel previo a la lesión a 10 días DPA. Por lo tanto, la lesión in vitro de la vía perforante produce un cambio en la expresión de *Sema3A* y de *Np1* en el cultivo organotípico: el nivel de expresión de *Sema3A* aumenta sobretudo en el hipocampo, mientras que el de *Np1* aumenta principalmente en la corteza entorrinal.

Los resultados obtenidos sobre expresión génica sugiere que, tras axotomía de la vía perforante in vitro, el aumento del nivel de expresión de *Sema3A* en el hipocampo podría producir la inhibición del crecimiento de axones entorrinales lesionados, más sensibles a la acción de *Sema3A* debido al aumento del nivel de expresión de su receptor *Np1*. Dicha hipótesis permitiría explicar, al menos en parte, el fracaso en la regeneración de la proyección entorrino-hipocampal tras su axotomía a partir de la segunda semana in vitro.

### **3.2. La regeneración de axones entorrinales lesionados in vitro aumenta en cultivos organotípicos deficientes en *Sema3A***

Para intentar demostrar que *Sema3A* ejerce un efecto inhibitorio sobre axones de la vía perforante lesionada in vitro, obtuvimos cultivos organotípicos entorrino-hipocampales de ratones pertenecientes a la cepa deficiente en *Sema3A* (Behar et al., 1996) que fueron axotomizados a 15 DIV. Tras el trazado de la vía perforante lesionada mediante la aplicación de biocitina en la corteza entorrinal, se comparó el número de axones entorrinales marcados que invadían el hipocampo, y se comprobó que, en cultivos organotípicos provenientes de animales homocigotos deficientes en *Sema3A*,



**Figura 44.** Gráfico adaptado de Mingorance et al. (2006), que compara estadísticamente tres tratamientos distintos de cultivos organotípicos entorrino-hipocampales axotomizados: usando el péptido NEP1-40 (que bloquea la interacción entre Nogo66 y el receptor NgR), el enzima condroitinasa (ChABC, que degrada los proteoglucanos condroitín-sulfato), o bien una combinación de ambos. El tratamiento combinado con NEP1-40 y condroitinasa no mejora el grado de regeneración obtenido mediante el tratamiento únicamente con condroitinasa.

axones entorrinales regenerantes que en sus hermanos heterocigotos o salvajes, y dicha diferencia era estadísticamente significativa. Por lo tanto, en ausencia de *Sema3A*, el hipocampo se vuelve un poco más permisivo para el crecimiento de axones entorrinales previamente lesionados, lo que implica a *Sema3A* a nivel funcional en el fracaso de la regeneración de la vía perforante in vitro.

El conjunto de datos obtenidos acerca de la función de *Sema3A* en la regeneración de la vía perforante in vitro indica que *Sema3A* actúa como un factor inhibitorio del crecimiento de axones entorrinales tras axotomía, y posiblemente Np1 participa en la transducción de su señal. Sin embargo, en ausencia de *Sema3A*, el grado de regeneración de la conexión entorrino-hipocampal in vitro es parcial, como ocurre tras el bloqueo funcional de Nogo66, MAG y proteoglucanos en cultivos organotípicos entorrino-hipocampales (Mingorance et al., 2005; Mingorance et al., 2006), y dista mucho de la regeneración de axones entorrino-hipocampales obtenida tras el trasplante de un pedazo de cultivo organotípico entorrino-hipocampal joven que contiene células de Cajal-Retzius, a otro cultivo previamente lesionado tras dos semanas in vitro (figura 43) (del Rio et al., 2002). Luego, es posible que la incapacidad de los axones entorrinales de regenerar tras su axotomía a partir de 15 DIV sea debida a la presencia de múltiples factores inhibitorios en el cultivo entorrino-hipocampal.

### **3.3 Optimización de la regeneración de la vía perforante in vitro**

La capacidad regenerativa del axón depende de su programa de crecimiento intrínseco y de la composición del medio extracelular que lo rodea (Snider et al., 2002), por lo que las estrategias para promover el recrecimiento de axones tras lesión se centran en la supresión de las moléculas inhibitorias presentes en la matriz extracelular de la región dañada, en la estimulación del crecimiento del axón maduro lesionado, o en la combinación de ambas (Silver y Miller, 2004).

Así, la inhibición de proteoglucanos condroitín-sulfato y de otras clases mediante degradación enzimática (Groves et al., 2005; Silver y Miller, 2004), y el bloqueo de la inhibición producida por componentes mielínicos como MAG o Nogo (Li et al., 2004; Liebscher et al., 2005; Mingorance et al., 2005; Mingorance et al., 2006; Sicotte et al., 2003; Silver y Miller, 2004) estimula la regeneración de axones centrales y periféricos. El aumento de la capacidad de crecimiento intrínseca de la neurona adulta lesionada se ha conseguido mediante el tratamiento con neurotrofinas (Logan et al., 2006; Silver y Miller, 2004), el aumento de la expresión de integrinas (Condic, 2001), o la alteración de mediadores en las vías de señalización asociadas a inhibidores del crecimiento axonal: el aumento del nivel de cAMP (Cai et al., 1999; Lu et al., 2004; Neumann et al., 2002; Qiu et al., 2002; Rodger et al., 2005) y la inhibición de la GTPasa Rho y de su efector Rock (Bertrand et al., 2005; Ellezam et al., 2002; Fournier et al., 2003; Lehmann et al., 1999; Nishio et al., 2006).

### 3.3.1. Supresión funcional combinada de distintos factores inhibitorios de la regeneración axonal.

Mingorance y colaboradores (Mingorance et al., 2006) aplicaron un tratamiento combinado a cultivos organotípicos entorrino-hipocampales previamente axotomizados, que consistía en la degradación mediante actividad condroitinasa de los proteoglicanos condroitín-sulfato presentes en el cultivo, junto con el bloqueo de Nogo66 mediante un péptido bloqueante de su unión con el receptor NgR. No obtuvieron mejoría significativa en la regeneración de la vía perforante respecto al tratamiento con condroitinasa (figura 44), y fue achacado al hecho de que tanto proteoglicanos como Nogo66 inhiben el crecimiento axonal al inducir en la neurona vías de señalización similares, convergentes en la activación de la quinasa PKC (Hasegawa et al., 2004; Mingorance et al., 2006; Prang et al., 2001; Sivasankaran et al., 2004). Proteoglicanos e inhibidores mielínicos también tienen en común la activación de la GTPasa Rho (Alabed et al., 2006; He y Koprivica, 2004; Sandvig et al., 2004). Los inhibidores mielínicos Nogo66, MAG y OMgp señalizan a través del mismo complejo receptor (formado por NgR, los receptores TNF P75<sup>NTR</sup>/Troy, y Lingo1) (He y Koprivica, 2004; Sandvig et al., 2004), y MAG y mielina producen en el citosol de la neurona un aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico y una disminución del nivel de cAMP sin alterar el nivel de cGMP, mientras que la activación de PKG mediante análogos de cGMP no altera la inhibición producida por mielina en cultivos neuronales (Cai et al., 1999; Hasegawa et al., 2004; Sivasankaran et al., 2004; Song et al., 1998).

Sema3A comparte con proteoglicanos e inhibidores mielínicos la activación de la GTPasa Rho (Negishi et al., 2005a). Sin embargo, a diferencia de MAG, Sema3A pertenece al grupo de factores con actividad quimiotáctica que activan vías de señalización dependientes de cGMP (lo que implica la activación de la quinasa PKG) e independientes de cAMP y Ca<sup>2+</sup> (Song y Poo, 1999). Hay que recordar que factores quimiotácticos pertenecientes al mismo grupo (o sea, compartiendo vías de señalización intracelular) pueden suprimir mutuamente su efecto en el axón al producir la desensibilización del cono de crecimiento por saturación de las vías de señalización comunes, mientras que factores quimiotácticos de distintos grupos (o sea, que inducen vías de señalización independientes) no producen desensibilización mutua (Ming et al., 1999; Ming et al., 2002; Piper et al., 2005).

Por lo tanto, Sema3A difiere parcialmente con proteoglicanos y mielina en las vías de señalización intracelular inducidas en la neurona. Si tenemos en cuenta la hipótesis de que la falta de sinergia en el bloqueo de distintas moléculas inhibitorias de la regeneración axonal es debida a la convergencia de vías de señalización (Mingorance et al., 2006), posiblemente al producirse la saturación de dichas vías, podríamos esperar que la supresión funcional combinada de Sema3A por un lado, e inhibidores mielínicos o proteoglicanos por otro, sí que diera lugar a un aumento de la regeneración de la vía perforante in vitro superior que la conseguida bloqueando los distintos inhibidores por separado.

### 3.3.2. Estimulación de la capacidad intrínseca de regeneración en la neurona.

Ya se ha demostrado la diferencia en la habilidad para regenerar entre neuronas jóvenes (embrionarias y postnatales) y adultas en distintas proyecciones del SNC (Bates y Stelzner, 1993; Hasan et al., 1993; Pasterkamp et al., 1999). Sin embargo, las neuronas adultas son capaces de regenerar ante un ambiente permisivo (Cheng et al., 1996; Schwab y Bartholdi, 1996). Se ha propuesto como estrategia regenerativa el aumento de la capacidad intrínseca de la neurona lesionada alterando el nivel de mediadores de vías de señalización asociadas a colapso axonal o inhibición; por ejemplo, el aumento del nivel de cAMP citosólico in vitro, mediante la presencia de neurotrofinas o agonistas de cAMP, cambia la respuesta de la neurona de inhibición/repulsión a atracción/promoción del crecimiento (Cai et al., 1999; Song y Poo, 1999); y al contrario, la disminución del nivel de cAMP mediante inhibidores de la quinasa PKA o antagonistas de cAMP suprime la capacidad regenerativa de neuronas embrionarias y postnatales (Cai et al., 2001). También la inhibición de la actividad de la GTPasa Rho, directamente relacionada en procesos de colapso e inhibición neuríticas (Negishi et al., 2005a), mejora en cierto grado la regeneración axonal. Teniendo en cuenta que el nivel de cGMP regula el comportamiento neuronal ante Sema3A (Campbell et al., 2001; Castellani et al., 2002; Song et al., 1998), y que tanto Sema3A como proteoglicanos y mielina inducen la activación de la GTPasa Rho (He y Koprivica, 2004; Negishi et al., 2005a), es posible que la activación de vías dependientes de cGMP o bien la inhibición de Rho estimule el crecimiento de axones entorrino-hipocampales lesionados in vitro, por ejemplo, aplicando análogos agonistas de cGMP, activadores de PKG o inhibidores de Rho.