UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

PARTICIPACIÓN DE SÍNDECAN-4 EN LA RETRACCIÓN E INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE PROCESOS NEURONALES INDUCIDOS POR LA UNIÓN DE LA INTEGRINA ASTROCÍTICA $\alpha_V\beta_3$ Y THY-1 NEURONAL

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:

FRANCESCA ESTEFANÍA BURGOS BRAVO

Directores de Tesis:

Dra. Lisette Leyton **Dr. Andrew Quest**

Santiago-Chile

Septiembre 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis presentada por la candidata:

FRANCESCA ESTEFANÍA BURGOS BRAVO

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor de Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día .....de ..... de 2017.

Director de Tesis:

Dra. Lisette Leyton _____

Dr. Andrew Quest _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler (Presidenta) _____

Dra. María Antonieta Valenzuela _____

Dr. Héctor Contreras _____

Dr. Felipe Court _____

DEDICATORIA

Al recuerdo de mi mami Juanita, que siempre estará en mi corazón.

Y al mejor papá, Patricio Burgos.

Los amo con todo el corazón y este logro es para ustedes!

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir expresando mis agradecimientos a mis tutores de tesis, en especial a la Dra. Lisette Leyton, por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mi, por siempre estar disponible a ayudarme, y por todas las enseñanzas entregadas durante este proceso, las cuales siempre destacaré como claves en mi formación como científica.

Gracias a todos los miembros del laboratorio de Comunicaciones Celulares, en especial a mis grandes amigos, Raúl Lagos, Jimena Bravo, Marianne Brenet, Jimena Canales, Jimena Castillo, Yennifer Ávalos, y Areli Cárdenas, ustedes han sido clave en este largo y complejo camino, gracias por sus consejos, por haberme hecho la vida en el laboratorio y las incontables horas de trabajo llenas de frustaciones más faciles de superar, y por sobretodo, gracias por su constante apoyo, amistad y sincero cariño.

También quisiera agradecer de manera especial al Dr. Christian AM Wilson, por su inestimable ayuda y colaboración en esta tesis. Gracias por motivarme a entrar en el fascinante mundo de la biofísica, y la siempre y buena disposición para enseñarme. Mil gracias por todos los consejos, las oportunidades y la motivación a enfrentar nuevos desafíos, y también por la amistad brindada.

Gracias a los miembros de la comisión, por siempre aportar con críticas constructivas, y buenos consejos para mejorar el trabajo.

Igualmente agradecer a mis grandes amigos de la vida, Roberto Bravo, Carolina Quezada, Bernardita Chirino, e Inés Aguirre, ustedes son los que han confiado en mi y motivado a luchar por mis objetivos desde siempre. Gracias por ser incondicionales.

Infinitos agradecimientos a mi amada familia, a mi tía Gloria por su apoyo y siempre buenos deseos, a mi querida mami Juanita por todo su amor y que a pesar de no estar presenten físicamente le dedido este doctorado y espero se sienta orgullosa de mi, al mejor papá que la vida me pudo haber dado, Patricio Burgos, gracias por tu amor incondicional, por enseñarme la responsabilidad, perserverancia, esfuerzo, y dedicación, valores claves que me permitieron superar cada obstáculo y lograr este anhelado logro. A Nicolás, mi mejor amigo y amada pareja, por siempre estar a mi lado apoyándome y animándome a continuar a pesar de las dificultades, por confiar en mi, por tus esfuerzos, tu ilimitado cariño, y principalmente por hacerme feliz!

¡A todos mi eterno agradecimiento!

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se desarrolló gracias al siguiente financiamiento:

- Beca Conicyt de Doctorado Nacional, 2013-2015 (#21130008)
- Beca Conicyt de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para estudiante de doctorado, 2016.
- Beca Conicyt para Pasantía Doctoral, 2015.
- Beca Sociedad Americana de Biología Celular para asistencia a Congreso Internacional, 2015.
- Beca Conicyt de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para estudiante de doctorado, 2015.
- Beca Conicyt para Gastos Operacionales, 2014-2015.
- Beca Conicyt de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para estudiante de doctorado, 2013.
- Proyecto Fondecyt Regular #1110149 (Dra. Lisette Leyton)
- Proyecto Fondecyt Regular #1150744 (Dra. Lisette Leyton)
- Proyecto Fondecyt Regular #1130250 (Dr. Andrew Quest)
- Proyecto Fondecyt Iniciación #11130263 (Dr. Christian Wilson)
- Proyecto Fondecyt-Fondap #15130011 (Dr. Andrew Quest y Dra. Lisette Leyton)
- Proyecto de Investigación Asociativa, Anillo Nemesis #ACT1111 (Dr. Andrew Quest y Dra. Lisette Leyton)
- Iniciativa Científica Mileno BNI #P09-015-F (Dra. Lisette Leyton)

PRODUCTIVIDAD

1. Publicaciones

Burgos-Bravo F., Wilson C.A., Quest A.F., Leyton L. **The astrocyte proteoglycan syndecan-4 participates in Thy-1-dependent inhibition of neurite outgrowth and retraction of existing neuronal processes**. [En preparación, 2017]

Burgos-Bravo F., Figueroa N., Casanova-Morales N., Quest A.F., Wilson C.A., Leyton L. **Single-molecule measurements of the effect of force on Thy-1/αvβ3-integrin interaction using non-purified proteins**. [En revision *Molecular Biology of the Cell*, 2017]

Lagos-Cabré R., Alvarez A., Kong M., Burgos-Bravo F., Cárdenas A., Rojas E., Herrera-Molina R., Rojas F., Schneider P., Herrera-Marschitz M., Quest A.F., Zundert B.V., Leyton L. **αvβ3 Integrin is a controller of astrocyte reactivity.** [En revisión *Journal of Neuroinflammation,* 2017]

Maldonado H., Calderon C., Burgos-Bravo F., Kobler O., Zuschratter W., Ramirez O., Hartel S., Schneider P., Quest A.F., Herrera-Molina R., Leyton L. **Astrocyte-to-neuron communication through integrin-engaged Thy-1/CBP/Csk/Src complex triggers neurite retraction via the RhoA/ROCK pathway.** Biochim. Biophys. Acta. 2017. 1864:243-254.

Alvarez A., Lagos-Cabré R., Kong M., Cardenas M., Burgos-Bravo F., Schneider P., Quest A.F., Leyton L. **Integrin-mediated transactivation of P2X7R via hemichannel-dependent ATP release stimulates astrocyte migration**. Biochim. Biophys. 2016. Acta. 1863:2175-2188.

2. Asistencia a congresos

Burgos-Bravo F., Wilson C.A.M., Quest A.F.G., Leyton L. **Astrocytic syndecan-4 binding to neuronal Thy-1 strengthens retraction and inhibition of neuronal processes triggered by Thy-1/αvβ3 integrin engagement.** XL Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2017. (Presentación Oral)

Burgos-Bravo F., Wilson C.A.M., Figueroa N., Quest A.F.G., Leyton L. **Characterization of Thy-1 and αvβ3 integrin interactions in crude extracts at the single molecule level**

using Optical Tweezers. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2016. (Presentación Oral)

Burgos-Bravo F., Wilson C.A.M., Figueroa N., Quest A.F.G., Leyton L. **Characterization of thermodynamic and kinetic parameters of αvβ3 integrin and syndecan-4 interaction with Thy-1 using a single molecule approach.** XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2015. (Presentación Oral)

Burgos-Bravo F., Quest A.F.G., Leyton L. **The astrocyte proteoglycan syndecan-4 participates in Thy-1-dependent inhibition of neurite outgrowth and retraction of existing neuronal processes.** American Society for Cell Biology (ASCB) Meeting. San Diego, CA, USA. 2015. (Poster)

Burgos-Bravo F., Quest A.F.G., Leyton L. **Primary astrocytes under pro-inflammatory conditions inhibit neurite outgrowth in a αvβ3 integrin- and Syndecan-4-dependent manner.** XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2014. (Poster)

Burgos-Bravo F., Quest A.F.G., Leyton L. **The astrocyte proteoglycan Syndecan-4 participates in Thy-1-dependent inhibition of neurite outgrowth.** XXVII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2013. (Poster)

3. Reconocimientos

Premio mejor presentación oral, Fermelo Biotec. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2016.

Premio Oriana Josseau, Fundación Oriana Josseau. Premio a estudiante femenina del Doctorado en Bioquímica, 2014.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA..... **i**
AGRADECIMIENTOS…… **ii**
FINANCIAMIENTO…… **iii**
PRODUCTIVIDAD…… **iv**
ÍNDICE GENERAL…… **vi**
ÍNDICE FIGURAS……..... **xi**
ÍNDICE TABLAS……..... **xiv**
ABREVIATURAS……..... **xv**
RESUMEN…….. **xviii**
SUMMARY…… **xxi**
INTRODUCCIÓN…….. **1**
1. Regeneración neuronal en el Sistema Nervioso Central 1
2. Ambiente no-permisivo de la regeneración en SNC 2
3. Señalización intracelular inhibitoria de la regeneración 4
4. Thy-1 y su papel en la limitada capacidad regenerativa del SNC 6
5. Ligando de Thy-1 en el SNC 8
6. Comunicación neurona-astrocito mediada por Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$ 10
7. Proteoglicano de heparán sulfato síndecan-4 13
8. Mecanismo de acción de Síndecan-4 15
9. Síndecan-4 y su función cooperativa con las integrinas 16
HIPÓTESIS…… **18**
OBJETIVO GENERAL……. **18**
OBJETIVOS ESPECÍFICOS…….. **18**
MATERIALES Y MÉTODOS…….. **19**
1. Reactivos……..... **19**
1.1. Reactivos Generales 19
1.2. Cultivo Celular 19
1.3. Electroforesis y Western blot 19
1.4. Transfección celular, ensayo de ELISA e Inmunofluorescencia indirecta 20
2. Anticuerpos…… **20**
2.1. Anticuerpos primarios 20
2.2. Anticuerpos secundarios 21
3. Líneas celulares…….. **21**

3.1. Células CAD 21
3.2. Células DITNC1 21
3.3. Células HEK293T 22
4. Cultivos primarios…….. **22**
4.1. Cultivo primario de astrocitos de rata 22
4.2. Cultivo primario de astrocitos tipo-ELA 22
5. Producción proteínas de fusión…….. **23**
5.1. Thy-1-Fc y sus mutantes 23
5.2. αvβ3-Fc y síndecan-4-Fc 23
6. Detección de las proteínas de fusión en sobrenadante celular……... **24**
7. Caracterización de la proteína síndecan-4-Fc……... **24**
7.1. Detección de las cadenas de heparán sulfato 24
7.2. Preparación de la enzima heparitinasa III 25
7.3. Evaluación de la funcionalidad de las cadenas de heparán sulfato 25
8. Caracterización de la proteína αvβ3-Fc……... **25**
8.1. Estimación de la concentración de αvβ3-Fc en el sobrenadante 25
8.2. Depleción de αvβ3-Fc desde el sobrenadante 26
8.3. Purificación de la proteína αvβ3-Fc desde el sobrenadante 26
8.4. Detección de αvβ3-Fc purificada 27
8.5. Evaluación funcionalidad αvβ3-Fc en sobrenadante y purificada 27
9. Diferenciación morfológica de células CAD sobre astrocitos……. **27**
9.1. Pre-tratamiento con heparitinasa III 28
9.2. Pre-tratamiento con heparina 28
9.3. Silenciamiento de síndecan-4 28
9.4. Bloqueo integrina αvβ3 28
10. Diferenciación morfológica de células CAD sobre proteínas de fusión.. **29**
11. Retracción de neuritas de células CAD……. **29**
11.1. Sobrenadante con síndecan-4-Fc 29
11.2. Sobrenadante con síndecan-4-Fc y αvβ3-Fc 29
12. Cuantificación del largo de neuritas de células CAD…… **30**
13. Extracción de proteínas y análisis por Western blot…….. **30**
13.1. Preparación de cultivos celulares para ensayos Western blot 30
13.2. Análisis por Western blot para detectar síndecan-4 31
13.3. Análisis por Western blot para detectar la integrina αvβ3 31
13.4. Análisis por Western blot para detectar síndecan-4-HA 32
14. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta…….. **32**

15. Ensayo de ELISA……. **33**
15.1. Evaluación funcionalidad cadenas de heparán sulfato de síndecan-4-Fc 33
15.2. Evaluación de la funcionalidad de $\alpha v\beta 3$-Fc en sobrenadante y purificada 33
15.3. Detección de la interacción Thy-1/síndecan-4-HA 34
16. Medición niveles de Calcio intracelular $[Ca^{+2}]_i$…… **34**
17. Equipo de Pinzas Ópticas……. **35**
18. Medición en Pinzas Ópticas……..... **36**
19. Cuantificación de las fuerzas……..... **36**
19.1. Estrategia experimental para cuantificar las fuerzas 36
19.2. Medición de las fuerzas en el equipo 37
20. Análisis de los datos de fuerza con modelo Dudko-Hummer-Szabo…… **38**
21. Metodología matemática para filtrar fuerzas de ruptura…….. **39**
21.1. Metodología matemática 39
21.2. Procedimiento para aplicar las ecuaciones 41
21.3. Procedimiento para filtrar las fuerzas de ruptura con programa Matlab 43
22. Análisis estadístico…….…….. **45**
RESULTADOS…….. **46**
OBJETIVO ESPECÍFICO I (O.E.I)…… **46**
O.E. I (1) Participación de síndecan-4 - de la línea celular de astrocitos DITNC1 - en la inhibición del crecimiento de neuritas en células CAD **46**
O.E. I (1.1) Pre-tratamiento de astrocitos DITNC1 con Heparitinasa 46
O.E. I (1.2) Pre-tratamiento de células CAD con Heparina 49
O.E. I (1.3) Silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos DITNC1 51
O.E. I (2) Participación de síndecan-4 - en astrocitos primarios bajo condiciones inflamatorias - en la inhibición del crecimiento de neuritas en células CAD **55**
O.E. I (2.1) Caracterización astrocitos primarios bajo condiciones pro-inflamatorias 55
O.E. I (2.2) Pre-tratamiento astrocitos primarios con Heparitinasa 57
O.E. I (2.3) Silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos primarios 59
O.E. I (3) Participación de síndecan-4 - como proteína de fusión - en la inhibición del crecimiento de neuritas en células CAD **62**
O.E. I (3.1) Caracterización proteína de fusión de síndecan-4 (síndecan-4-Fc) 62
O.E. I (3.2) Extensión de neuritas de células CAD sobre proteínas de fusión 65
O.E. I (4) Participación de síndecan-4 en la retracción de neuritas de células CAD diferenciadas morfológicamente **67**
O.E. I (4.1) Efecto de la proteína de fusión síndecan-4-Fc en la retracción de neuritas de células CAD 67
O.E. I (4.2) Efecto de la proteína de fusión de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc en presencia de 69

síndecan-4-Fc en la retracción de neuritas de células CAD
O.E. I (4.3) Efecto de la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc en presencia de síndecan-4-Fc en la cinética de retracción de neuritas de células CAD 71
OBJETIVO ESPECÍFICO II (O.E.II)…….. **73**
O.E. II (1) Caracterización de la interacción entre Thy-1 y síndecan-4 73
O.E. II (1.1) Interacción Thy-1/síndecan-4 mediante Inmunofluorescencia indirecta 73
O.E. II (1.2) Interacción Thy-1/síndecan-4 mediante ELISA 74
O.E. II (1.3) Interacción Thy-1/síndecan-4 mediante Pinzas Ópticas 76
O.E. II (1.3.1) Diseño experimental en Pinzas Ópticas para estudiar la interacción Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc 77
O.E. II (1.3.2) Frecuencia de adhesión Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc 79
O.E. II (1.3.3) Fuerzas de ruptura y parámetros de unión Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc 81
O.E. II (2) Caracterización de la interacción entre Thy-1 y la integrina αvβ3 83
O.E.II (2.1) Interacción Thy-1/αvβ3 mediante Pinzas Ópticas 83
O.E.II (2.1.1) Diseño experimental en Pinzas Ópticas para estudiar Thy-1-Fc/αvβ3-Fc 83
O.E.II (2.1.2) Estimación de la concentración de la integrina αvβ3-Fc en sobrenadante de células transfectadas 84
O.E.II (2.1.3) Fuerzas de ruptura entre Thy-1-Fc y diferentes diluciones del sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc 86
O.E.II (2.1.4) Frecuencias de adhesión entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc 89
O.E.II (2.1.5) Caracterización de las fuerzas de ruptura resultantes de interacciones no-específicas generadas por Thy-1-Fc 93
O.E.II (2.1.6) Metodología matemática para filtrar las fuerzas de rupturas asociadas a las interacciones no-específicas generadas por Thy-1-Fc 95
O.E.II (2.1.7) Corrección de fuerzas de ruptura y parámetros de unión de la interacción específica entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc no-purificada 95
O.E.II (2.1.8) Purificación de la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc desde el sobrenadante de células transfectadas 98
O.E.II (2.1.9) Funcionalidad de la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc purificada 100
O.E.II (2.1.10) Frecuencia de adhesión y parámetros de unión entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada 101
O.E.II (2.1.11) Corrección fuerzas de ruptura y cálculo de parámetros de unión precisos entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc 104
O.E.II (2.1.12) Comparación entre las interacciones bimoleculares Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc y Thy-1-Fc/ αvβ3-Fc 106

RESULTADOS ANEXOS……..... **108**

(1) Niveles de $[Ca^{+2}]_i$ durante el proceso de retracción de neuritas de células CAD inducido por αvβ3-Fc y síndecan-4-Fc **108**

(2) Extensión de neuritas de células CAD sembradas sobre astrocitos primarios transfectados con integrina β3 **111**

(3) Extensión de neuritas de células CAD sembradas sobre astrocitos primarios provenientes de un modelo animal de la enfermedad neurodegenerativa Esclerosis Lateral Amiotrófica **113**

DISCUSIÓN……..... **116**

1. Síndecan-4 participa en la inhibición del crecimiento de neuritas de células CAD 116

2. Síndecan-4 participa en la retracción de procesos neuronales de células CAD 123

3. Posibles mecanismos de acción de Síndecan-4 127

3.1. Síndecan-4 interacciona con Thy-1 127

3.2. Acción cooperativa entre integrinas y síndecan-4 129

3.3. Síndecan-4 como una molécula "scaffold" de la interacción Thy-1/αvβ3 129

4. Parámetros cinéticos y termodinámicos de las interacciones Thy-1/Síndecan-4 y Thy-1/αvβ3 131

5. Efecto de las fuerzas en las interacciones bimoleculares 134

5.1. Fuerzas a las que se ven expuestas las interacciones Thy-1/αvβ3 y Thy-1/síndecan-4 134

5.2. Las fuerzas aceleran el proceso de disociación de Thy-1/αvβ3 y Thy-1/síndecan-4 135

5.3. Fuerza más probable a la que las interacciones bimoleculares se disocian 138

6. Estudio a nivel de molécula-única con proteínas no-purificadas 140

CONCLUSIONES…… **143**

MODELO PROPUESTO.…… **145**

PROYECCIONES DEL ESTUDIO…… **147**

REFERENCIAS…… **149**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la limitada capacidad regenerativa axonal en SNC producto del ambiente no-permisivo generado por las células gliales **4**

Figura 2. Estructura de Thy-1 **6**

Figura 3. Estructura y biosíntesis de síndecan-4 **14**

Figura 4. Equipo *miniTweezers* **35**

Figura 5. Microcámaras para *miniTweezers* **36**

Figura 6. Representación esquemática componentes ópticos *miniTweezers* **38**

Figura 7. Efecto del pre-tratamiento con heparitinasa III sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD co-cultivadas sobre astrocitos DITNC1 **48**

Figura 8. Efecto del pre-tratamiento con Heparina sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD co-cultivadas sobre astrocitos DITNC1 **50**

Figura 9. Niveles proteicos de síndecan-4,-2,-1 e integrina β3 en astrocitos DITNC1 knock down para síndecan-4 **52**

Figura 10. Efecto del silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos DITNC1 sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD **54**

Figura 11. Niveles proteicos de síndecan-4, integrina β3 y GFAP en astrocitos primarios incubados con citoquinas pro-inflamatorias **56**

Figura 12. Efecto de astrocitos primarios incubados con citoquinas pro-inflamatorias sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD **58**

Figura 13. Niveles proteicos de síndecan-4 en astrocitos primarios knock down para el proteoglicano **59**

Figura 14. Efecto del silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos primarios sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD **61**

Figura 15. Detección y caracterización de la proteína de fusión síndecan-4-Fc. **64**

Figura 16. Efecto de síndecan-4-Fc sobre el crecimiento de neuritas de células CAD **66**

Figura 17. Efecto de síndecan-4-Fc sobre el largo de las neuritas de células CAD diferenciadas morfológicamente **68**

Figura 18. Efecto de la integrina αvβ3-Fc sobre el largo de las neuritas de células CAD en presencia de síndecan-4-Fc **70**

Figura 19. Efecto en el tiempo de la integrina αvβ3-Fc sobre el largo de las neuritas de células CAD en presencia de síndecan-4-Fc **72**

Figura 20. Inmunofluorescencia indirecta de síndecan-4 en astrocitos DITNC1 **74**

Figura 21. ELISA entre Thy-1-Fc y extracto proteico de células transfectadas con síndecan-4-HA **75**

Figura 22. Sistema de pinzas ópticas para estudiar la interacción entre Thy-1 y síndecan-4 **78**

Figura 23. Frecuencia de adhesión entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc a nivel de molécula-única utilizando las pinzas ópticas **80**

Figura 24. Fuerzas de ruptura y parámetros de unión entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc a nivel de molécula-única **82**

Figura 25. Sistema de pinzas ópticas para estudiar la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc **84**

Figura 26. Estimación de la concentración de la proteína de fusión αvβ3-Fc en el sobrenadante de células HEK293T transfectadas **85**

Figura 27. Fuerzas de ruptura para las interacciones específicas y no-específicas de Thy-1-Fc con diferentes diluciones de los sobrenadantes con o sin la integrina αvβ3-Fc **88**

Figura 28. Frecuencias de adhesión entre Thy-1-Fc y el sobrenadante con o sin la integrina αvβ3-Fc utilizando las pinzas ópticas **90**

Figura 29. Depleción de la proteína de fusión αvβ3-Fc del sobrenadante de células HEK293T. **91**

Figura 30. Frecuencias de adhesión entre Thy-1-Fc y diferentes condiciones controles a nivel de molécula-única utilizando las pinzas ópticas **93**

Figura 31. Fuerzas de ruptura para las interacciones no-específicas de Thy-1-Fc **94**

Figura 32. Corrección de los eventos de ruptura no-específicos y cuantificación de los parámetros de unión entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc en el sobrenadante **97**

Figura 33. Purificación de la proteína de fusión αvβ3-Fc desde el sobrenadante de células HEK293T transfectadas **99**

Figura 34. Caracterización de la proteína de fusión αvβ3-Fc purificada **100**

Figura 35. Caracterización de la distribución de fuerzas de ruptura, frecuencia de adhesión y parámetros de unión entre Thy-1-Fc y la proteína de fusión αvβ3-Fc purificada **103**

Figura 36. Fuerzas de ruptura y parámetros de unión corregidos entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc a nivel de molécula-única **105**

Figura 37. Niveles de [Ca+2]i en células CAD diferenciadas morfológicamente tras la adición de las proteínas de fusión αvβ3-Fc o síndecan-4-Fc **110**

Figura 38. Efecto de astrocitos primarios transfectados con la integrina β3-GFP sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD **112**

Figura 39. Efecto de astrocitos tipo-ELA sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD **114**

Figura 40. Modelo tridimensional de Thy-1 humana **128**

Figura 41. "Slip bond" versus "Catch bond". **136**

Figura 42. Modelo propuesto para explicar la participación de Síndecan-4 en los fenómenos neuronales inducidos por la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$. **146**

Figura Suplementaria 1. Determinación del peso molecular de la proteína de fusión síndecan-4-Fc mediante espectrometría de masas **115**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Comparación de los parámetros cinéticos y del estado de transición en ausencia de fuerza, obtenidos para la interacciones entre: Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc en el sobrenadante (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc no-purificado), y Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc purificado) **104**

Tabla II. Comparación de los parámetros cinéticos y del estado de transición en ausencia de fuerza, obtenidos para la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, antes (sin corrección) y después (con corrección) de aplicar la metodología matemática para filtrar las interacciones no-específicas dadas por Thy-1-Fc **106**

Tabla III. Comparación de los parámetros cinéticos y del estado de transición en ausencia de fuerza, obtenidos para la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc) y Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc (Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc) **107**

Tabla IV. Comparación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de disociación obtenidos para las interacciones Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/αvβ3 respecto a valores publicados en la literatura **133**

ABREVIATURAS

°C	: grados Celsius
$\Delta x^{\ddagger}$	: distancia al estado de transición
$\Delta G^{\ddagger}$	: energía libre de activación
τ	: tiempo de vida
v	: factor de escalamiento
AFM	: microscopía de fuerza atómica
ATP	: adenosín trifosfato
BSA	: albúmina de suero bovino
CMFDA	: 5-clorometilfluoresceina diacetato
CPB	: proteína de unión a Csk
CS	: condroitín sulfato
CSPG	: proteoglicano de condroitín sulfato
Csk	: quinasa del C-terminal de Src
CTRL	: control
DAPI	: 4`,6-diamidino-2-fenilindol
DHS	: modelo dudko-hummer-szabo
DNA	: ácido desoxirribonucleico
DMSO	: dimetilsulfóxido
DRG	: neuronas de los ganglios de raíz dorsal
DS	: desviación estándar
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
EFGR	: receptor del factor de crecimiento epidermal
ELA	: esclerosis lateral amiotrófica
ELISA	: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAK	: quinasa de adhesión focal
Fc	: fragmento cristalizable anticuerpos

FGF : factor de crecimiento de fibroblastos

FGFR : receptor del factor de crecimiento de fibroblastos

GAP-43 : proteína asociada al crecimiento - 43

GAG : glicosaminoglicano

GFAP : proteína acídica fibrilar glial

GFP : proteína fluorescente verde

GPI : glicosil-fosfatidilinositol

HA : hemaglutinina del virus influenza humana

Hasa III : heparitinasa III

HBD : dominio de unión a heparina

HB-GAM : molécula asociada al crecimiento de unión a heparina

Hep : heparina

HEPES : ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico

HRP : peroxidasa de rábano

HS : heparan sulfato

HSPG : proteoglicano de heparan sulfato

ICAM-1 : molécula de adhesión interacelular-1

IFI : inmunofluorescencia indirecta

IgG : inmunoglobulina G

IL-1β : interleuquina 1 beta

IL-6 : interleuquina 6

kDa : kilodalton

k_{off} : constante cinética de disociación

k_{on} : constante cinética de asociación

MAG : glicoproteína asociada a mielina

MLC : cadena liviana de la miosina

mRNA : ácido ribonucleico mensajero

NgR1 : nogo-66 receptor 1

NT : no transfectado

OMgp : glicoproteína de la mielina en oligodendrocitos

OT : pinzas ópticas

PAGE : electroforesis en geles de poliacrilamida

PBS : tampón fosfato salino

PKC : proteína quinasa C

pN : piconewton

PTPsigma : proteína tirosina fosfatasa sigma

ROCK : quinasa de Rho

SDC4 : síndecan-4

SDS : dodecil sulfato de sodio

SEM : error estándar de la media

SFB : suero fetal bovino

siRNA : ácido ribonucleico pequeño de interferencia

SNC : sistema nervioso central

SNP : sistema nervioso periférico

SPR : resonancia de plasmones superficiales

TBS : tampón tris salino

TMB : 3,3´,5,5´-tetrametilbezidina

TNF-α : factor de necrosis tumoral alfa

TRAIL-R2 : receptor del ligando soluble inductor de apoptosis TRAIL

YPF : proteína fluorescente amarilla

RESUMEN

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del sistema nervioso central (SNC) y en mamíferos adultos, representan un impedimento importante para la regeneración axonal después de una lesión. Este efecto depende de la adquisición de un fenotipo reactivo en respuesta al microambiente pro-inflamatorio generado después de la lesión. Los astrocitos reactivos muestran hipertrofia celular, sobreexpresan moléculas que inhiben la regeneración axonal y migran al sitio de la lesión para formar la cicatriz glial, una estructura que representa una barrera física adicional a la regeneración neuronal.

Una de las proteínas sobreexpresadas en los astrocitos reactivos es la integrina $\alpha_v\beta_3$. Nuestro laboratorio fue pionero en identificar que la integrina $\alpha_v\beta_3$ de astrocitos es un ligando para Thy-1, una glicoproteína abundantemente expresada en neuronas del SNC adulto, históricamente implicada en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales. En este contexto, a través de ensayos *in vitro*, nuestro grupo describió que la interacción Thy-1/integrina $\alpha_v\beta_3$ media una comunicación bidireccional entre neuronas y astrocitos, que inducen efectos en ambas células. En los astrocitos, esta interacción promueve la adhesión y migración celular; mientras que en las neuronas, induce la retracción de procesos neuronales ya establecidos y la inhibición del crecimiento de nuevos procesos (axón y dendritas). Encontramos que la inhibición del crecimiento de neuritas solo se previene parcialmente al bloquear la integrina astrocítica, sugiriendo la participación de otro ligando de astrocitos en la respuesta neuronal dependiente de Thy-1. Evidencias indican que el proteoglicano de heparán sulfato síndecan-4 actúa en conjunto con algunas integrinas formando un complejo trimolecular con Thy-1 para promover la adhesión de células de cáncer al endotelio vascular. Por lo tanto, considerando que i) los efectos inducidos por la interacción Thy-1/integrina $\alpha_v\beta_3$ en los astrocitos también dependen de síndecan-4, expresado en astrocitos; ii) Thy-1 presenta un dominio de unión a heparina (HBD) que reconoce proteoglicanos de heparán sulfato como síndecan-4; iii) síndecan-4 está regulado positivamente en astrocitos reactivos; iv) síndecan-4, como co-receptor, amplifica la afinidad de unión ligando-receptor primario; y v) síndecan-4 promueve varios eventos celulares en cooperación con integrinas, se planteó la siguiente hipótesis: *Síndecan-4 actúa como co-ligando de Thy-1 al interaccionar directamente con la glicoproteína neuronal, interacción que favorece y potencia los eventos de inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales inducidos por la asociación entre Thy-1 y la integrina $\alpha_v\beta_3$.* Para ensayar esta hipótesis propusimos: i) Determinar sí

síndecan-4 está implicado en la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales mediada por la interacción $\alpha_v\beta_3$ integrina/Thy-1 en la línea celular tipo-neuronal CAD; y ii) Estudiar el mecanismo por el cual síndecan-4 favorece la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales en células CAD, mediado por la interacción Thy-1/integrina $\alpha_v\beta_3$.

Para evaluar sí síndecan-4 participa en la inhibición del crecimiento de neuritas, se sembró células CAD sobre una monocapa de astrocitos, utilizando la línea celular DITNC1, o astrocitos primarios tratados en condiciones pro-inflamatorias. La extensión neuronal (diferenciación morfológica) fue inducida por la deprivación de suero. En este tipo de ensayos, se utilizó tratamientos con heparina/heparitinasa o de silenciamiento para bloquear al proteoglicano. También se estudió la participación de síndecan-4 en la retracción de neuritas. Para esto, se indujo la extensión de neuritas en células CAD sembradas sobre una placa de cultivo, y se les agregó una combinación de proteínas de fusión de las proteínas de astrocitos: $\alpha_v\beta_3$-Fc y síndecan-4-Fc. Por último, para estudiar la interacción directa entre Thy-1 y síndecan-4 a nivel de molécula-única, se utilizó la espectroscopía de fuerza molecular; específicamente las pinzas ópticas, y las proteínas de fusión síndecan-4-Fc y Thy-1-Fc.

Los resultados indican que los astrocitos inhiben el crecimiento de neuritas en células CAD, y que esta inhibición se reduce cuando los astrocitos son pre-tratados con heparitinasa o cuando se silencian los niveles de síndecan-4. Además, la disminución de la función de síndecan-4 se potencia cuando adicionalmente se bloquea la integrina β_3. Por otra parte, la retracción de las neuritas promovida por la integrina $\alpha_v\beta_3$-Fc es más rápida cuando se agrega junto con síndecan-4-Fc; mientras que síndecan-4-Fc, en ausencia de $\alpha_v\beta_3$-Fc, no muestra ningún efecto sobre las neuritas. Usando pinzas ópticas, se obtuvo evidencia de la interacción directa entre Thy-1 y síndecan-4, interacción que depende del HBD presente en Thy-1. Adicionalmente, se caracterizó los parámetros cinéticos y del estado de transición correspondiente al proceso de disociación entre ambas moléculas. Es importante destacar que se implementó una nueva metodología matemática para caracterizar parámetros de interacción entre dos proteínas, cuando una de ellas no se encuentra purificada. Dichos parámetros fueron luego verificados con proteínas purificadas. Por último, utilizando las pinzas ópticas se identificó que ambas interacciones, Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/$\alpha_v\beta_3$, se comportan como enlaces del tipo *slip bond*, donde una fuerza aplicada acelera exponencialmente su constante de disociación.

Estos hallazgos indican que la interacción combinada de ambas proteínas astrocíticas; integrina $\alpha_v\beta_3$ y síndecan-4, con la glicoproteína neuronal Thy-1, refuerza la inhibición del crecimiento de neuritas y acelera la retracción de procesos neuronales existentes, produciendo una inhibición más eficaz de la extensión de las neuritas, y una retracción más rápida de los procesos neuronales. Además, los parámetros cinéticos calculados indican que la interacción de Thy-1 con la integrina es más estable, y posiblemente, de mayor afinidad, que la unión entre Thy-1 y el proteoglicano, apoyando un posible papel de síndecan-4 como co-ligando de Thy-1.

En conclusión, los resultados de esta tesis sugieren que síndecan-4 podría ser identificado como un componente de la superficie celular de astrocitos que actúa como ligando de Thy-1 y contribuye al ambiente no-permisivo para la regeneración axonal inducida por astrocitos reactivos. El efecto de síndecan-4 sobre las neuronas depende de la co-expresión de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en astrocitos, y de su interacción con Thy-1. Por lo tanto, la interacción de ambos ligandos con Thy-1, estaría cumpliendo un papel clave en la respuesta bidireccional entre neuronas y astrocitos después de una lesión al SNC. Novedosamente, al definir cómo la fuerza aplicada a una interacción regula las asociaciones entre Thy-1/integrina $\alpha_v\beta_3$ y Thy-1/síndecan-4, este trabajo proporciona un paso inicial hacia la comprensión de cómo la comunicación neurona-astrocito responde a señales mecánicas durante eventos patológicos producidos en el cerebro.

SUMMARY

Astrocytes are the most abundant glial cells in the central nervous system (CNS), and in adult mammals, they represent a major impediment to axon regeneration after a lesion. This obstacle to regeneration depends on the acquisition of a reactive phenotype in response to the pro-inflammatory microenvironment generated post-injury. Reactive astrocytes show hypertrophy, overexpress molecules that inhibit axonal regeneration, and migrate to the lesion site to form the glial scar, a structure that represents an additional physical barrier to neuronal regeneration.

One of the proteins that is upregulated in reactive astrocytes is the $\alpha_v\beta_3$ integrin. Our group was the first to report that astrocytic $\alpha_v\beta_3$ integrin is a ligand for Thy-1, a glycoprotein abundantly expressed in neurons of the adult CNS, historically involved in the inhibition of neurite outgrowth. In this context, using *in vitro* assays, our group described that the Thy-1/$\alpha_v\beta_3$ integrin interaction mediates bidirectional neuron-to-astrocyte communication, promoting effects in both cells. In astrocytes, this interaction promotes cell adhesion and migration; while in neurons, it induces the retraction of already established neuronal processes and inhibits the growth of new processes (axons and neurites). Interestingly, we found that the inhibition of neurite outgrowth was only partially reduced by blocking $\alpha_v\beta_3$-integrin in astrocytes, suggesting the participation of another astrocytic ligand in Thy-1-dependent neuronal response. Available evidence suggests that the heparan sulfate proteoglycan syndecan-4 together with other integrins and Thy-1 forms a trimolecular complex that promotes the adhesion of cancer cells to the vascular endothelium. Therefore, considering that i) astrocytic effects induced by Thy-1/$\alpha_v\beta_3$ integrin interaction also depend on syndecan-4 expressed in astrocytes; ii) Thy-1 possesses a heparin-binding domain (HBD), which recognizes heparan sulfate proteoglycans such as syndecan-4; iii) syndecan-4 is upregulated in reactive astrocytes; iv) syndecan-4 acts as a co-receptor to amplify primary ligand-receptor binding affinity; and v) syndecan-4 promotes several cellular events in cooperation with integrins, the following hypothesis was proposed: *Syndecan-4 acts as a Thy-1 co-ligand by directly interacting with the neuronal glycoprotein to favor and strengthen the inhibition of neurite outgrowth and retraction of neuronal processes induced by the association between Thy-1 and the $\alpha_v\beta_3$ integrin.* To evaluate this hypothesis, we proposed to: i) Determine if syndecan-4 regulates the inhibition of neurite outgrowth and retraction of neuronal processes mediated by the $\alpha v\beta_3$ integrin/Thy-1 interaction in the CAD neuron-like cell line; and ii) Study the mechanisms by

which syndecan-4 promotes Thy-1/$\alpha_v\beta_3$ induced inhibition of neurite outgrowth and retraction of neuronal processes in CAD cells.

To evaluate if syndecan-4 participates in the inhibition of neurite outgrowth, CAD cells were seeded over an astrocyte monolayer, using either the cell line DITNC1 or primary astrocytes treated with pro-inflammatory TNF-α. Neurite extension (morphological differentiation) was induced by serum deprivation. In these assays, treatments with heparin/heparitinase and syndecan-4 silencing were performed to block the proteoglycan. The effect of syndecan-4 on neurite retraction was also assessed. To this end, neuron extension was induced in CAD cells seeded in culture plates and these cells were then incubated with a combination of the fusion proteins $\alpha_v\beta_3$-Fc and syndecan-4-Fc. To study the direct interaction between Thy-1 and syndecan-4 at the single-molecule level, molecular force spectroscopy, specifically optical tweezers, and the fusion proteins syndecan-4-Fc and Thy-1-Fc were used.

Our results indicate that astrocytes inhibit neurite outgrowth in CAD cells, and that this inhibition is reduced when astrocytes are pre-treated with heparitinase, or when syndecan-4 levels are silenced. Furthermore, the effects of decreasing syndecan-4 function are potentiated when, additionally, β_3 integrin is blocked. We also found that $\alpha_v\beta_3$ integrin-promoted neurite retraction is faster when added in conjunction with syndecan-4-Fc, while syndecan-4-Fc, in the absence of $\alpha_v\beta_3$-Fc had no effect on neurites. We also found using optical tweezers evidence for the existence of direct binding between syndecan-4 and Thy-1 in an interaction that depends on the HBD present in Thy-1. Additionally, we characterized the kinetics and transition state parameters corresponding to the dissociation process between both molecules. It is important to note that we implemented a novel mathematical strategy to characterize the binding parameters of the interaction between two proteins, when one of them has not available as a purified protein. Such parameters were then verified with purified proteins. Finally, optical tweezers allowed us to determine that both Thy-1/syndecan-4 and Thy-1/$\alpha_v\beta_3$ interactions behave as *slip bonds*, where an applied force exponentially accelerates the dissociation constant.

These findings indicate that the combined interaction of both astrocytic proteins, $\alpha_v\beta_3$ integrin and syndecan-4, with neuronal Thy-1 augments the inhibition of neurite outgrowth and accelerates the retraction of existing neuronal processes, resulting in a more effective inhibition of neurite extension and faster retraction of neuronal processes. Furthermore, the calculated kinetic parameters indicate that the interaction between Thy-1

and the integrin is more stable, and possibly, of higher affinity, than the interaction between Thy-1 and the proteoglycan, suggesting that syndecan-4 acts as a Thy-1 co-ligand.

In conclusion, the results obtained in this thesis identify syndecan-4 as an astrocytic cell surface component that functions as a Thy-1 ligand, and contributes to the non-permissive environment in the brain for axon regeneration induced by reactive astrocytes. The effect of syndecan-4 on neurons depends on the co-expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin in astrocytes, and its interaction with Thy-1. Therefore, the interaction of both ligands with Thy-1 plays a key role in the bidirectional responses between neurons and astrocytes after CNS injury. Finally, by defining how an applied force regulates Thy-1/$\alpha_v\beta_3$ integrin and Thy-1/syndecan-4 interactions, this work provides an initial step towards understanding how neuron-astrocyte communication responds to mechanical cues during pathological events produced in the brain.

INTRODUCCIÓN

1. Regeneración neuronal en el Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados superiores tiene la habilidad para adaptarse y responder a varios estímulos que van desde eventos fisiológicos como el aprendizaje y la memoria, hasta insultos patológicos como lesiones traumáticas, enfermedades neurodegenerativas o infartos cerebro-vasculares. Respecto a la respuesta del SNC frente a eventos patológicos, se ha reportado ampliamente que la capacidad regenerativa de las neuronas en el sitio de la lesión es extremadamente limitada (Giger *y cols.*, 2010; Yiu y He, 2006). Con excepción de las proyecciones sensoriales olfativas dentro del bulbo olfativo, las cuales logran regenerar y restablecer las conexiones sinápticas luego de una lesión (Graziadei *y cols.*, 1980), se ha descrito que los axones con tractos mielinizados largos, al ser expuestos a un daño, experimentan periodos transitorios de remodelación estructural en forma de brotes locales que intentan regenerar y proporcionar una recuperación funcional; sin embargo, estos intentos se detienen rápidamente en el SNC, observando la formación de una estructura tipo-globular en el extremo del axón lesionado denominada “cono de crecimiento distrófico”, que finalmente no regenera más allá del sitio de la lesión (**Figura 1**) (Edgerton *y cols.*, 2004; Li y Raisman, 1995). Esta respuesta se contrasta a lo observado en el SNC embrionario de mamíferos y el Sistema Nervioso Periférico (SNP) de mamíferos adultos, donde existe una regeneración axonal a larga-distancia, y recuperación de la funcionalidad (David y Aguayo, 1981; Davies *y cols.*, 1997; Yiu y He, 2006). Dependiendo de la severidad del daño, las lesiones al SNC y la limitada capacidad regenerativa de las neuronas pueden conllevar a un déficit permanente producto de la pérdida de conexiones sinápticas; por ejemplo, una lesión en la médula espinal puede conducir a una disfuncionalidad neuronal severa caracterizada por la parálisis muscular en las zonas inferiores al sitio de la lesión (Giger *y cols.*, 2010).

2. Ambiente no-permisivo de la regeneración en SNC

Estudios realizados por Aguayo y colaboradores permitieron identificar que algunas poblaciones neuronales del SNC adulto poseen la capacidad intrínseca para extender sus axones luego de un daño, específicamente cuando son provistas de un ambiente favorable del crecimiento (David y Aguayo, 1981; Schwab y Bartholdi, 1996). Es así como en presencia de un injerto de nervio periférico, se observó que las neuronas del SNC de un ratón adulto pueden extender sus axones varios centímetros luego de sufrir una lesión (David y Aguayo, 1981). Otros estudios demostraron que neuronas dañadas pueden crecer en injertos de nervio ciático (SNP) y no así en injertos de nervio óptico (SNC) (Schwab y Thoenen, 1985). En apoyo a lo anterior, se observó que en neuronas de los ganglios de raíz dorsal ("dorsal root ganglia", DRG), que poseen axones tanto en el SNC como el SNP, sólo los procesos periféricos pueden regenerar (Yiu y He, 2006). Estos antecedentes demostraron que el ambiente es un determinante crítico para la regeneración neuronal, e identificaron que el ambiente encontrado en el SNP posee una capacidad favorable en la promoción del crecimiento axonal luego de un daño, sugiriendo por tanto que la principal barrera para la regeneración axonal en el SNC está dada por el ambiente no-permisivo presente alrededor de las neuronas. Estudios posteriores indicaron que este ambiente inhibitorio es generado por las células gliales del SNC, como oligodendrocitos y astrocitos, que no se encuentran en el SNP (Kawano *y cols.*, 2012; Morgenstern *y cols.*, 2002; Sofroniew, 2009; Xie y Zheng, 2008).

En este sentido, los eventos en respuesta a un daño involucran una participación de las células gliales en general y la de los astrocitos en particular. Durante las primeras fases de la lesión, la mielina producida por los oligodendrocitos y que normalmente envuelve las fibras nerviosas, expone a los axones dañados moléculas inhibidoras que contribuyen a la baja capacidad regenerativa de los procesos neuronales lesionados (Filbin, 2003). Las moléculas inhibitorias incluyen a las derivadas de la mielina, como la glicoproteína asociada a mielina (MAG) y la glicoproteína de la mielina en oligodendrocitos (OMgp), y a Nogo, inhibidor del crecimiento de neuritas presente en la membrana del oligodendrocito (Chen *y cols.*, 2000; Fournier *y cols.*, 2001; McKerracher *y cols.*, 1994; Xie y Zheng, 2008). Adicionalmente, luego del daño, se produce la activación de los astrocitos a un estado reactivo a través de un proceso denominado astrogliosis (**Figura 1**) (Sofroniew, 2009), el cual está modulado por la acción de moléculas derivadas de la extravasación plasmática, tales como ATP, endotelina-1, y citoquinas pro-

inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF-α), interleuquina-1β (IL-1β), e interleuquina-6 (IL-6) (Buffo *y cols.*, 2010; Davalos *y cols.*, 2005; Xie y Zheng, 2008). Durante este proceso, los astrocitos pasan de un estado quiescente a uno activado, caracterizado por la hipertrofia celular, adquisición de una forma ameboide tipo-fibroblasto, un aumento en la expresión de proteínas de filamentos intermedios como la proteína fibrilar acídica glial (GFAP), vimentina y nestina (Pekny y Nilsson, 2005). Bajo daños severos, la astrogliosis se caracteriza por la migración de los astrocitos hacia el sitio de la lesión, y una pronunciada hipertrofia del cuerpo celular y procesos, así como también un incremento en la proliferación celular, que resulta en una considerable pérdida de dominios de astrocitos individuales y favorece la superposición de procesos provenientes de varios astrocitos, para constituir la cicatriz glial, la cual permite aislar física y químicamente el tejido dañado, impidiendo la propagación de moléculas dañinas hacia las células nerviosas adyacentes (Buffo *y cols.*, 2010; McGraw *y cols.*, 2001; Sofroniew, 2009). Sin embargo, aun cuando la astrogliosis es una respuesta fisiológica normal frente a un daño que permite proteger a las células del SNC, como por ejemplo a través de la absorción de glutamato excitotóxico, producción de glutatión para la protección contra el estrés oxidativo, degradación de pépticos β-amiloides, reconstrucción de la barrera hemato-encefálica, limitación del área dañada y foco de inflamación del resto del tejido, también tiene efectos perjudiciales en la sobrevida neuronal y regeneración axonal (Bush *y cols.*, 1999; Koistinaho *y cols.*, 2004; Rothstein *y cols.*, 1996; Sofroniew y Vinters, 2010; Swanson *y cols.*, 2004). Se ha descrito que la formación de la cicatriz glial, más allá de constituir una barrera física para la regeneración, está acompañada de un aumento en la secreción de proteoglicanos de condroitín sulfato (CSPGs) por los astrocitos, que en conjunto a las moléculas inhibitorias-asociadas a la mielina, presentan un ambiente hostil y no-permisivo para la regeneración axonal (Silver y Miller, 2004).

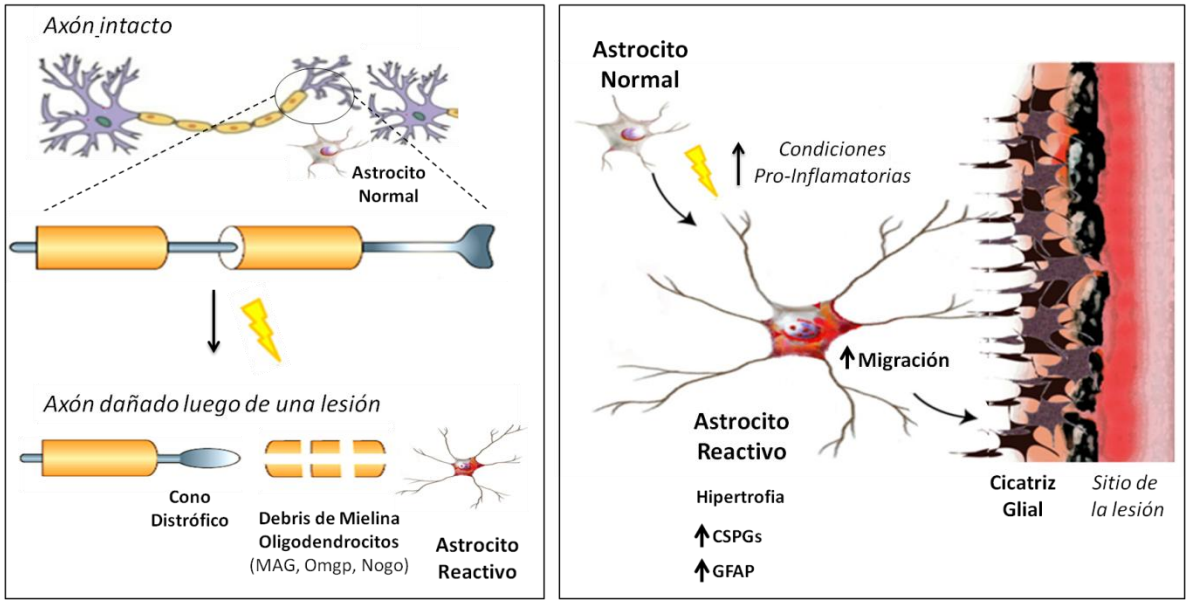


Figura 1. Representación esquemática de la limitada capacidad regenerativa axonal en SNC producto del ambiente no-permisivo generado por las células gliales. (Izquierda) Un daño al SNC conduce a la axotomía de las neuronas, formación de un cono distrófico de crecimiento incapaz de regenerar y restablecer la conexión sináptica producto del ambiente no-permisivo generado por las moléculas inhibitorias derivadas de los "debris" de mielina y los astrocitos reactivos. **(Derecha)** Luego de una lesión, las condiciones pro-inflamatorias inducen en los astrocitos la adquisición de un fenotipo reactivo caracterizado por la hipertrofia celular, sobre-expresión de GFAP y CSPGs, migración hacia el sitio de la lesión, superposición de los procesos y formación de la cicatriz glial. Imágenes adaptadas de (Vartak-Sharma y Ghorpade, 2012; Yiu y He, 2006).

3. Señalización intracelular inhibitoria de la regeneración

Las moléculas inhibitorias del crecimiento axonal ejercen su actividad inhibitoria mediante la interacción con sus respectivos receptores neuronales, en el caso de Nogo, OMgp y MAG corresponde a Nogo-66 receptor 1 (NgR1) (Domeniconi *y cols.*, 2005; Liu *y cols.*, 2006). También se ha descrito que estas moléculas pueden interaccionar con un segundo receptor inhibidor del crecimiento axonal denominado PirB ("paired immunoglobulin-like receptor B") (Atwal *y cols.*, 2008). Mientras que para los CSPGs sus receptores axonales corresponden a dos miembros de la subfamilia de fosfatasas relacionadas a los antígenos comunes de leucocitos (LAR): la proteína tirosina fosfatasa sigma (PTPsigma) y LAR (Fisher *y cols.*, 2011; Shen *y cols.*, 2009).

La señalización intracelular involucrada en el colapso del cono de crecimiento axonal y que resulta en la inhibición de la regeneración, está regulando principalmente al citoesqueleto de actina, a través de la activación de la GTPasa pequeña RhoA (Gallo,

2006; Govek *y cols.*, 2005; Kranenburg *y cols.*, 1997; Maldonado *y cols.*, 2017). Esto conduce a la activación de la quinasa de Rho (ROCK), que activa a LIMK, permitiendo la fosforilación e inhibición de Cofilina, proteína que corta los filamentos de actina y que ha sido asociada a la retracción de neuritas y colapso del cono de crecimiento axonal (Hsieh *y cols.*, 2006; Maldonado *y cols.*, 2017; Montani *y cols.*, 2009). Además, ROCK puede regular la contracción mediada por miosina II al aumentar la fosforilación de la cadena liviana de la miosina (MLC) en S19 y modular negativamente la fosfatasa que desfosforila en S19 a MLC, ambos eventos favorecen la contracción del citoesqueleto de actina (Gallo, 2004; Koh, 2006).

Adicionalmente, se ha descrito que la inhibición del crecimiento de procesos neuronales inducido por las moléculas inhibitorias-asociadas a la mielina y CSPGs está precedida de un incremento rápido y transitorio en la concentración de Ca^{+2} intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) (Bandtlow *y cols.*, 1993; Snow *y cols.*, 1994; Wong *y cols.*, 2002; Yiu y He, 2006). Estudios han evidenciado la participación de la proteína quinasa C (PKC) y el receptor del factor de crecimiento epidermal (EFGR) en la señalización inducida por Nogo, MAG, OMpg y CSPGs, siendo ambas proteínas relacionadas directamente con los cambios en los niveles de $[Ca^{+2}]_i$. La inhibición de la regeneración axonal en fibras de nervio óptico, inducen la fosforilación y aumento en la actividad quinasa del receptor EFGR, proceso dependiente de incremento de calcio intracelular (Koprivica *y cols.*, 2005). En células de neuroblastoma humano, se estableció que el aumento en la actividad de PKC, mediada por la activación de la proteasa Calpaina-dependiente de calcio, modula negativamente el crecimiento de procesos neuríticos (Shea *y cols.*, 1995). Por otra parte, estudios han establecido que la activación de la fosfatasa Calcineurina producto del incremento de la $[Ca^{+2}]_i$ aumentaría el estado desfosforilado de la proteína asociada al crecimiento-43 (GAP-43), desestabilizando los filamentos de actina e inhibiendo la elongación de los procesos neuronales (Lautermilch y Spitzer, 2000).

4. Thy-1 y su papel en la limitada capacidad regenerativa del SNC

Antecedentes en la literatura han establecido que en las neuronas del SNC existen otras moléculas implicadas en la modulación del crecimiento axonal, entre estas Thy-1 (CD90), glicoproteína pequeña de 28 kDa altamente glicosilada, anclada a la superficie celular por un tallo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (**Figura 2**), y perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas (Homans *y cols.*, 1988).

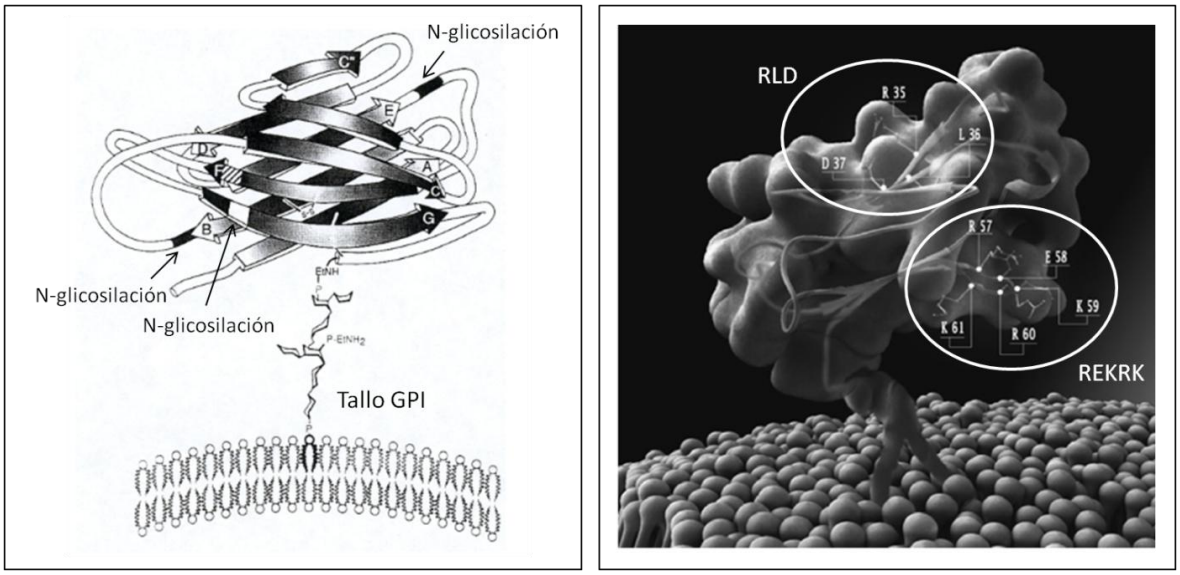


Figura 2. Estructura de Thy-1. (Izquierda) Modelo basado en la región variable de las inmunoglobulinas y la estructura del grupo GPI de Thy-1 anclado a la membrana extracelular externa. La estructura de Thy-1 está compuesta por hebras de hojas β plegadas. Las flechas negras indican los residuos de asparagina (23, 75, y 99), a los cuales se unen cadenas de carbohidratos (*N*-glicosilaciones). En ratón y rata son tres glicosilaciones, mientras que en humanos son solo dos modificaciones (residuos 42 y 119). **(Derecha)** Modelo tridimensional de Thy-1 obtenido de la secuencia primaria de la glicoproteína de ratón. Se muestran los aminoácidos que forman el motivo RLD, que media la interacción con la integrina αvβ3, y el dominio de unión a heparina, REKRK. Imagen adaptada de (Herrera-Molina *y cols.*, 2013).

Esta proteína es expresada en varios tipos celulares, entre estos fibroblastos, timocitos, queratinocitos, células endoteliales activadas, hematopoyéticas, ováricas y neuronas (Barker y Hagood, 2009; Chen *y cols.*, 2005; Haeryfar y Hoskin, 2004; Saalbach *y cols.*, 2000). Particularmente en el SNC, Thy-1 es una de las proteínas más abundantes de la superficie neuronal, se estima que Thy-1 representa entre un 2.5% y 7.5% del del contenido proteico total de la superficie neuronal de un cerebro adulto de rata (Beech *y cols.*, 1983). También se ha estimado que existen aproximadamente 500 moléculas de

Thy-1 por micrón cuadrado en la superficie axonal de las neuronas del ganglio retinal (Beech *y cols.*, 1983). Adicionalmente, estudios indicaron que Thy-1 en el SNC se expresa en neuronas de la corteza, núcleo caudado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, hipocampo, cerebelo, nervio óptico, retina y médula espinal (Morris, 1985; Seki *y cols.*, 2002).

La expresión de Thy-1 es un evento postnatal, dado que sus niveles en el SNC dependen del estado de maduración de las neuronas. Se ha determinado que sus niveles son bajos en etapas del desarrollo en comparación a aquellos encontrados en etapa adulta (Barclay, 1979). Por ejemplo, en el cerebro de ratón, rata, perro, y pollo, los niveles de Thy-1 aumentan drásticamente durante las primeras semanas postnatal (Morris, 1985; Reif y Allen, 1964). En las neuronas del DRG, se ha evidenciado que en etapas tempranas del desarrollo presentan bajos niveles de Thy-1; sin embargo, éstos aumentan a medida que las neuronas maduran (Chen *y cols.*, 2005). Adicionalmente, se ha descrito que la expresión de Thy-1 en neuronas es finamente regulada durante el desarrollo del SNC. Su aparición y última distribución es controlada con el objetivo de excluirla de regiones de crecimiento axonal, específicamente durante el desarrollo, Thy-1 aparece inicialmente en la membrana del cuerpo celular y dendritas de las neuronas, pero es excluida de los axones hasta que se completa la fase de crecimiento axonal (Morris *y cols.*, 1992; Xue *y cols.*, 1990). Estos antecedentes han sugerido que Thy-1 participaría en la estabilización de redes neuronales, inhibiendo el crecimiento de los procesos neuronales.

La función de Thy-1 como inhibidor de la extensión de procesos neuronales ha sido evidenciada a través de estudios *in vitro*. Por ejemplo, se determinó que la línea celular de origen neuronal PC12, derivada de feocromocitoma de rata, al ser expuesta a tratamientos que eliminan a Thy-1 enzimáticamente desde la superficie celular (tratamieno con fosfolipasa C específica para fosfatidil inositol) o mediante el uso de anticuerpos que bloquean a la glicoproteína, el crecimiento de las neuritas se ve favorecido (Greene y Tischler, 1976; Mahanthappa y Patterson, 1992). Además, el tamaño y número de neuritas es mayor en células PC12 deficientes de Thy-1 en comparación a aquellas encontradas en células "wild type" (Mahanthappa y Patterson, 1992). Así también, otros estudios han involucrado a Thy-1 como una proteína que perjudica la regeneración *in vivo*. Estudios de regeneración realizados con neuronas DGR establecieron que la disminución en los niveles de Thy-1 es requerida para la correcta regeneración de estas neuronas luego de una lesión en el nervio ciático de ratas adultas y recuperación de las funciones

sensoriales y locomotoras del animal (Chen *y cols.*, 2005). Estos antecedentes han llevado a postular que durante la regeneración de procesos neuronales expuestos a una axotomía, Thy-1 recapitularía su función inhibitoria del crecimiento de procesos neuronales observada en las neuronas en etapas del desarrollo del SNC.

5. Ligando de Thy-1 en el SNC

Estudios realizados por Tiveron y colaboradores, indicaron a través de ensayos de co-cultivo que los astrocitos son capaces de inhibir el crecimiento de neuritas en una línea celular de neuroblastoma (NG115) de manera dependiente de la expresión de Thy-1 (Tiveron *y cols.*, 1992), sugiriendo que Thy-1 media la inhibición del crecimiento axonal al interaccionar con un ligando de astrocitos. Importantemente, este efecto inhibitorio sólo se observó cuando los astrocitos, obtenidos del cuerpo calloso de ratas de 6 días, fueron mantenidos en cultivo por 2 a 5 meses, y no sobre células gliales obtenidos de embriones de rata (E16) cultivados por 2 días, ni tampoco sobre las células gliales del SNP (células de Schawnn) u otros tipos celulares (fibroblastos y células epiteliales de riñon) (Tiveron *y cols.*, 1992). La presencia de un posible ligando de Thy-1 en los astrocitos también fue corroborada por Dreyer y colaboradores, los cuales observaron que la adhesión de células de linfoma de rata AKR1 (que expresan Thy-1) a los astrocitos se ve inhibida cuando Thy-1 es silenciado (Dreyer *y cols.*, 1995).

En la búsqueda del ligando astrocítico para Thy-1, nuestro laboratorio fue pionero en descubrir que el ligando de Thy-1 en los astrocitos corresponde a la proteína heterodimérica, integrina $\alpha v\beta 3$ (Avalos *y cols.*, 2004; Avalos *y cols.*, 2002; Hermosilla *y cols.*, 2008; Leyton *y cols.*, 2001). Mediante estudios de secuencia primaria, se determinó que Thy-1 posee un tripéptido RLD (**Figura 2**) (Leyton *y cols.*, 2001), que corresponde a una secuencia de unión para algunas integrinas como $\alpha M\beta 2$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 5$ y $\alpha v\beta 3$, siendo estas dos últimas expresadas en el SNC (Barker y Hagood, 2009; Hermosilla *y cols.*, 2008). Interesantemente, utilizando ensayos de adhesión celular, nuestro laboratorio describió que la adhesión entre la línea celular de timoma EL-4 (que expresa altos niveles de Thy-1 en su superficie) y los astrocitos, depende de la interacción entre Thy-1 y la integrina que contiene la subunidad $\beta 3$ (Leyton *y cols.*, 2001). Sólo dos heterodímeros de integrina contienen la subunidad $\beta 3$, $\alpha II\beta 3$ cuya expresión se limita a las plaquetas y monocitos, y la integrina $\alpha v\beta 3$ que se expresa de manera ubicua (Takada *y cols.*, 2007),

por lo que la integrina αvβ3 fue considerado el mejor candidato para la interacción con Thy-1. Ensayos de inmunoprecipitación revelaron que el heterodímero αvβ3 se expresa efectivamente en la línea celular de astrocitos DITNC1, siendo ambas subunidades requeridas para la adhesión de estos astrocitos a la línea neuronal PC12, a través de la interacción con Thy-1 (Hermosilla *y cols.*, 2008). La interacción directa entre Thy-1 neuronal y la integrina αvβ3 astrocítica fue demostrada empleando la técnica de resonancia de plasmones superficiales ("surface plasmon resonance", SPR) y utilizando las proteínas recombinantes de ambas moléculas fusionadas a la fracción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1 (Hermosilla *y cols.*, 2008). Se identificó que esta interacción es dependiente del sitio de unión a integrina (RLD) presente en la secuencia aminoacídica de Thy-1 y es promovida por cationes divalentes como Mg^{+2} and Mn^{+2} (Hermosilla *y cols.*, 2008). Estos hallazgos demostraron que la integrina astrocítica αvβ3 corresponde al ligando de Thy-1. Sin embargo, estudios han evidenciado que en un individuo adulto, bajo condiciones fisiológicas normales, los astrocitos no expresan integrina αvβ3 (Gladson y Cheresh, 1991), por lo que la interacción Thy-1/integrina αvβ3 entre neuronas y astrocitos no jugaría un papel fisiológico aparente. Interesantemente, bajo condiciones patológicas como un infarto cerebro-vascular, los astrocitos sobre-expresan la integrina αvβ3, específicamente en aquellos que adquieren un fenotipo reactivo, GFAP (+) (Ellison *y cols.*, 1999; Ellison *y cols.*, 1998). Esta sobre-expresión también se ha observado en células de glioblastoma multiforme, tumor maligno derivado de los astrocitos (Gladson y Cheresh, 1991).

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y exceden en más de cinco veces la cantidad de neuronas (Sofroniew y Vinters, 2010). Además, se ha reportado que un solo astrocito puede estar en contacto con más de 10^5 sinapsis (Bushong *y cols.*, 2002) y cientos de dendritas (Halassa *y cols.*, 2007), por lo tanto una gran variedad de interacciones moleculares median la comunicación entre neuronas y astrocitos. Considerando que una de estas interacciones estaría mediada por Thy-1 y la integrina αvβ3, y en base a los antecedentes que asocian a Thy-1 con una acción inhibitoria del crecimiento de procesos neuronales (Chen *y cols.*, 2005; Herrera-Molina *y cols.*, 2012; Mahanthappa y Patterson, 1992; Maldonado *y cols.*, 2017; Tiveron *y cols.*, 1992), y a la sobre-expresión de la integrina αvβ3 en los astrocitos reactivos (Ellison *y cols.*, 1999; Ellison *y cols.*, 1998), nuestro laboratorio se ha enfocado en caracterizar a nivel celular y molecular, los efectos de la interacción entre ambas proteínas, tanto en

astrocitos como neuronas, con el objetivo de definir la función de estas moléculas en la comunicación célula-célula bajo condiciones patológicas asociadas a un daño en el SNC. En este sentido, mediante estudios *in vitro* se determinó que la interacción bimolecular Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$ promueve la comunicación bidireccional, induciendo efectos hacia las neuronas y hacia los astrocitos (Herrera-Molina *y cols.*, 2013).

6. Comunicación neurona-astrocito mediada por Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$

Efectos hacia el astrocito: Utilizando la línea celular de astrocitos de rata DITNC1, que expresa en su superficie celular la integrina $\alpha v\beta 3$, se determinó que la estimulación con Thy-1 - ya sea como proteína de fusión Thy-1-Fc o en la membrana de la línea celular tipo-neurona CAD - por tiempos cortos menores a 30 minutos, induce la agrupación de la integrina $\alpha v\beta 3$ en la membrana, el reclutamiento de vinculina, paxilina y la quinasa de adhesiones focales ("focal adhesión kinase", FAK), fosforilación de FAK y p130 Cas y activación de RhoA y ROCK (Avalos *y cols.*, 2004; Avalos *y cols.*, 2002; Leyton *y cols.*, 2001) afectando el citoesqueleto de actina y la forma celular. Estos cambios morfológicos, que involucran un aumento del número y tamaño de las adhesiones focales, se asemejan a los observados en astrocitos reactivos antes de migrar al sitio donde se encuentra la lesión, y formar la cicatriz (Cardenas *y cols.*, 2014; McGraw *y cols.*, 2001). En este contexto, nuestro laboratorio evidenció que estímulos prolongados con Thy-1 promueven la migración de los astrocitos mediante la activación de FAK, fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y la GTPasa Rac 1 (Kong *y cols.*, 2013). La vía de señalización involucrada en los cambios del citoesqueleto de actina también incluye la apertura de los hemicanales, conexina-43 y panexina-1, liberación de ATP al medio extracelular, el cual activa los receptores P2X7 permitiendo la entrada de calcio (Alvarez *y cols.*, 2016; Henriquez *y cols.*, 2011).

Interesantemente, se determinó que los eventos celulares hacia los astrocitos, inducidos por la interacción integrina $\alpha v\beta 3$/Thy-1, requieren adicionalmente del dominio de unión a heparina (HBD) presente en la secuencia aminoacídica de Thy-1 y del proteoglicano de heparán sulfato (HSPG), síndecan-4, también presente en la superficie de los astrocitos (Avalos *y cols.*, 2009; Kong *y cols.*, 2013) y cuya expresión se ve incrementada en los astrocitos reactivos (Iseki *y cols.*, 2002).

Como se mencionó previamente, en respuesta a un insulto en el SNC, los astrocitos se vuelven reactivos, sufren de cambios morfológicos como el incremento en las

adhesiones focales para la posterior migración hacia el sitio de la lesión para formar la cicatriz glial (Silver y Miller, 2004). Considerando que los eventos celulares en los astrocitos, descritos *in vitro* por nuestro laboratorio, y dependientes de Thy-1 neuronal y las proteínas astrocíticas, integrina $\alpha v\beta 3$ y síndecan-4, son similares a los que estarían ocurriendo *in vivo* luego de una lesión, los resultados sugieren que la interacción de Thy-1 con las proteínas astrocíticas podrían ser responsables de los cambios morfológicos que los astrocitos sufren en respuesta a un daño en el SNC.

Efectos hacia las neuronas: Utilizando la línea celular-tipo neurona CAD, se determinó a través de ensayos de co-cultivos con astrocitos DITNC1, que la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina astrocítica $\alpha v\beta 3$ actúa como una señal inhibitoria para la extensión de neuritas (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). En este mismo estudio, se estableció que la proteína de fusión $\alpha v\beta 3$-Fc es capaz de promover la retracción de los procesos neuronales ya establecidos, tanto en cultivos primarios de neuronas corticales como en células CAD, fenómeno acompañado de una disminución en la movilidad e incremento del agrupamiento de las moléculas de Thy-1 en la membrana neuronal (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). Específicamente la vía de señalización activada en respuesta a la integrina $\alpha v\beta 3$, que resulta en el remodelamiento del citoesqueleto de actina y que conlleva a la inhibición del crecimiento y retracción de procesos neuronales, involucra la multimerización de Thy-1 y formación de un complejo en la membrana celular junto a la quinasa Csk ("c-terminal Src kinase") y la proteína de unión a Csk, CPB ("Csk binding protein") (Maldonado *y cols.*, 2017). Este complejo excluye a Src de la membrana, la inactiva mediante su fosforilación en tirosina 527, lo que resulta en una disminución en la actividad de RhoGAP, activación de la vía RhoA/ROCK, y fosforilación de las proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina, como LIMK y cofilina (Maldonado *y cols.*, 2017). Importantemente, la vía de señalización activada tras la estimulación con la integrina $\alpha v\beta 3$ es similar a la descrita para las moléculas inhibitorias-asociadas a la mielina y CSPGs (Yiu y He, 2006).

La inhibición del crecimiento y retracción de procesos neuronales son eventos celulares estudiados *in vitro* que se asemejan a los observados en las neuronas luego de una axotomía *in vivo* producto de un insulto patológico al SNC (inhibición de la regeneración de procesos y retracción del axón dañado), por lo tanto, estos resultados sugieren que la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha v\beta 3$ del astrocito

contribuiría al ambiente no-permisivo para la regeneración axonal en el SNC luego de un daño.

Es importante destacar que, en comparación a los efectos inhibitorios del crecimiento de neuritas inducidos producto de la interacción directa astrocito-neurona, las células CAD extienden ampliamente sus procesos neuronales sobre astrocitos DITNC1 pre-incubados con la proteína de fusión Thy-1-Fc (competencia con ligando endógeno) o cuando los niveles de Thy-1 son silenciados, corroborando que los eventos de inhibición del crecimiento de procesos neuronales son dependiente de Thy-1 neuronal. Sin embargo, aún cuando se ve favorecida la extensión de los procesos neuronales al bloquear a la integrina $\alpha v\beta 3$ (con anticuerpos contra el ectodominio de la integrina $\beta 3$ o silenciando los niveles endógenos de la integrina $\beta 3$), el porcentaje de extensión de las neuritas es menor al cuantificado con astrocitos incubados con Thy-1-Fc (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). Estos resultados sugieren la participación de otra molécula presente en la superficie del astrocito, tanto en la asociación con Thy-1 como en la modulación de la inhibición del crecimiento de neuritas. En apoyo a este postulado, en los experimentos de adhesión celular entre EL-4 y astrocitos, que permitieron identificar la interacción entre Thy-1 y la integrina $\alpha v\beta 3$, se observó que la pre-incubación con anticuerpos contra la integrina $\beta 3$ o contra Thy-1 permitieron bloquear la adhesión EL-4/astrocitos, lo anterior en un 70% y 90%, respectivamente (Leyton *y cols.*, 2001). Esta diferencia en el porcentaje de bloqueo, sugiere la posibilidad que otras proteína, adicionales a la integrina $\alpha v\beta 3$, estén interaccionando con Thy-1 y modulando la adhesión celular (Leyton *y cols.*, 2001). Pensando que Thy-1 posee en su estructura primaria un dominio de unión a heparina que le permitiría reconocer proteoglicanos de heparán sulfato (Avalos *y cols.*, 2009; Hueber *y cols.*, 1992), y dada su reportada participación en los cambios morfológicos y aumento en la migración celular de astrocitos producto de la comunicación neurona-astrocito modulada por la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$ integrina (Avalos *y cols.*, 2009; Kong *y cols.*, 2013), postulamos a síndecan-4 como la molécula astrocítica que estaría participando en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales mediada por Thy-1. Considerando que los niveles proteicos de este proteoglicano se ven aumentados en astrocitos reactivos luego de una lesión al SNC (Iseki *y cols.*, 2002), su posible participación en los fenómenos neuronales inducidos por la comunicación neurona-astrocitos se hace aún más probable.

7. Proteoglicano de heparán sulfato síndecan-4

Síndecan-4 es un proteoglicano de heparán sulfato perteneciente a la familia de las proteínas de transmembrana tipo I, en mamíferos encontramos desde síndecan-1 hasta el síndecan-4 (Carey, 1997). Este proteoglicano está compuesto de un "core" proteico con tres dominios, extracelular, transmembrana y citoplasmático (**Figura 3**), siendo estos dos últimos altamente conservados entre especies e isoformas (Lopes *y cols.*, 2006). El dominio extracelular contiene hasta cinco sitios para la inserción postraduccional y covalente de las cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), que en el caso de los HSPGs corresponden a las cadenas de heparán sulfato (HS). Éstas consisten en repeticiones de la unidad de disacárido formada por *N*-acetilglucosamina y ácido glucorónico. Se ha reportado que cada cadena puede contener entre 50 y 150 repeticiones de estos disacáridos (Yanagishita y Hascall, 1992). La síntesis de las cadenas de HS se inicia con la adición de una *N*-acetilglucosamina al tetrasacárido formado por xilosa-galactosa-galactosa-ácido glucorónico, el cual está unido al "core" proteico a través de la *O*-glicosilación de un residuo de serina unida a una glicina (**Figura 3**) (Carey, 1997). Después de la síntesis, algunas azúcares de las cadenas de polisacáridos pueden sufrir varias modificaciones enzimáticas, como *N*-desacetilación, *N*-sulfatación, *O*-sulfatación, y epimerización del ácido glucorónico al ácido idurónico (Esko y Selleck, 2002). Se ha descrito que la naturaleza de la modificación conlleva a la generación de una casi infinita diversidad de cadenas de HS con diferentes patrones de modificaciones, siendo la sulfatación la más relevante en la mediación de la interacción con los respectivos ligandos. Interesantemente, las modificaciones resultan en cadenas de HS flexibles capaces de adoptar diversas conformaciones e interaccionar con una gran variedad de ligandos, incluyendo factores de crecimiento, proteínas de matriz-extracelular, receptores de adhesión como las integrinas, quimioquinas, e inhibidores de proteasas (Bass y Humphries, 2002).

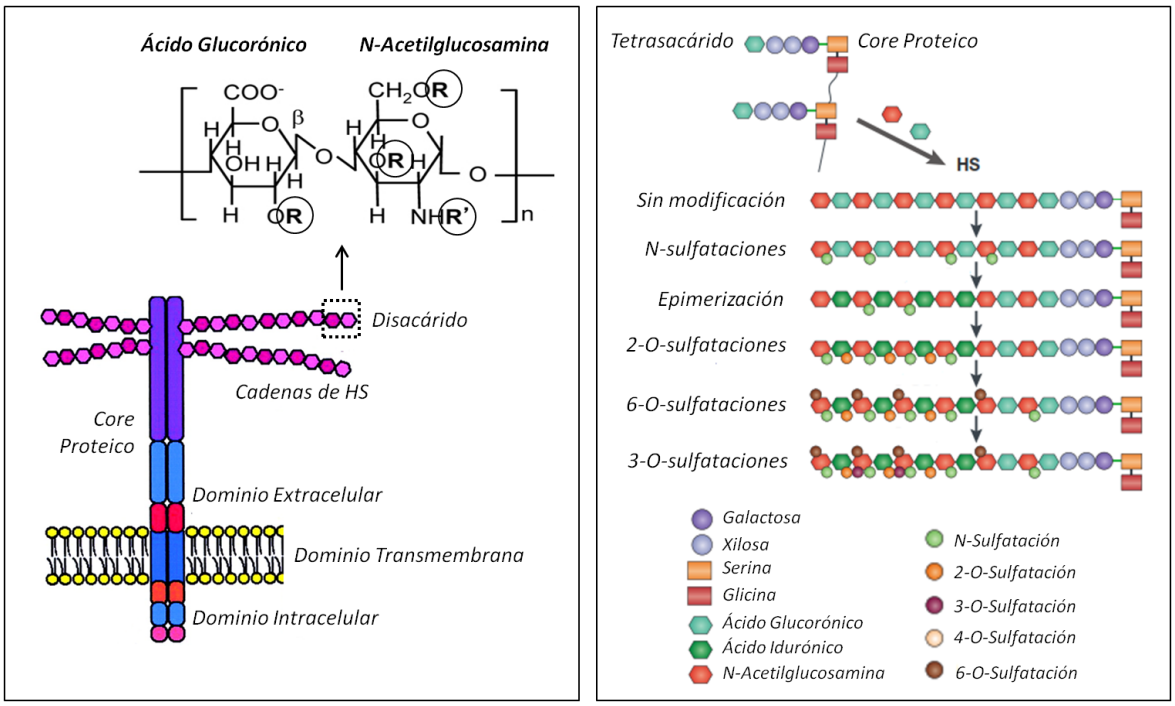


Figura 3. Estructura y biosíntesis de sindecan-4. (Izquierda) Estructura de síndecan-4 compuesta por el dominio extracelular, intracelular y de transmembrana. Al "core" proteico del ectodominio se le unen covalentemente las cadenas de heparán sulfato compuestas por repeticiones de la unidad de disacárido formada por *N*-acetilglucosamina y ácido glucorónico. **(Derecha)** La biosíntesis de las cadenas de HS inicia con la adición de una *N*-acetilglucosamina al tetrasacárido formado por xilosa-galactosa-galactosa-ácido glucorónico, unido al residuo de serina del "core" proteíco. Después de la síntesis, algunas azúcares de las cadenas de polisacáridos pueden sufrir varias modificaciones enzimáticas, como *N*-sulfataciones, *O*-sulfatación, y epimerización del ácido glucorónico al ácido idurónico. Imagen adaptada de (Esko y Selleck, 2002).

Síndecan-4 se expresa de manera ubicua en la superficie celular, y ha sido involucrada en la regulación de diversos procesos celulares como proliferación, migración, mecanotransducción, y endocitosis (Elfenbein y Simons, 2013). En el SNC, la expresión de síndecan-4 ha sido encontrada principalmente en las células gliales, específicamente en astrocitos, a diferencia por ejemplo de síndecan-3 y síndecan-2 cuya expresión se encuentra mayoritariamente en los axones y sinapsis neuronal, respectivamente (Hsueh y Sheng, 1999). Interesantemente, se ha reportado que tras un crio-daño a nivel cortical del SNC de ratones, los niveles de síndecan-4 se ven incrementados en los astrocitos reactivos (Iseki *y cols.*, 2002).

8. Mecanismo de acción de Síndecan-4

Síndecan-4 se presenta en la membrana celular formando oligómeros no-covalentes que se forman por medio del motivo de dimerización (GxxxG) ubicado en el dominio de transmembrana del proteoglicano (Dews y Mackenzie, 2007) y que pueden activar vías de señalización directamente tras la interacción con ligandos con dominios de unión a heparina (Elfenbein y Simons, 2013; Oh *y cols.*, 1997). También se ha reportado que el dominio extracelular de síndecan-4 puede ser cortado proteolíticamente por metaloproteasas, fenómeno acelerado bajo condiciones inflamatorias, donde también los niveles del proteoglicano son incrementados en la superficie celular (Alexopoulou *y cols.*, 2007; Kainulainen *y cols.*, 1998). El ectodominio soluble es liberado al medio extracelular, donde las cadenas de HS mantienen su habilidad para interaccionar con sus respectivos ligandos. Se piensa que este proceso de corte tendría una funcionalidad en el cierre de herida; sin embargo, no se tiene claridad de la función exacta que estaría cumpliendo, ni tampoco existen estudios que reporten este fenómeno luego de una lesión en el SNC.

Adicionalmente, síndecan-4 actúa como co-receptor estabilizando la interacción ligando/receptor primario. Esto principalmente con la familia de FGFs, que primeramente señaliza a través del receptor tirosina quinasa de la membrana celular, FGFR (receptor primario) (Carey, 1997; Elfenbein y Simons, 2013). Aun cuando la afinidad entre el factor de crecimiento y su receptor es alta, el proteoglicano a través de las cadenas de HS la amplifica y estabiliza (Sperinde y Nugent, 2000). Lo anterior mediante la formación de un complejo ternario entre el ligando-proteoglicano-receptor con una estequiometría de 2:2:2, estudiada mediante la cristalización del complejo (Schlessinger *y cols.*, 2000). Se reportó que síndecan-4 disminuye la constante de disociación (k_{off}) entre FGF/FGFR e incrementa la afinidad del ligando por el receptor, favoreciendo la activación del receptor cuando las concentraciones de FGF son bajas (Forsten-Williams *y cols.*, 2005; Nugent y Edelman, 1992).

Debido a la longitud de las cadenas de HS que se extienden aproximadamente 500 nm desde la superficie celular (Weinbaum *y cols.*, 2007), la presencia de más de un glicosaminoglicano por núcleo proteico y el estado multimerizado del proteoglicano en la membrana (Elfenbein y Simons, 2013), las cadenas de heparán sulfato ofrecen varios sitios de unión para sus ligandos, favoreciendo el "clustering" de estos ligandos (Carey, 1997; Ornitz *y cols.*, 1992). Este fenómeno de "clustering" de los ligandos es importante para la transducción se señales y mediación de diversos procesos celulares, como por

ejemplo los eventos neuronales de inhibición del crecimiento y retracción de neuritas, dependiente de Thy-1 y la integrina astrocítica $\alpha v\beta 3$ (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). Adicionalmente, al ofrecer varios sitios de unión para sus ligandos, las cadenas de HS incrementan la concentración efectiva de éstos en la superficie celular, influenciando positivamente la acción de los ligandos a nivel celular (Elfenbein y Simons, 2013).

9. Síndecan-4 y su función cooperativa con las integrinas

Algunos estudios han demostrado que los HSPGs funcionan en cooperación con los heterodímeros de integrina. Por ejemplo, en contexto de la adhesión de células de cáncer al endotelio vascular, se reportó que las moléculas expresadas en la superficie de células de melanoma, integrina $\alpha 5\beta 1$ y síndecan-4, se unen cooperativamente a la glicoproteína endotelial Thy-1 para formar un complejo trimolecular. Aun cuando en este estudio no se caracterizó directamente la interacción Thy-1/síndecan-4, se estableció que la presencia de este proteoglicano en el sistema favorece la formación de un enlace tipo "catch bond", que permite que el tiempo de vida entre Thy-1/integrina $\alpha 5\beta 1$ se vea favorecido al verse expuesto a una fuerza externa, y haciendo que incremente abruptamente la rigidez de los enlaces (Fiore *y cols.*, 2014). Así también se ha descrito que síndecan-4 coopera con la integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$, regulando su reciclaje y modulando la dinámica de adhesiones focales y migración sobre fibronectina (Morgan *y cols.*, 2013). Otro ejemplo es el mostrado por nuestro laboratorio, donde tanto la formación de adhesiones focales como la migración de los astrocitos en respuesta a Thy-1 neuronal, depende tanto de la integrina $\alpha v\beta 3$ como de síndecan-4 (Avalos *y cols.*, 2009; Kong *y cols.*, 2013).

En resumen, los antecedentes planteados indican que:

- Los astrocitos son reconocidos por representar el mayor impedimento para la regeneración axonal luego de una lesión en el SNC, efecto dependiente de la adquisición del fenotipo reactivo que conduce a la sobre-expresión de moléculas con acción inhibitoria de la regeneración.
- La integrina $\alpha v\beta 3$ astrocítica, cuya expresión es incrementada en los astrocitos reactivos, interacciona directamente con la proteína Thy-1, abundante en las neuronas del SNC adulto y que ha sido históricamente relacionada en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales.
- A través de ensayos *in vitro* se determinó que la interacción Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$ promueve una comunicación bidireccional neurona-astrocitos. En los astrocitos, la interacción promueve la adhesión celular y migración; mientras que hacia las neuronas induce la retracción de procesos neuronales previamente formados y la inhibición del crecimiento de los procesos neuríticos en la línea celular tipo-neuronas, CAD.
- La inhibición del crecimiento de procesos neuronales observada en las células CAD mediante ensayos de co-cultivo con astrocitos y dependiente de la interacción Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$, es evitada parcialmente al bloquear a la integrina $\alpha v\beta 3$ a diferencia del efecto observado cuando se bloquea Thy-1, sugiriendo la participación de un ligando astrocito adicional a la integrina en los eventos neuronales dependientes de Thy-1.

Considerando que: 1) Los eventos celulares inducidos por Thy-1 a nivel del astrocito requieren tanto de la integrina $\alpha v\beta 3$ como de síndecan-4, ambas proteínas presentes en la superficie del astrocito, y adicionalmente del dominio de unión a heparina presente en la secuencia de Thy-1. **2)** Este dominio de unión a heparina presente en Thy-1 podría promover la interacción con síndecan-4. **3)** Los niveles de síndecan-4 se ven incrementados en los astrocitos reactivos tras una lesión al SNC. **4)** Síndecan-4, en su papel como co-receptor, estabiliza, amplifica y aumenta la afinidad de unión ligando-receptor primario. 5**)** Síndecan-4 promueve fenómenos celulares en cooperación con los heterodímeros de integrina. Se planteó la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Síndecan-4 actúa como co-ligando de Thy-1 al interaccionar directamente con la glicoproteína neuronal, interacción que favorece y potencia los eventos de inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales inducidos por la asociación entre Thy-1 y la integrina $\alpha v\beta 3$.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar la participación de síndecan-4, expresado en la superficie de los astrocitos y como proteína de fusión, en la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales de la línea celular tipo-neuronas CAD.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

Objetivo Específico I

Determinar sí síndecan-4 está implicado en la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales mediada por la interacción $\alpha v\beta 3$ integrina/Thy-1 en la línea celular tipo-neuronas CAD.

Objetivo Específico II

Estudiar el mecanismo por el cual síndecan-4 favorece la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales en células CAD, mediado por la interacción $\alpha v\beta 3$/Thy-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

1.1. Reactivos generales: Azida de sodio (S-8032), BSA (A-2153), bicarbonato de sodio (S-7795), dimetilsulfóxido (D-2438), glicina (G-7126), heparina (H-3400), paraformaldehido (P-6148), y heparitinasa III (Hasa III; H-8891) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El metanol (1.06009), 2-propanol (1.09634), cloroformo (1.02431), glucosa (1.08342), Tritón X-100 (1.08603), y etanol (1.00983) fueron adquiridas en Merck. El ácido sulfúrico (9681-05) en JT Baker, mientras que el acetato de sodio (BM-1560), y 2-mercaptoetanol (BM-1200) en Winkler. La albúmina de suero bovino (BSA) libre de proteasas e inmunoglobulina (BSA-50) en Rockland. Azul de bromofenol (18030), cloruro de calcio (21101), cloruro de magnesio (63072), cloruro de potasio (60129), EDTA (3609), hidróxido de potasio (60369), hidróxido de sodio (71691), e isobutanol (58450) en Fluka. La solución de HEPES (15630-080) fue comprada en Gibco. El azul de Tripano (031021B) fue comprado en Biological Industries. NaCl (SO0227) y Na_2HPO_4 (SO0337) fueron adquiridos en Scharlau. El kit para purificación de DNA Midi Prep Endo Free (D6904-03) en Omega Biotek. El reactivo Fluo-4-AM (F14201) fue adquirido en Life Technologies.

1.2. Cultivo Celular: Los medio de cultivo DMEM (10567-014), DMEM-F12 (12400-016), DMEM-HG (31053-028), y RPMI 1640 (23400-021), la tripsina-EDTA (25200-056), 2-mercaptoetanol (21985-023), PBS 10X (70013-073), y los antibióticos Penicilina/Estreptomicina (15140-1229), HBSS (14185-052), ácido pirúvico (11360-070), MEM (61100-061), B27 (nc17504044), glutamina (25030-081), fungizona (15290-018), y neurobasal (21103049) fueron adquiridos en Gibco. El Suero Fetal Bovino (SFB) en Biological Industries o en HyClone Laboratories, Inc (recogido y procesado en Canadá o USA). La puromicina (P-9620) y solución de poli-lisina (P-4707) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Los "cell trackers" verde (C-2925) y rojo (C-2927) fueron obtenidos en Molecular probes.

1.3. Electroforesis y Western blot: Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit BCA (P23223) de Pierce. Los inhibidores de proteasas antipaina (178220), PMSF (52332) y benzamidina (199001) fueron obtenidos en Calbiochem, mientras que leupeptina (L-2050) en US Biological. El inhibidor de fosfatasas ortovanadato de sodio (O-6508), la solución de persulfato de amonio (A-3678), rojo Ponceau (P-3504), Trizma base (T-1503),

Tris-HCl (T-3253), Tween 20 (P-1379) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El dodecíl sulfato de sodio (SDS; 71729) fue comprado en Fluka. Los estándar de proteínas de bajo (161-0305) y alto (161-0373) peso molecular, solución acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 40% (161-0156) fueron adquiridos en Bio-Rad. La solución de TEMED (1.10732.0100) en Merck y el sustrato de quimioluminiscencia EZ-ECL de Biological Industries. El azul de Coomassie brillante R250 fue comprado en Fluka (27816). Las esferas de Proteína A sefarosa (P-3391) en Sigma-Aldrich, mientras que las esferas de Proteína G poliestireno (2.1 y 3.1 µm) en Spherotech. Para teñir los geles con plata, se utilizó tiosulfato de sodio (72049), nitrato de plata (209139), y carbonato de sodio (791768) de Merck.

1.4. Transfección celular, ensayo de ELISA e Inmunofluorescencia indirecta: El reactivo de transfección X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent (06-366 244 01) fue obtenido en Roche. El reactivo Amaxa TM Cell Line Nucleofector TM Kit V (VCA-1003) fue adquirido en Lonza. Las placas para ELISA de 96-pocillos (442404) son Nunc MaxiSorp. El sustrato 1-Step Ultra TMB ELISA (340028) fue adquirido en Thermo Scientific. La proteína recombinante del factor de crecimiento de fibroblastos básico humano FGFb (PH60266) y la fibronectina (33016-015) fueron adquiridas en Gibco. La vitronectina (SRP3186) y el DAPI (D9542) fueron comprados en Sigma, mientras que el Mowiol (475904) en Calbiochem.

2. Anticuerpos

2.1. Anticuerpos primarios: anti-integrina β3 monoclonal hecho en conejo (Millipore, AB2984) para Western blot e Inmunofluorescencia, anti-integrina β3 policlonal N-20 hecho en cabra (Santa Cruz; SC-6627) para bloquear el ectodominio en ensayos de co-cultivo CAD/astrocitos, anti-integrina β1 M-106 policlonal hecho en conejo (Santa Cruz; sc-8978) como control en ensayos de co-cultivo, anti-síndecan-4 monoclonal hecho en conejo (Abbexa; abx012825) para Western blot, anti-síndecan-4 monoclonal hecho en ratón (Santa Cruz; sc-12766) para detección proteína de fusión síndecan-4-Fc por Western blot, para Inmunofluorescencia indirecta y para ensayo ELISA, anti-GFAP monoclonal hecho en ratón (Sigma-Aldrich; G3893) para Inmunofluorescencia indirecta, anti-heparán sulfato 3G10 hecho en ratón (Seikagaku; 370260) para Western blot, anti-HA "probe" F-7 monoclonal hecho en ratón (Santa Cruz; sc-7392) para Western blot y ensayo de ELISA, anti-actina policlonal hecho en conejo (Sigma-Aldrich; A5060) como control de carga para ensayos de Western blot.

2.2. Anticuerpos secundarios: Acoplados a la enzima peroxidasa de rábano ("Horseradish Peroxidase"; HRP) hechos en cabra: anti-IgG de ratón (KPL; 074-1806) y anti-IgG de conejo (KPL; 074-1516); y acoplado a HRP hecho en ratón: anti-IgG1 humana (Jackson; 209-005-098). Conjugado a Alexa Fluor 546 hecho en cabra: anti-IgG de conejo (Invitrogen; A11010) y anti-IgG de ratón (Invitrogen; A11003). Conjugado a Alexa Fluor 488 hecho en cabra: anti-IgG de conejo (Invitrogen; A-11034) y anti-IgG de ratón (Invitrogen; A-11029).

3. Líneas celulares

3.1. Células CAD: La línea celular CAD ("Cath.a-differentiated") corresponde a un modelo celular tipo-neuronal derivado de la línea celular de neuronas catecolaminérgicas Cath.a, obtenidas desde neuronas cerebelares del sistema nervioso central de un ratón transgénico que expresa el antígeno T SV40 (virus 40 de simio) bajo el control transcripcional del promotor de la tirosina hidroxilasa de rata (Qi *y cols.*, 1997; Suri *y cols.*, 1993). A diferencia de las progenitoras, las células CAD son capaces de detener el ciclo celular y diferenciarse morfológicamente en un medio privado de nutrientes (Li *y cols.*, 2007; Qi *y cols.*, 1997). Las células CAD fueron proporcionadas por la Dra. Donna Chikaraishi (Duke University Medical Center NC, USA). Estas fueron cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado con 8% de SFB (Hyclone Canadá) y con antibióticos (penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml), a 37ºC en incubador humidificado (80%) y 5% de CO_2. Los experimentos fueron realizados entre los pasajes 20 y 40 de cultivo.

3.2. Células DITNC1: La línea celular astrocítica DITNC1 deriva de cultivos primarios de astrocitos tipo I de tejido de diencéfalo de rata. Esta línea celular se obtuvo mediante transfección de astrocitos primarios con plasmidio que expresa el antígeno T SV40 bajo control transcripcional del promotor humano de la proteína GFAP (Radany *y cols.*, 1992). Las células DITNC1 fueron proporcionadas por el Dr. Pierre Magistretti (Departamento de Siquiatría, University of Lausanne, Switzerland). Estas células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 5% SFB (Hyclone USA), 0,1 mM de 2-mercaptoetanol, y con antibióticos (penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml), a 37ºC en incubador humidificado (80%) y 5% de CO_2. Los experimentos fueron realizados entre los pasajes 20 y 30 de cultivo.

3.3. Células HEK293T: La línea celular transformada y derivadas de preparaciones de riñón embriónico humano (HEK 293T: "human embryonic kidney" 293T). Las células HEK293T fueron donadas por Dr. Pascal Schneider (Departamento de Bioquímica, University of Lausanne, Switzerland). Estas células fueron mantenidas en medio DMEM-HG suplementado con 10% SFB (Hyclone Canadá) y con antibióticos (penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml), a 37 ºC en incubador humidificado (80%) y 5% de CO_2. Los experimentos fueron realizados entre los pasajes 5 y 15 de cultivo.

4. Cultivos primarios

4.1. Cultivos primarios de astrocitos de rata: Los cultivos primarios de astrocitos fueron obtenidos desde cultivos mixtos de células gliales recuperadas de la corteza de ratas Wistar neonatas de 1 ó 2 días (P1 o P2). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, los cerebros fueron extraídos, y puestos en PBS refrigerado (4°C). Las cortezas separadas del cerebro y meninges fueron tratadas con tripsina, para luego ser mecánicamente disgregadas. La suspensión resultante fue pasado por un filtro celular de 70 µm, lavadas con DMEM-F12 suplementado con 10% SFB (Biological Industries) y centrifugadas a 380 xg por 10 minutos. Luego, las células fueron contadas y sembradas a una densidad de 1.5 millones por frasco T-25. El medio celular fue cambiado cada 48 horas. Una vez que lograron confluencia, neuronas y otros tipos celulares fueron liberados al sobrenadante a través de agitación en "shaker" orbital durante toda la noche. Los cultivos fueron mantenidos en medio DMEM-F12 suplementado con 10% SFB y con antibióticos (penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml), a 37 ºC en incubador humidificado (80%) y 5% de CO_2. El protocolo para el manejo de animales y obtención de estas células primarias fue aprobado por el Comité de Bioética de Animales (protocolo CBA #0377) de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4.2. Cultivos primarios de astrocitos tipo-ELA: Los cultivos primarios de astrocitos tipo-ELA fueron preparados de ratones transgénicos neonatos de 1 ó 2 días (P1 o P2), que expresan la enzima Superóxido Dismutasa humana mutada ($hSOD^{G93A}$). Como control se utilizó ratones que expresan la enzima "wild type" ($hSOD^{WT}$) (Rojas *y cols.*, 2014; Rojas *y cols.*, 2015). Estos cultivos fueron preparados y donados por el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Andrés Bello, por lo tanto, el protocolo para el manejo de animales y obtención de estas células primarias fue aprobado por el Comité de Bioética de Animales de la Universidad Andrés Bello. Los cultivos fueron mantenidos en medio

DMEM suplementado con 10% SFB (Biological Industries) y antibióticos (penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml), a 37 ºC en incubador humidificado (80%) y 5% de CO_2. Los cultivos alcanzaron confluencia luego de 2-3 semanas y contenían >95% astrocitos positivos para GFAP.

5. Producción de proteínas de fusión

5.1. Thy-1-Fc y sus mutantes: La proteína de fusión Thy-1-Fc "wild type", las mutantes para el dominio de unión a integrina, Thy-1(RLE)-Fc, dominio de unión a heparina, Thy-1(AEAAA)-Fc, y la proteína de fusión del receptor del ligando inductor de apoptosis soluble, TRAIL-R2-Fc, fueron donadas por el Dr. Pascal Schneider (Departamento de Bioquímica, University of Lausanne, Switzerland). Todas las proteínas mencionadas anteriormente fueron purificadas, y presentan una concentración final de 1 µg/µl.

5.2. αvβ3-Fc y síndecan-4-Fc: La proteína αvβ3-Fc fue producida a través de la co-transfección con iguales cantidades (10 µg DNA) de los plasmidios de expresión que codifican para las fracciones extracelulares de la integrina humana fusionadas a la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1, αv-Fc (PS711) y β3-Fc (PS675). Para esto las células HEK293T fueron sembradas en placas de 10 cm (40% confluencia) y transfectadas con el reactivo X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent. Después de 16 horas de transfección, las células se mantuvieron por 2 días a 37°C en medio sin suero. Luego, se recolectó el sobrenadante celular, se centrifugó a 380 xg por 5 minutos, se filtró con sistema de pirinola (tamaño poro: 0,25 µm) y se almacenó en alícuotas de 250 µl a -20°C. La proteína de fusión de síndecan-4 corresponde a la fusión del dominio extracelular de la proteína humana con la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1, síndecan-4-Fc. El protocolo de producción es equivalente al de la integrina αvβ3-Fc, mediante transfección de células HEK293T con el plasmidio de expresión de síndecan-4-Fc (10 µg DNA). Después de 16 horas de transfección, las células se mantuvieron por 2 días a 37°C en medio sin suero, para luego recolectar el sobrenadante celular, centrifugarlo, filtrarlo y almacenarlo en alícuotas de 250 µl a -20°C. Es importante mencionar que en los experimentos de pinzas ópticas se utilizó la proteína síndecan-4-Fc comercial y purificada [1 µg/µl]. Esta proteína tiene las mismas características que la proteína producida en el laboratorio, y también fue producida mediante la transfección de células HEK293T. En algunos experimentos, el sobrenadante control utilizado correspondió al obtenido mediante el crecimiento de células HEK293T no-transfectadas

(NT). Mientras que en otros experimentos, se usó como sobrenadante control el obtenido mediante transfección de células HEK293T con el plasmidio vacio (pCR3.1), siguiendo la estrategia detallada para las proteínas de fusión de interés.

6. Detección de las proteínas de fusión en el sobrenadante celular

La detección de las proteínas de fusión en sus respectivos sobrenadantes celulares se realizó mediante un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie, o mediante ensayos de Western blot con anticuerpos contra la porción Fc de la IgG humana (anti-IgG1 humana-HRP; 1:2500). En el caso de síndecan-4, también se utilizó anticuerpos contra síndecan-4 (anti-síndecan-4; 1:2000). La detección se realizó utilizando alícuotas obtenidas directamente del sobrenadante o utilizando las proteínas-Fc concentradas mediante la incubación de los sobrenadantes con esferas de proteína A-sefarosa. Para esto, 500 µl del sobrenadante celular recolectado se incubó con 50 µl de proteína A-sefarosa por 1 hora a 4°C, para luego centrifugarlo a 3000 xg por 5 minutos. Tanto el precipitado (proteínas Fc-proteína A-sefarosa; condición concentrada) como el sobrenadante depletado obtenido tras la centrifugación, se les adicionó buffer de carga Laemmli 1X, para luego ser hervidos a 100°C durante 5 minutos y ser cargados en un gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas de fusión fueron separadas por electroforesis (70 V constante; 2 horas), transferidas a una membrana de nitrocelulosa (100 V constante; 90 minutos) y luego identificadas con anticuerpos contra la porción Fc (anti-IgG1 humana-HRP; 1:2500).

7. Caracterización de la proteína síndecan-4-Fc

7.1. Detección de las cadenas de heparán sulfato: La caracterización de la presencia de cadenas de heparán sulfato en la proteína de fusión síndecan-4-Fc se realizó mediante ensayos de Western blot. En este caso, se asumió que la incubación de la proteína de fusión con la enzima heparitinasa III conduciría a la eliminación de las cadenas de heparán sulfato, lo que resultaría en una disminución del peso de la proteína, por lo que la presencia de las cadenas de heparán sulfato se detectó por el cambio de movilidad electroforética (mayor migración) de la proteína tratada con la heparitinasa respecto a la no tratada. Para esto, el sobrenadante celular (500 µl) fue incubado con 50 µl de proteína A-sefarosa por 1 hora a 4°C, para luego centrifugarlo a 3000 xg por 5 minutos. Tanto el precipitado (pp: complejo síndecan-4-Fc-proteína A-sefarosa) como el sobrenadante depletado (sob: sobrenadante sin síndecan-4-Fc) fueron incubados con la enzima

heparitinasa III por 3 horas a 37°C. Adicionalmente, el sobrenadante sin precipitar también fue incubado con la enzima. Luego, a las muestras se les adicionó buffer de carga Laemmli 1X, para luego ser hervidos a 100°C durante 5 minutos y ser cargados en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, y luego la proteína fue detectada utilizando anticuerpos contra síndecan-4 (anti-síndecan-4; 1:2000) o anticuerpos que reconocen el sitio resultante luego del corte realizado por la enzima heparitinasa III (anti-Heparán sulfato, 3G10; 1:2500).

7.2. Preparación de la enzima heparitinasa III: La enzima comercial liofilizada se resuspendió en 85 µl de BSA (1 mg/ml) disuelto en agua nanopura y filtrado en sistema de pirinola (tamaño poro: 0,25 µm). Luego se alicuotó en 17 tubos de 5 µl, quedando cada tubo con 1 mU enzimática. Cada solución fue concentrada en un SpeedVac (25 minutos a temperatura ambiente) y almacenados a -80°C.

7.3. Evaluación de la funcionalidad de las cadenas de heparán sulfato: La funcionalidad de las cadenas de heparán sulfato se estudió utilizando un ensayo de ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"), descrito en el punto 15.1. En el cual se evaluó la capacidad del síndecan-4-Fc para interaccionar con su ligando, el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano FGFb (1 µg/ml) (Allen *y cols.*, 2001; Horowitz *y cols.*, 2002). Como control del ligando se utilizó BSA (1 µg/ml), y como control de la proteína recombinante se uso TRAILR2-Fc (1 µg/ml).

8. Caracterización de la proteína αvβ3-Fc

8.1. Estimación de la concentración de αvβ3-Fc en el sobrenadante: La estimación de la concentración en la que se encuentre la integrina αvβ3-Fc en el sobrenadante obtenido de células HEK293T transfectadas, se realizó mediante un ensayo semi-cuantitativo de Western blot, utilizando anticuerpos contra la fracción Fc y una curva de calibración con la proteína de fusión TRAIL-R2-Fc. Para esto, el sobrenadante que contenía la integrina (50 µl), el sobrenadante control obtenido de células transfectadas con el plasmidio vacio (50 µl), y diferentes cantidades de la proteína TRAIL-R2-Fc (5, 15, 30, 50, 75, 100, 150 y 200 ng) fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10% y analizados por Western blot utilizando anticuerpos anti-IgG1 humana. Las bandas de TRAIL-R2-Fc fueron escaneadas densitométricamente, y los valores resultantes fueron graficados contra las diferentes cantidades de la proteína. La cantidad de la integrina αvβ3-Fc en 50 µl de sobrenadante

fue evaluada utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida y un peso molecular aproximado de 300 kDa para la molécula αvβ3-Fc (Hermosilla *y cols.*, 2008).

8.2. Depleción de αvβ3-Fc desde el sobrenadante: El sobrenadante que contiene la proteína de fusión (500 µl) fue incubado con un exceso de esferas de proteína A-sefarosa (50 µl) durante 1 hora a 4°C. La solución fue centrifugada a 3000 xg por 5 min. Este proceso fue repetido 4 veces, para asegurar la depleción completa de la proteína de fusión. Cada sobrenadante y precipitado obtenido tras cada incubación con la proteína A-sefarosa fue evaluado mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos anti-IgG1 (anti-IgG1 humano-HRP; 1:2000). Luego del cuarto ciclo de incubación/centrifugación, los niveles de la proteína αvβ3-Fc fueron indetectables en el precipitado (precipitado 4), por lo que el 4to sobrenadante fue utilizado en los experimentos con pinzas ópticas.

8.3. Purificación de la proteína αvβ3-Fc desde el sobrenadante: La integrina αvβ3-Fc fue purificada desde el sobrenadante de células HEK293T transfectadas vía el dominio Fc, a través de la incubación del sobrenadante (3 ml) con la proteína A-sefarosa (500 µl) a 4°C por 16 horas con constante agitación rotatoria. La resina con las proteínas αvβ3-Fc unidas fue recolectada en una columna y lavada con buffer tris salino (Tris-HCL 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 nM). Las proteínas fueron eluidas con ácido cítrico (50 mM, pH 2,7) y neutralizadas con Tris-HCL (1 M, pH 8,0). Los eluidos fueron mezclados y concentrados con tubos de ultra-centrifuga (Amicon 30K). Para incrementar la probabilidad de heterodimerización entre αv-Fc y β3-Fc luego del tratamiento con pH ácido (condición de elución), se siguió la metodología reportada para purificar la proteína α5β1-Fc (Coe *y cols*., 2001). Para esto, se introdujo mutaciones a los dominios C_H3 de los fragmentos Fc de cada subunidad, a través de mutagénesis sitio-dirigida. Este procedimiento fue realizado por una empresa externa (Epoch Life Science, Inc), que corroboró las mutaciones mediante secuenciación. Respecto a las mutaciones, en el DNA del Fc de la subunidad αv-Fc, el aminoácido pequeño treonina (residuo 366) fue cambiado por el aminoácido tirosina y de esta forma crear un "knob" o "perillas"; mientras que el DNA del Fc de la subunidad β3-Fc, el aminoácido tirosina (residuo 407) fue cambiado por una treonina, para crear un "hole" u "hoyo" (Ridgway *y cols.*, 1996). Esta estrategia fue inspirada por el modelo de Crick que explica el empaquetamiento de cadenas laterales de aminoácidos entre hélices α adyacentes. Aquí las cadenas laterales de los residuos en una hélice α

son representados como "knobs" en la superficie de un cilindro alternándose con "holes", en los cuales los "knobs" de una hélice α adyacente puede encajar (Crick, 1952).

8.4. Detección de $\alpha v\beta 3$-Fc purificada: La detección de la proteína $\alpha v\beta 3$-Fc purificada se realizó mediante un gel SDS-PAGE teñido con plata. Los geles al 10% fueron fijados con 200 ml de una solución que contiene 50% metanol y 5% ácido acético por 20 minutos. Los geles fueron lavados con una solución de metanol al 50% por 10 minutos y luego con agua por 10 minutos adicionales. La sensibilización de los geles fue realizada con 0,02% de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) por 1 minuto. Luego, los geles fueron lavados con agua dos veces, y teñidos con 0,1% de nitrato de plata ($AgNO_3$) por 20 minutos. Las bandas fueron detectadas al adicionar 2% de carbonado de sodio (Na_2CO_3) con 0,04% formaldehido con agitación constante. La reacción fue detenida con ácido acético al 5% por 2 minutos. Adicionalmente, se detectó la proteína purificada mediante ensayos de Western blot bajo condiciones reductoras y no-reductoras, con anticuerpos contra la porción Fc de la IgG humana (anti-IgG1-HRP; 1:2000).

8.5. Evaluación de la funcionalidad $\alpha v\beta 3$-Fc en sobrenadante y purificada: La funcionalidad de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc fue evaluada mediante un ensayo de ELISA, descrito en el punto 15.2. Esta estrategia experimental permitió evaluar la habilidad de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, tanto en el sobrenadante como purificada, para interaccionar con ligandos que contienen el dominio RGD, como fibronectina, vitronectina, y péptidos Kis (obtenidos del veneno de serpiente, Kis péptidos-RGD) (Hermosilla *y cols.*, 2008; Leyton *y cols.*, 2001). Como control negativo se utilizó los péptidos con el domino de unión a integrina mutado (péptidos-RGE).

9. Diferenciación morfológica de células CAD sobre astrocitos (Ensayo de co-cultivo)

En placas de 8 pocillos con fondo de vidrio (área: 1 cm^2) se sembró astrocitos DITNC1 (25.000 células) o astrocitos primarios de rata (15.000 células), los que se mantuvieron a 37°C hasta formar una monocapa de células (24 horas para los astrocitos DITNC1 y 48 horas para astrocitos primarios). En el caso del cultivo primario, los astrocitos fueron mantenidos en cultivo por otras 48 horas en presencia o ausencia de la citoquina pro-inflamatoria TNF-α (10 ng/ml) en un medio suplementado con SFB. La monocapa celular fue fijada con paraformaldehido (4%) durante 30 minutos a temperatura ambiente y lavada

con PBS (1X) y Glicina (5 mM). Las células CAD fueron marcadas con un "Cell Tracker" verde (10 µM) en un medio libre de suero, durante 45 minutos a 37°C, para luego ser contadas y sembradas sobre la monocapa de astrocitos fijados (6.000 células). Las células fueron mantenidas por 24 horas en medio con SFB, para luego inducir la diferenciación morfológica, es decir, extensión de procesos neuronales (neuritas), en un medio libre de suero y suplementado con Selenito de Sodio (SeNa; 50 ng/ml) durante 24 horas a 37°C (Qi *y cols.*, 1997).

9.1. Pre-tratamiento con Heparitinasa III: Para evaluar la participación de las cadenas de heparán sulfato presentes en la superficie celular de los astrocitos en la inhibición del crecimiento de neuritas, la monocapa de astrocitos fue pre-tratada con la enzima heparitinasa III (Hasa III; 0,5 mU) durante 3 horas a 37°C en un medio sin suero, para luego ser fijados con paraformaldehido, y continuar con el procedimiento detallado en el párrafo anterior.

9.2. Pre-tratamiento con Heparina: Una segunda estrategia experimental utilizada para evaluar la participación de las cadenas de heparán sulfato en la inhibición del crecimiento de neuritas fue el uso del glicosaminoglicano altamente sulfatado heparina (Hep; 400 µg/ml). En este caso, las células CAD marcadas con el "Cell Tracker Green", fueron pre-incubadas con Hep durante 30 minutos a 37°C, para luego ser sembradas sobre la monocapa de astrocitos fijados.

9.3. Silenciamiento de síndecan-4: Para evaluar la participación específica de síndecan-4 en la inhibición del crecimiento de los procesos neuronales, los astrocitos fueron co-transfectados con 2 siRNA contra el proteoglicano (contra los exones 3 y 4 del mRNA) (Ávalos *y cols*., 2009) y con el plasmidio que codifica para la proteína fluorescente verde GFP (pGFP). La transfección se realizó utilizando el sistema de transfección celular Amaxa Nucleofactor 2b (programa T-020). Luego fueron sembrados y mantenidos durante 48 horas a 37°C hasta formar la monocapa celular.

9.4. Bloqueo de la integrina αvβ3: Con el objetivo de bloquear a la integrina αvβ3, antes de sembrar las células CAD, la monocapa de astrocitos fijados fue incubada por 1 hora a 37°C con anticuerpos anti-β3 (5 µg/ml) que reconocen los residuos del dominio N-terminal (ectodominio).

10. Diferenciación morfológica de células CAD sobre proteínas de fusión

En placas de 24 pocillos (V_{final}: 500 µl; área: 2 cm^2), cada pocillo fue incubado con 1 ml de sobrenadante de células que contiene la proteína de fusión de síndecan-4 (síndecan-4-Fc), la proteína de fusión de la integrina $\alpha v\beta 3$ ($\alpha v\beta 3$-Fc), o ambos sobrenadantes. Como control, las placas fueron incubadas con el sobrenadante de células no transfectadas, en presencia o ausencia de los sobrenadantes que contienen las proteínas de fusión. La incubación se realizó durante 24 horas a 4°C. Luego, el sobrenadante fue aspirado, y las placas fueron lavadas con medio DMEM-F12 suplementado con 8% de SFB. Células CAD fueron sembradas sobre las placas (10.000 células) y mantenidas durante 24 horas en DMEM-F12 suplementado con suero. Luego que las células CAD se adhirieron a los pocillos, se indujo la diferenciación morfológica en un medio sin suero y suplementado con SeNa por 24 horas a 37°C.

11. Retracción de neuritas de células CAD

En placas de 24 pocillos (V_{final}: 500 µl; área: 2 cm^2), se sembró células CAD (10.000 células), las que se mantuvieron durante 24 horas en medio suplementado con suero, para luego inducir el crecimiento de los procesos neuronales en medio sin suero por 24 horas más. Una vez que las neuritas se formaron, las células CAD fueron incubadas con los sobrenadantes que contenían las proteínas de fusión, para luego obtener las imágenes de cada condición.

11.1. Sobrenadante con síndecan-4-Fc: Las células CAD con los procesos neuronales ya establecidos fueron incubadas con volúmenes crecientes del sobrenadante que contenía la proteína de fusión síndecan-4-Fc (25, 50, 100, 200 y 300 µl) a 37°C. Luego de 40 minutos, se obtuvo las imágenes de cada condición.

11.2. Sobrenadantes con síndecan-4-Fc y $\alpha v\beta 3$-Fc: Las células CAD con los procesos neuronales ya establecidos fueron incubadas durante 40 minutos a 37°C con 50 µl del sobrenadante que contenía la proteína de fusión de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc (1 décimo del volumen total), en ausencia o presencia de volúmenes crecientes del sobrenadante celular que contenía la proteína de fusión síndecan-4-Fc (25, 50, 100, 200 y 300 µl). La combinación de ambos sobrenadantes fue en el pocillo (sin pre-incubación) o 1 hora a 4°C antes de adicionarlas a los pocillos (con pre-incubación). Luego de 40 minutos, se obtuvo las imágenes de cada condición. En otros experimentos, las células CAD fueron

tratadas con el sobrenadante que contenía la proteína de fusión αvβ3-Fc, previamente o no incubado con proteína A (2 µg) o con síndecan-4-Fc (50 µl; relación 1:1) por 1 hora a 4°C. Y luego de 5, 10, 20 y 40 minutos de incubación a 37°C en las diferentes condiciones experimentales, se obtuvo imágenes de las células.

12. Cuantificación del largo de neuritas de las células CAD

Las imágenes de los ensayos de co-cultivo fueron obtenidas con un Microscopio Confocal Olympus Fluoview FV10 (objetivo 60X; tamaño imagen 512 x 512; Apertura Confocal 2.5). Las imágenes de los ensayos de diferenciación morfológica de células CAD sobre proteínas de fusión y los ensayos de retracción fueron obtenidos con un Microscopio de Epifluorescencia Olympus (objetivo 40X). La medición del largo de las neuritas se realizó mediante el software ImageJ (NeuronJ plug in), considerando solo las neuritas primarias, provenientes de células que presenten máximo 3 de éstas. Para expresar el largo de las neuritas en micras (µm), se fijó previamente a la cuantificación, la relación existente entre micras/pixeles de las microfotografías obtenidas en cada microscopio. Para caracterizar a las células CAD diferenciadas, se consideró como criterio de diferenciación morfológica cuando las células presentaban al menos una neurita cuyo largo sea ≥ a 15 µm. Adicionalmente, se utilizó la cuantificación del número de varicosidades como criterio para definir células maduras (Herrera-Molina *y cols.*, 2012).

13. Extracción de proteínas y análisis por Western blot

13.1. Preparación de cultivos celulares para ensayos de Western blot

Para obtener los extractos proteicos, los astrocitos primarios no transfectados, transfectados con siRNA contra el proteoglicano síndecan-4, o con siRNA control, fueron sembrados en placas de 24 pocillos (30.000 células/pocillo) y mantenidos durante 48 horas en medio con suero a 37°C. Luego, las células fueron incubadas o no con TNF-α (10 ng/ml) durante 48 horas extras a 37°C. En el caso de los astrocitos DITNC1, las células no transfectadas, transfectadas con siRNA contra síndecan-4 o transfectadas con siRNA control fueron sembradas en placas de 24 pocillos (50.000 células/pocillo) y mantenidas por 48 horas a 37°C. Los astrocitos primarios transfectados con el vector GFP o β3-GFP fueron sembrados en placas de 24 pocillos (25.000 células/cm^2) y mantenidas por 48 horas a 37°C. Mientras que las células HEK293T transfectadas o no con el plasmidio de expresión de la proteína de fusión síndecan-4-HA fueron sembradas en

placas de 24 pocillos (50.000 células/cm^2) y mantenidas en cultivo por 24, 48 y 72 horas a 37°C.

13.2. Análisis por Western blot para detectar síndecan-4

Para la detección de síndecan-4 en extractos proteicos de células DITNC1 o astrocitos primarios, las células fueron lisadas con tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl, 0,5% Tritón X-100) suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina, 12,5 µg/mL; antipaína, 10 µg/mL; benzamidina, 100 µg/mL) e inhibidor de fosfatasas (ortovanadato de sodio, 1 mM). Luego se sonicaron y centrifugaron a 16000 xg por 10 minutos, rescatándose el sobrenadante. La concentración de proteínas de los extractos proteicos fue determinada por el ensayo de BCA. Las proteínas (30 µg) fueron incubadas con heparitinasa III (0,3 mU) por 3 horas a 37°C. Las proteínas se hirvieron luego a 100°C durante 5 minutos en buffer de carga Laemmli 1X. Luego, los extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE en geles al 10% y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-Tween 0,1% y luego incubadas a 4ºC toda la noche con anticuerpo anti-heparán sulfato 3G10 (ratón; 1:2500) o anti-β-actina (conejo; 1:3000). Las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón conjugado a peroxidasa de rabano (HRP; 1:3000) por 1 hora a temperatura ambiente. El uso de la heparitinasa y anti-heparán sulfato permite la detección de varios proteoglicanos de heparán sulfato, como otros miembros de la familia de los sindecanos, los que son caracterizados por tener diferentes pesos moleculares (Avalos *y cols.*, 2009).

13.3. Análisis por Western blot para detectar la integrina αvβ3

Para la detección de la integrina β3, se prepararon los extractos celulares en tampón de carga Laemmli 1X (60 mM Tris-Cl pH 6,8; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol) suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina, 12,5 µg/mL; antipaína, 10 µg/mL; benzamidina, 100 µg/mL) e inhibidor de fosfatasa (ortovanadato de sodio, 1 mM). El extracto proteico fue hervido a 100°C durante 5 minutos, separados por SDS-PAGE en geles al 10% y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-Tween 0,1% y luego incubadas a 4ºC toda la noche con anticuerpo anti-integrina β3 (conejo; 1:3000) o anti-β-actina (conejo; 1:3000). Las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP (1:3000) por 60 minutos a temperatura ambiente.

13.4. Análisis por Western blot para detectar síndecan-4-HA

Para la detección de síndecan-4-HA, se prepararon los extractos celulares en tampón de carga Laemmli 1X (60 mM Tris-Cl pH 6,8; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol) suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina, 12,5 µg/mL; antipaína, 10 µg/mL; benzamidina, 100 µg/mL) e inhibidor de fosfatasa (ortovanadato de sodio, 1 mM). El extracto proteico fue hervido a 100°C durante 5 minutos, separados por SDS-PAGE en geles al 10% y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-Tween 0,1% y luego incubadas a 4ºC toda la noche con anticuerpo anti-síndecan-4 (ratón; 1:2000), anti-HA (ratón; 1:2000), o anti-β-actina (conejo; 1:3000). Las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón conjugado a HRP (1:3000) por 1 hora a temperatura ambiente.

En todos los casos, se detectó la presencia de peroxidasa de rabanito mediante el reactivo quimioluminiscente EZ-ECL en un sistema de quimioluminiscencia modelo Discovery 12iC de Ultralum (Claremont, CA USA). La determinación de los niveles proteicos fue realizada por análisis densitométricos de los blots utilizando el software Image J.

14. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta

Cubreobjetos estériles (12 mm) fueron sumergidos en etanol a los 100%, flameados y colocados en placas de 24. Estas placas fueron expuestas a luz ultra-violeta por 15 minutos y luego tratados con poli-lisina (500 µl/pocillo) durante 5 minutos. La poli-lisina fue recuperada, y los cubreobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez que las placas fueron preparadas, se procedió a sembrar los astrocitos primarios (5.000 células/pocillo), los que se mantuvieron durante 48 horas en medio DMEM-F12 suplementado con suero a 37°C. Luego, los astrocitos fueron incubados con citoquinas pro-inflamatorias: TNF-α (10 ng/ml) o IL-1β (20 ng/ml) durante 48 horas a 37°C en medio con suero. En el caso de los astrocitos DITNC1, estas células fueron sembradas (5.000 células/pocillo), y mantenidas por 24 horas en medio completo, para luego ser tratados o no con heparitinasa III (Hasa III; 0,5 mU) durante 3 horas a 37°. Luego de los respectivos tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehido (4%) durante 30 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con Buffer Universal (BU) 0,1% Tritón X-100 (15 minutos; temperatura ambiente). Luego, las células fueron bloqueadas con 2% BSA en BU (1 hora; temperatura ambiente). La detección de síndecan-4 se realizó incubando las células fijadas con anti-síndecan-4 (ratón; 1:2000) por

1 hora a temperatura ambiente, seguido del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 (1:400; 1 hora temperatura ambiente). Por otra parte, la detección de integrina β3 fue realizada incubando las células con anti-integrina β3 (conejo; 1:200) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488 (1:400; 1 hora temperatura ambiente). La detección del filamento intermedio GFAP fue realizada incubando las células con anti-GFAP (1:1000; pollo) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido del anticuerpo secundario anti-IgG de pollo Alexa Fluor 546 (1:400; 1 hora temperatura ambiente). El núcleo fue marcado con DAPI (1:5000) durante 15 minutos en BU-Tween 0,1%. La marca fluorescente fue visualizada tomando imágenes en un Microscopio Confocal Fluoview FV10i (objetivo: 60X; tamaño imagen 1024 x 1024; Apertura Confocal 2.5).

15. Ensayo de ELISA

15.1. Evaluación funcionalidad cadenas de heparán sulfato de síndecan-4-Fc

Placas de 96-pocillos Nunc MaxiSorp (442404), con dominios hidrofóbicos e hidrofílicos (50% de cada uno) fueron incubadas con el factor de crecimiento de fibroblastos básico humano FGFb (1 µg/ml) o BSA (1 µg/ml) toda la noche a 4°C en tampón carbonato/bicarbonato (100 mM, pH 9,4). Como control, se incubaron pocillos solo con la solución tampón. Todos los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS-Tween 0,05%, para luego bloquear por 2 horas con 1% BSA en PBS. Los pocillos respectivos fueron incubados con el sobrenadante celular que contiene la proteína de fusión síndecan-4-Fc (200 µl/pocillo) o TRAILR2-Fc (1 µg/ml) durante 2 horas a 37°C. Todos los pocillos fueron lavados 4 veces con PBS-Tween 0,05%. Para evaluar la unión de síndecan-4-Fc a FGFb, los pocillos fueron incubados con el anticuerpo anti-IgG1 conjugado a HRP (anti-IgG1-HRP; 1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente.

15.2. Evaluación de la funcionalidad de αvβ3-Fc en sobrenadante y purificada

Placas de 96-pocillos Nunc MaxiSorp fueron incubadas con los ligandos de unión a integrina, fibronectina (0,5 µg), vitronectina (1 µg), y péptidos Kis (Kis péptidos-RGD; 10 µg) (Leyton *y cols*., 2001; Hermosilla *y cols*., 2008), toda la noche a 4°C en buffer PBS. Como control negativo se utilizó los péptidos con el domino de unión a integrina mutado (péptidos-RGE; 10 µg). Los sitios de unión no-específica fueron bloqueados con 1% BSA en PBS por 2 horas. El sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (25 µl) o la

proteína $\alpha v\beta 3$-Fc purificada y concentrada (1 µl) fueron adicionadas a los pocillos, incubadas por 2 horas a 37°C, y lavadas. Luego, para evaluar la interacción de la proteína $\alpha v\beta 3$-Fc a los ligandos, los pocillos fueron incubados con el anticuerpo anti-IgG1 conjugado a HRP (anti-IgG1-HRP; 1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente.

15.3. Detección de la interacción Thy-1/síndecan-4-HA

Placas de 96-pocillos Nunc MaxiSorp fueron incubadas con la proteína de fusión de Thy-1-Fc (1 µg) o con TRAIL-R2-Fc (1 µg) durante toda la noche a 4°C en buffer carbonato/bicarbonato (100 mM, pH 9,4). Los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS-Tween 0,05%, y bloqueados con 1% BSA en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, los extractos proteicos obtenidos de células HEK293T transfectadas o no con síndecan-4-HA (48 horas post-transfección) fueron adicionados a los pocillos e incubados por 2 horas a 37°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween 0,05%, la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Ha fue detectada con anticuerpos anti-síndecan-4 (ratón; 1:2000) o anti-HA (ratón; 1:2000), seguidos del anticuerpo secundario anti-IgG-HRP de ratón (1:3000), ambos incubados 1 hora a temperatura ambiente.

En todos los casos, la presencia y actividad de la peroxidasa de rabanito fue revelada con el sustrato colorimétrico y soluble, TMB (3,3´,5,5´-tetrametilbezinida) el cual al ser oxidado por la enzima, genera un producto azul que absorbe a 370 nm y 652 nm. Para esto, se adicionó a cada pocillo 100 µl de la solución 1-Step Ultra TMB por 15 a 30 minutos, o hasta que el color azul aparezca. La reacción se detiene tras la adición de ácido sulfúrico 2M (100 µl/pocillo), para luego medir la absorbancia a 450 nm (amarillo) en el lector de microplaca Infinite 200 pro NanoQuant (Tecan).

16. Medición niveles de Calcio intracelular $[Ca^{+2}]_i$

Células CAD fueron sembradas (5.000 células) sobre cubreobjetos estériles (12 mm) colocados previamente en placas de 6 pocillos. Luego de inducir la diferenciación morfológica en un medio sin suero por 24 horas, las células CAD fueron incubadas con Fluo-4-AM (1 µM) durante 30 minutos a 37°C. Las células CAD fueron lavadas con buffer "Tyrode", para luego hacer las mediciones de los niveles de Calcio en el mismo buffer (V_{final}: 1000 µl). Las imágenes se obtuvieron cada 2 segundos en un Microscopio Confocal Spinning Disk (objetivo 40X) durante 20 minutos. Luego de 2 minutos de obtener imágenes correspondientes a la condición basal, se adicionaron los respectivos estímulos:

sobrenadante que contenía la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc (100 µl), síndecan-4-Fc (100 µl) o sobrenadante de células no-transfectadas (100 µl). La intensidad de fluorescencia fue cuantificada en los terminales de procesos neuronales de células CAD usando Image J. Los resultados fueron expresados como $(F-F_0)/F_0$, donde F corresponde a los cambios de fluorescencia y F_0 es la fluorescencia basal.

17. Equipo de Pinzas Ópticas

Para caracterizar las interacciones proteína-proteína a nivel de molécula-única se utilizó la espectroscopía de fuerza molecular, utilizando como transductor de fuerza el equipo de pinzas ópticas, específicamente el instrumento denominado *miniTweezers*, debido a su tamaño reducido (**Figura 4**) (Smith *y cols.*, 2003). Todo el trabajo realizado en esta tesis con el equipo *miniTweezers* se realizó en colaboración con el Dr. Christian A.M. Wilson (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile). Este equipo cuenta con una trampa óptica única formada con dos laser de 845 nm, y posee una resolución de fuerza, espacio y tiempo de 0.1 pN, 0.1-2 nm, y 10^{-4} s, respectivamente (Moffitt *y cols.*, 2008; Neuman y Nagy, 2008). El detalle completo del instrumento *miniTweezers* está disponible en la página web http://tweezerslab.unipr.it.

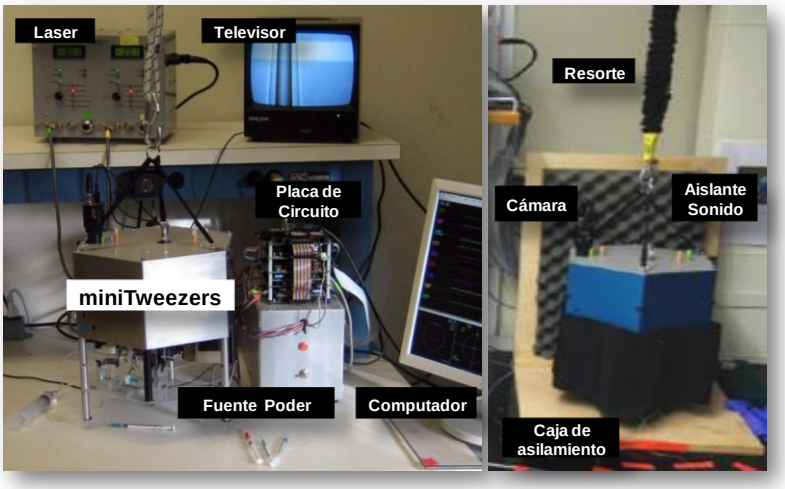


Figura 4. Equipo *miniTweezers*. (Izquierda) Fotografía general donde se muestran los componentes básicos necesarios para el correcto funcionamiento del equipo: equipo de pinzas ópticas (*miniTweezers*), fuente de suministro de láser (laser), fuente poder del controlador (fuente de poder), placa de circuito del controlador (placa de circuito), monitor de televisor y computador. **(Derecha)** Para operar las pinzas ópticas, éstas deben estar dentro de una caja de madera que permite la aislación del ruido ambiental (aislante sonido), y deben estar suspendidas desde el techo con un resorte para minimizar las vibraciones del piso. También podemos ver la cámara que permite ver la imagen en el monitor de televisor.

18. Mediciones en Pinzas Ópticas

Todos los experimentos fueron realizados en un cuarto cerrado con la temperatura controlada a 25°C, utilizando buffer Hepes (10 mM Hepes, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM $MgCl_2$) y microcámaras de flujo laminar con una micropipeta de vidrio (**Figura 5**). Considerando las propiedades de las proteínas de fusión (proteínas fusionadas al fragmento Fc: Thy-1-Fc, $\alpha v\beta 3$-Fc y síndecan-4-Fc), se utilizó esferas de poliestireno cubiertas con proteína G para unir las proteínas mediante el dominio Fc. Para estudiar la interacción de Thy-1-Fc con síndecan-4-Fc o $\alpha v\beta 3$-Fc, las esferas de 2,1 µm fueron cubiertas con Thy-1-Fc y mantenidas en la punta de la micropipeta de vidrio por succión, mientras que las esferas de 3,1 µm fueron cubiertas con síndecan-4-Fc o $\alpha v\beta 3$-Fc y mantenidas en la trampa óptica.

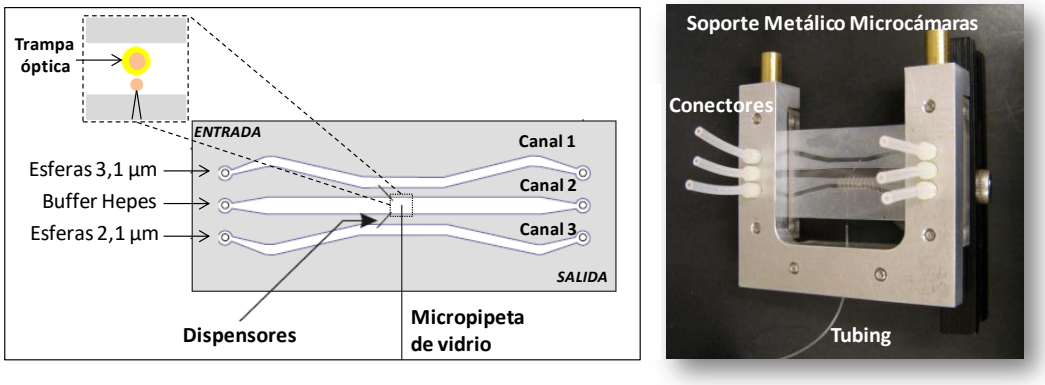


Figura 5. Microcámaras para *miniTweezers*. (Izquierda) Dibujo esquemático de las microcámaras utilizadas en las pinzas ópticas. Dos nescofilm dan la estructura a los canales de la cámara, los que son empaquetados por dos "coverslip" de grosor #2. Dos tubos dispensadores de vidrio permiten conectar los canales 1 (superior) y 3 (inferior) por donde ingresan las esferas, con el canal 2 (central) donde se encuentra la punta de la micropipeta de vidrio (diámetro < 1 µm), la trampa óptica (circulo amarillo), y donde se realizan los ciclos de acercamiento-retracción entre la esfera atrapada por la trampa óptica y la esfera atrapada por succión en la micropipeta (ver zoom). **(Derecha)** Soporte metálico donde se instala la microcámara, y que permite insertarla en las pinzas ópticas. Los conectores se insertan en los orificios de los canales, y permiten insertar las mangueras de plástico ("tubing") por donde se inyectan y salen las esferas de poliestireno cubiertas con proteína G o el buffer Hepes (también mostrado en la figura de la izquierda). El "tubing" de plástico también se inserta en la micropipeta de vidrio para realizar la succión de las esferas.

19. Cuantificación de las Fuerzas

19.1. Estrategia experimental para cuantificar las fuerzas

Para cuantificar las fuerzas requeridas para disociar la interacción entre nuestras proteínas de interés, se realizaron ciclos de acercamiento y retracción de las esferas. Específicamente, para promover la interacción entre las proteínas, la esfera atrapada por la luz se acercó y puso en contacto con la esfera en la micropipeta (acercamiento).

Mientras que para disociar la interacción, se aplicó la estrategia tipo rampas de fuerza ("force-ramp") donde la esfera atrapada por la luz se mueve en la dirección opuesta a una velocidad de tiraje ("pulling rate") constante de 100 nm/s (retracción). Considerando la rigidez ("stiffness") del sistema ("spring constant": 0,1 pN/nm), la tasa de carga ("loading rate") en nuestros experimentos correspondía a 10 pN/s. Lo anterior, ya que la tasa de carga es equivalente al producto entre la velocidad de tiraje y la rigidez del sistema (Dudko *y cols.*, 2008). En el caso que la interacción proteína-proteína ocurra, al mover la esfera atrapada por la luz en dirección opuesta, ésta esfera es desplazada del centro de la trampa óptica generando una fuerza que romperá la unión cuando sea mayor a la fuerza que disocia la interacción. La fuerza de ruptura es obtenida a partir de un gráfico que describe la fuerza en pN versus posición de la trampa en nanómetros. Para cada experimento, se cuantificaron al menos 300 eventos de interacción-ruptura en un total de 5 pares de esferas, cada una preparada recientemente (15 minutos antes de usarlas). Los datos de fuerza de ruptura se graficaron en histogramas, los cuales fueron normalizados por el número total de ciclos de acercamiento. La frecuencia de adhesión fue calculada midiendo el número total de eventos de unión observados para al menos 50 ciclos de acercamiento-retracción para 5 pares de nuevas esferas.

19.2. Medición de las fuerzas en el equipo

Este instrumento mide las fuerzas en 3 dimensiones, las fuerzas en el eje X e Y que son transversales al eje del laser, y las fuerzas en el eje Z que son paralelas al eje óptico. La cuantificación de la fuerza generada producto de la interacción proteína-proteína se basa en la conservación del *momentum* de la luz (Smith *y cols.*, 2003), y se mide directamente a través de la desviación de los láseres de atrapamiento por la esfera atrapada. Es decir, la luz que pasa a través del objeto atrapado (*i.e*. esferas de poliestireno) es desviada hacia un lado en el caso que se genere una fuerza (*i.e* fuerza generada producto de la interacción entre proteínas unidas a cada esfera). Los detectores PSD miden los cambios en la potencia de desviación (fuerzas transversales) y cambios en la potencia de la concentración (fuerzas longitudinales) de los haces de luz que salen de la región de atrapamiento producto de la fuerza generada. Para lograr esto, los haces de luz que salen de la zona de atrapamiento óptico (desde la esfera atrapada) son proyectados por lentes ("relay lenses"), divididos por un cubo divisor de haz no-polarizante (npbs, "non-polarizing hybrid beam-splitter"), para llegar a dos detectores, uno que mide las fuerzas transversales (Fx y Fy) y otro que mide la fuerza axial (Fz) (**Figura 6**).

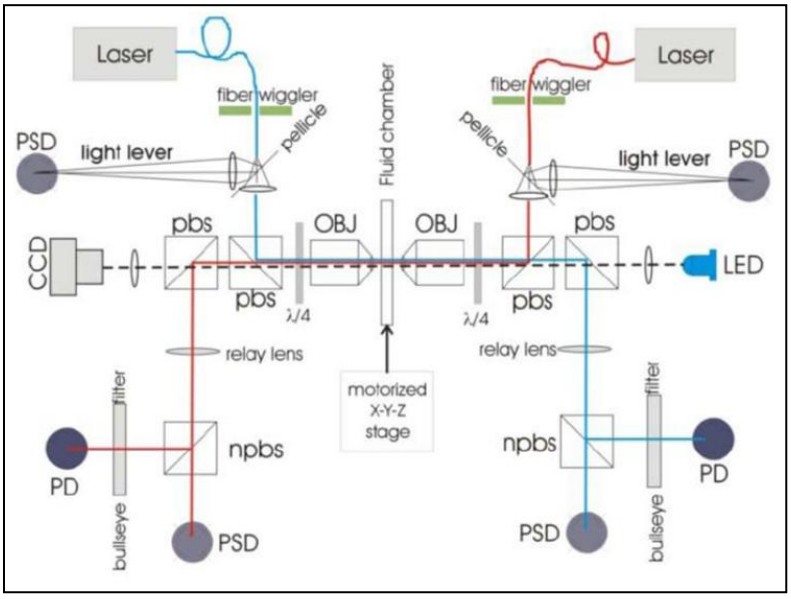


Figura 6. Representación esquemática componentes ópticos *miniTweezers*. Laser = Láser de diodo acoplado a fibra ("Fiber-coupled diode laser"); *pellicle* = película divisora de haz, Thorlabs BP108; pbs = cubo divisor de haz polarizante ("polarizing beam-splitter cube"); npbs = cubo divisor de haz no-polarizante, OBJ = objetivo Olympus UPlanApo-60x de inmersión en aguar, PSD = foto-detector sensible a la posición ("position-sensitive photo detector"), UDT DL-10; PD = fotodiodo, UDT 10-DI; Bullseye filter = filtros hechos a la medida con impresora laser; λ/4 = placa cuarto de onda; CCD = cámara conectada TV; LED = de brillo azul alto; Motorized X, Y, Z stage = motor para mover microcámaras en los tres ejes, Newport 561D-XYZ stage, Thorlabs Z606 motors. http://tweezerslab.unipr.it.

20. Análisis de los datos de fuerza con modelo Dudko-Hummer-Szabo

Los histogramas de fuerza de ruptura fueron analizados usando el modelo de Dudko, Hummer y Szabo (DHS) (Dudko *y cols.*, 2008), que permite transformar los datos de fuerza en tiempos de vida dependientes de la fuerza, $\tau(F)$:

$$\tau(F_0 + (k - 1/2)\Delta F) = \frac{(h_k/2 + \sum_{i=k+1}^{N} h_i)\Delta F}{h_k \dot{F}(F_0 + (k-1/2)\Delta F)} \qquad \text{Ecuación [1]}$$

Aquí, los histogramas de fuerza contienen N bins (barras) de un ancho ΔF que empieza en F_0 y termina en $F_N = F_0 + N\Delta F$. El número de cuentas en el i-ésimo bin es C_i, resultando en la altura $h_i = C_i/(N_{tot}\Delta F)$, donde N_{tot} es el número total de cuentas; k = 1,2,...

Luego de aplicar la ecuación [1], se obtuvo los datos para graficar $\tau(F)$ versus F de ruptura. El modelo DHS interpreta la dependencia del tiempo de vida respecto a la fuerza, asumiendo que la disociación de una interacción proteína-proteína puede ser descrita como un escape desde un pozo profundo de energía libre uni-dimensional (Dudko *y cols.*,

2008). Por lo tanto, con el siguiente modelo no-linear de DHS, tanto el perfil energético como los parámetros cinéticos del proceso de disociación a una taza de carga constante (10 pN/s) pueden ser caracterizados:

$$\tau(\mathrm{F}) = \tau_0 \left(1 - \frac{\mathrm{vFx}^{\ddagger}}{\Delta \mathrm{G}^{\ddagger}}\right)^{1-1/\mathrm{v}} \mathrm{e}^{-\beta \Delta \mathrm{G}^{\ddagger}[1-(1-\mathrm{vFx}^{\ddagger}/\Delta \mathrm{G}^{\ddagger})^{1/\mathrm{v}}]} \qquad \text{Ecuación [2]}$$

En esta ecuación, F es la fuerza y $\beta = (k_B T)^{-1}$ es la energía terminal inversa; τ_0 es el tiempo de vida de la interacción a fuerza cero (inversamente relacionado a la constante de disociación: $(\tau_0)^{-1}$); $\Delta x^{\ddagger}$ es la distancia al estado de transición; y $\Delta G^{\ddagger}$ es la energía libre de activación aparente, valor que describe la barrera energética que debe ser superada para disociar la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc o αvβ3-Fc en ausencia de fuerza. El factor de escalamiento v describe la forma del perfil energético. $\mathrm{v} = 1/2$ corresponde a un pozo armónico con una barrera tipo-cúspide, mientras que $\mathrm{v} = 2/3$ corresponde a un potencial que contiene términos lineales y cúbicos. Ambos valores de v se ajustaron correctamente a nuestros datos, dando resultados similares para los parámetros calculados.

21. Metodología matemática para filtrar fuerzas de ruptura

21.1. Metodología matemática

En el estudio de la interacción entre Thy-1 y la integrina αvβ3 mediante pinzas ópticas, nos encontramos con la dificultad de no contar con la proteína de fusión de la integrina purificada. Por lo que se diseñó una estrategia experimental para utilizarla directamente desde el sobrenadante obtenido de células HEK293T co-transfectadas con los plasmidios αv-Fc y β3-Fc. Aun cuando se utilizaron esferas de poliestireno recubiertas con proteína G para separar la integrina αvβ3-Fc, vía el dominio Fc, de las otras moléculas solubles presentes en el sobrenadante celular, en las pinzas ópticas se detectaron interacciones no-específicas con Thy-1-Fc. Por lo tanto, para caracterizar correctamente los parámetros de disociación entre Thy-1/αvβ3 aplicando el modelo DHS, se propuso restar las fuerzas de ruptura resultante de las interacciones no-específicas, del total de fuerzas de ruptura caracterizadas para Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc no-purificada en el sobrenadante, para obtener de esta forma, solo las fuerzas de ruptura asociadas a los eventos de unión específicos para Thy-1/αvβ3. Para caracterizar las interacciones no-específicas, se midió las fuerzas de ruptura resultantes para la interacción entre Thy-1-Fc y esferas cubiertas

con el sobrenadante obtenido de células HEK293T transfectadas con el plasmidio vacio (sobrenadante control). Es importante mencionar que la metodología matemática descrita en los siguientes párrafos para restar las fuerzas de ruptura asociadas a interacciones no-específicas fue diseñada por el físico Nataniel L. Figueroa (Departamento de Física, Pontificia Universidad Católica de Chile).

Considerando solo los casos en que la interacción ocurre, existen dos posibles resultados: Thy-1-Fc interacciona de una manera específica con la integrina αvβ3-Fc (eventos AB) o Thy-1-Fc interacciona de una manera no-específica ya sea con las otras moléculas presentes en el sobrenadante celular o con la superficie de las esferas (eventos $\overline{AB}$). Estos eventos son mutuamente excluyentes considerando las condiciones de molécula-única (*i.e.* eventos de unión de molécula única) utilizadas en este estudio. Aplicando la ley de probabilidad total, la probabilidad de obtener una fuerza de ruptura entre F y F + dF, P(F) estará dado por:

$$\mathrm{P(F)} = \mathrm{P(F|AB)P(AB)} + \mathrm{P(F|\overline{AB})P(\overline{AB})} \qquad \text{Ecuación [3]}$$

Aquí, $P(F|AB)$ y $P(F|\overline{AB})$ corresponden a los histogramas de fuerza de ruptura normalizados para las condiciones estudiadas entre Thy-1-Fc/sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc y entre Thy-1-Fc/sobrenadante control, respectivamente. $\mathrm{P(AB)}$ define la probabilidad de detectar interacciones específicas (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc), mientras que $P(\overline{AB}) \equiv (1 - P(AB))$ indica la probabilidad de corresponder a una interacción no-específica (Thy-1-Fc/otras proteínas o Thy-1-Fc/superficie de la esfera).

Usando el teorema de Bayes (Bois, 2013), es posible obtener ecuaciones útiles para $P(AB|F)$ y $P(\overline{AB}|F)$:

$$P(AB|F) = P(F|AB)\frac{P(AB)}{P(F)} \qquad \text{Ecuación [4]}$$

$$P(\overline{AB}|F) = P(F|\overline{AB})\frac{P(\overline{AB})}{P(F)} \qquad \text{Ecuación [5]}$$

En estas ecuaciones, $P(AB|F)$ y $P(\overline{AB}|F)$ corresponden a las probabilidades de encontrar interacciones entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc u otras proteínas, dado que la fuerza de ruptura

está entre $F + dF$. Estas tres relaciones (Ecuaciones 3, 4 y 5) nos permitieron obtener los eventos de interacción específicos entre Thy-1 y la integrina αvβ3, midiendo las interacciones no-específicas (Thy-1-Fc/sobrenadante control) y las interacciones mezcladas (Thy-1-Fc/sobrenadante que contiene αvβ3-Fc).

En términos prácticos, si definimos como $h(F) \equiv P(F)$ a las fuerzas de ruptura para las interacciones mezcladas (Thy-1-Fc/sobrenadante que contiene αvβ3-Fc, donde interacciones específicas y no-específicas son detectadas); $f(F) \equiv P(F|AB)$ a las fuerzas de ruptura para la interacción específica entre Thy-1-Fc/αvβ3-Fc; $g(F) \equiv P(F|\overline{AB})$ a las fuerzas de ruptura para las interacción entre Thy-1-Fc y el sobrenadante de células transfectadas con el vector vacio (sin αvβ3-Fc); y $\alpha \equiv P(AB)$ como el parámetro de mezcla que define la probabilidad de detectar interacciones específicas (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc), las ecuaciones son:

$$\mathrm{h(F)} = \alpha \mathrm{f(F)} + (1-\alpha)\mathrm{g(F)} \qquad \text{Ecuación [6]}$$

$$\mathrm{P(AB|F)} = \alpha \frac{\mathrm{f(F)}}{\mathrm{h(F)}} \qquad \text{Ecuación [7]}$$

$$\mathrm{P(\overline{AB}|F)} = (1-\alpha)\frac{\mathrm{f(F)}}{\mathrm{h(F)}} \qquad \text{Ecuación [8]}$$

Estas expresiones matemáticas representan un método directo para obtener las interacciones específicas entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc en su estado no-purificado, utilizando los datos de fuerza de ruptura para las condiciones entre Thy-1-Fc/sobrenadante que contiene αvβ3-Fc (eventos de unión específicos y no-específicos) y entre Thy-1-Fc/sobrenadante control (eventos de unión no-específicos). Estas ecuaciones son derivadas de reglas básicas de la estadística y corresponden a una representación válida debido a que las interacciones no-específicas se comportan de manera similar en presencia o ausencia de la integrina αvβ3-Fc. Este supuesto es razonable ya que la integrina αvβ3-Fc no debería modular significativamente la expresión de otras moléculas presentes en el sobrenadante, que son responsables de las interacciones no-específicas.

21.2. Procedimiento para aplicar las ecuaciones

Las fuerzas de ruptura obtenidas para cada condición estudiada fueron ordenadas de menor a mayor. Asumamos que $X = (X_1, X_2, \dots, X_n)$ corresponde al vector ordenado de las

fuerzas de ruptura X_i de la interacción Thy-1-Fc/$(AB\ \&\ \overline{AB})$ (*i.e.* Thy-1-Fc/sobrenadante que contiene αvβ3-Fc), e $Y = (Y_1, Y_2, \dots, Y_m)$ el vector ordenado de las fuerzas de ruptura Y_j para la interacción Thy-1-Fc/$(\overline{AB})$ (*i.e.* Thy-1-Fc/sobrenadante de células transfectadas con vector vacio). Donde existen n y m datos totales para las respectivas interacciones e índices $i = 1,2, \dots n$, y $j = 1,2, \dots m$. Los vectores fueron ordenados de menor a mayor como $X_i \leq X_{i+1}$ y $Y_i \leq Y_{i+1}$.

La siguiente función que describe la distribución experimental (Ex) acumulativa fue construida:

$$H_{Ex}(F) = \int_0^F h_{Ex}(\emptyset)d\emptyset = \alpha \int_0^F f_{Ex}(\emptyset)d\emptyset + (1-\alpha)G_{Ex};$$
$$G_{Ex}(F) = \int_0^F g_{Ex}(\emptyset)d\emptyset$$

Como estamos trabajando con un número discreto de fuerzas de ruptura, se obtuvo un número discreto de datos, dados por:

$$H_{Ex}(X_i) = \frac{i}{n}$$
$$G_{Ex}(Y_j) = \frac{j}{m}$$

$\mathrm{G_{Fit}(F)}$ se obtuvo mediante el ajuste a través de mínimos cuadrados de una función error $1 - \mathrm{e}^{(-\mathrm{a1}*\mathrm{x}^{\mathrm{b1}})}$ a los datos $\mathrm{G_{Ex}(F)}$, Una función fenomenológica que encontramos se ajustó a los datos adecuadamente.

$H_{Fit}(F)$ se obtuvo mediante el ajuste a través de mínimos cuadrados de una función $\alpha * \left(1 - e^{(-a2*x^{b2})}\right) + (1-\alpha) * G_{Fit}$ a los datos $H_{Ex}(F)$.
Los histogramas correspondientes a $g_{Fit}(F)$ y $f_{Fit}(F)$ se obtuvieron utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{d}{dF}\left(H_{Fit}(F)\right) = h_{Fit}(F) = \alpha f_{Fit}(F) + (1-\alpha)g_{Fit}(F)$$

Finalmente, para obtener los histogramas correspondientes a las contribuciones independientes (*i.e.* interacciones específicas Thy-1-Fc/αvβ3-Fc y no-específicas Thy-1-Fc/otras proteínas o superficie de las esferas), los números de cuentas para cada dato de fuerza de ruptura (veces que se repitió cada valor de fuerza de ruptura) debió ser pesado por la probabilidad de corresponder a cada tipo de interacción. Por ejemplo, para obtener el histograma de fuerzas de ruptura representativo de las fuerzas requeridas para disociar la interacción específica entre Thy-1-Fc/ (AB) (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc): asumamos que el histograma tiene un número N de bins (barras), y los extremos están dados por $\mathrm{E_k} = \mathrm{F_0} + (\mathrm{k}-1)\Delta\mathrm{F}$; y el número de cuentas en el k-ésimo bin es $\mathrm{C_k}$, que va a estar dado por:

$$C_k = W_i(X_i) \sum_{E_k < X_i \leq E_{k+1}} W_i\,(X_i)$$

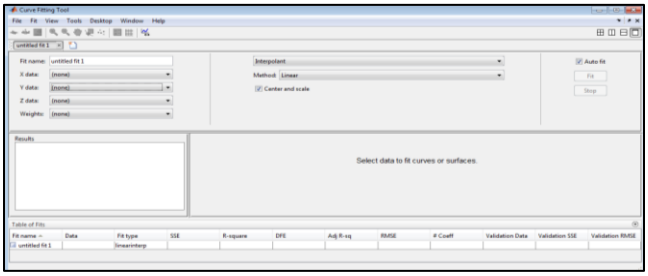
Aquí $W_i(X_i)$ es la probabilidad de la interacción Thy-1-Fc/(AB), dado que la fuerza de ruptura es X_i, $W_i \equiv P(AB|X_i)$. Recordando la ecuación [7]; $W_i \equiv \alpha \frac{f_{Fit}(X_i)}{h_{Fit}(X_i)}$, donde α es el parámetro de mezcla. EL histograma resultante no estará normalizado; sin embargo, este puede ser corregido multiplicando C_k por el factor de escalamiento $(\sum C_k \Delta F)^{-1}$.

21.3. Procedimiento para filtrar las fuerzas de ruptura con programa Matlab

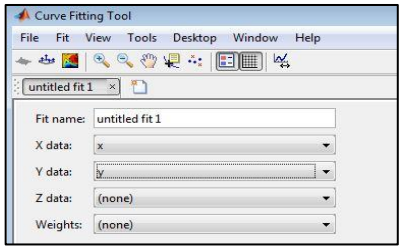
Para esto se requiere el programa Matlab (*e.g.* MATLAB R2012a), los datos de fuerza de ruptura para la condición experimental, donde las fuerzas de ruptura específicas y no-específicas son detectadas (Thy-1-Fc/sobrenadante que contiene la proteína αvβ3-Fc) y la condición control donde solo las interacciones no-específicas son detectadas (Thy-1-Fc/sobrenadante control), y los programas desarrollados para utilizar en Matlab que permiten restar las fuerzas de ruptura automáticamente (ProtocolSubtraction; GetC; Histwc; MakeHist). Estos programas fueron desarrollados por la Dra. Nathalie Casanova-Morales (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile) y se pueden descargar desde el siguiente enlace: http://www.aqll-lab.cl/wp-content/uploads/2017/01/Protocol-Subtraction.zip.

Procedimiento:

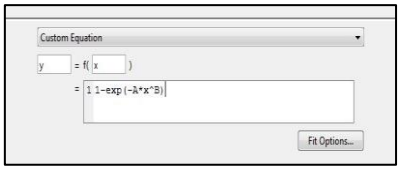
- Abrir programa Matlab, entrar a la carpeta donde están las funciones guardadas y abrir la función "ProtocolSubtraction".
- Cargar los datos de fuerza de ruptura obtenidos para la condición control usando corchetes [ ], y presionar "enter". Hacer lo mismo con los datos de fuerza obtenidos para la condición experimental.
- Una ventana denominada "cftool" deberá aparecer.



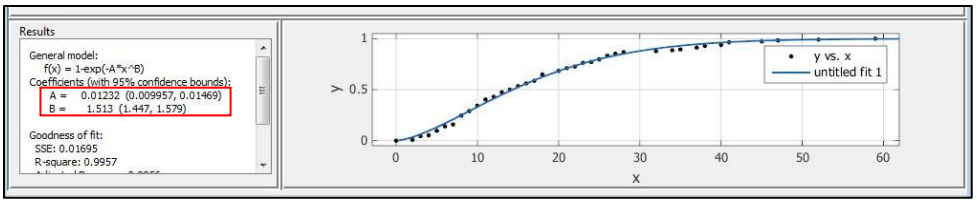
- Para encontrar la línea de tendencia del acumulado de las fuerzas de ruptura de la condición control, en la variable X elegir x, y en la variable Y elegir y.



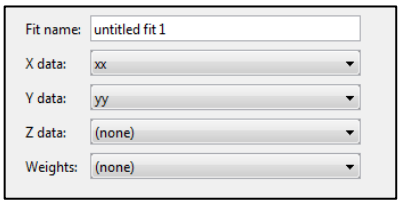
- En "Custom Equation", se debe ingresar la siguiente ecuación de tendencia: 1-exp(-A*x^B). Copiarla y pegar directamente.



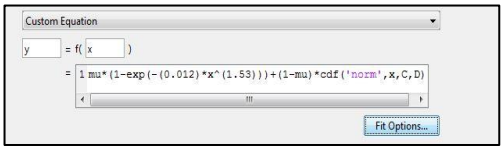
- Recuperar los valores de las Variable A y B. Estos valores serán utilizados en los siguientes pasos (A= 0,012; B= 1,51). Cerrar la función "cftool".



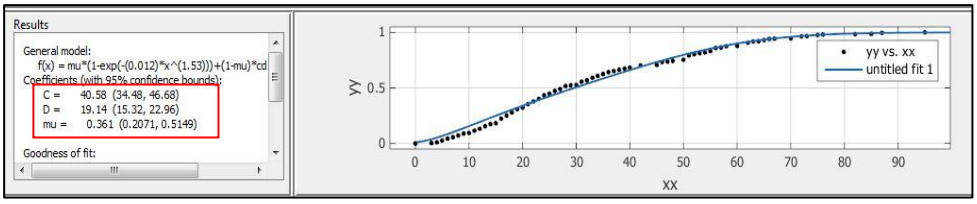
- En la ventana de Matlab, se deben ingresar los valores de las variables A y B.
- La aplicación "cftool" aparecerá nuevamente, y para encontrar la línea de tendencia del acumulado de las fuerzas de ruptura de la condición experimental, en la variable X elegir xx y en la variable Y elegir yy.



- En "Custom Equation", la ecuación de tendencia debe ser: mu*(1-exp(-(A)*x^(B)))+(1-mu)*cdf('norm',x,C,D). Copiarla y pegar directamente.



- Remplazar los valores de A y B obtenidos anteriormente en la ecuación mu*(1-exp(-(0,012)*x^(1,51)))+(1-mu)*cdf('norm',x,C,D).
- En "Fit Options", modifique los límites de C y D a valores entre 0-100, y para mu entre 0-1.
- Guardar los valores de C, D y mu.



- En la ventana de Matlab, se deberán ingresar los valores de las variables C, D y mu.
- Finalmente, dos histogramas aparecerán. Uno contendrá las fuerzas de ruptura de la condición experimental con las interacciones específicas y no-específicas, y un segundo histograma que contendrá que sólo contendrá las fuerzas de ruptura asociadas a las interacciones específicas (*i.e.* donde las fuerzas de ruptura producto de interacciones no-específicas ya fueron restadas).

22. Análisis estadístico

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces por separado. Los datos se presentaron como promedio ± SEM. En el caso que los experimentos se hayan repetido 2 veces, los datos se presentan como promedio ± DS. La significancia estadística fue determinada utilizando el test no-paramétrico Mann-Whitney U y Kruskal-Wallis para comparaciones de dos grupos. Para el análisis de los datos, un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Objetivo Específico I (O.E. I)

Determinar si síndecan-4 está implicado en la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales mediada por la interacción $\alpha v\beta 3$ integrina/Thy-1 en la línea celular tipo-neuronas CAD.

O.E. I (1) Participación de síndecan-4 - expresado en la línea celular de astrocitos DITNC1 - en la inhibición del crecimiento de neuritas en células CAD.

O.E. I (1.1) Pre-tratamiento de astrocitos DITNC1 con Heparitinasa

Estudios previos determinaron que Thy-1 posee un dominio putativo de unión a heparina en su secuencia aminoacídica que podría potencialmente reconocer proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (Avalos *y cols.*, 2009). Para evaluar la participación del HSPG astrocítico, síndecan-4, en la inhibición de crecimiento de neuritas inducido por la integrina $\alpha v\beta 3$, se ensayó la participación de las cadenas de heparán sulfato presentes en la superficie de los astrocitos, sembrando e induciendo la extensión de neuritas de células CAD (diferenciación morfológica inducida por privación de suero) sobre una monocapa de astrocitos DITNC1 previamente incubados con Heparitinasa III (Hasa III) y fijados. Hasa III es una enzima que cataliza la escisión de las cadenas de heparán sulfato (Levy-Adam *y cols.*, 2008). La fijación de los astrocitos permite caracterizar el efecto de las proteínas expresadas en la superficie celular y descarta la participación de proteínas secretadas al medio extracelular, además evita la multimerización de la integrina $\alpha v\beta 3$ y la consecuente respuesta celular de los astrocitos. Como se muestra en la **Figura 7A**, la extensión de las neuritas de células CAD sembradas directamente sobre una placa (CAD/Placa) se vio ampliamente inhibida cuando las células tipo-neuronas fueron sembradas sobre una monocapa de astrocitos DITNC1 (CAD/DITNC1), observando una reducción en el largo de los procesos neuronales. En contraste, las microfotografías muestran que las células CAD lograron extender neuritas más largas cuando se sembraron sobre los astrocitos DITNC1 previamente tratados con Hasa III (CAD/DITNC1 + Hasa III), efecto que se vio intensificado cuando los astrocitos se incubaron con anticuerpos contra el dominio extracelular de la integrina $\beta 3$ (CAD/DITNC1 + Hasa III + anti-$\beta 3$). La cuantificación del largo de las neuritas de las diferentes condiciones experimentales estudiadas indican que

al co-cultivar células CAD sobre astrocitos DITNC1 se redujo el largo de las neuritas (~20 µm) en comparación a las células CAD sembradas directamente sobre la placa (~62 µm) (**Figura 7B**). Al incubar previamente los astrocitos con Hasa III, se observó un aumento en la extensión de los procesos neuronales, llegando a un largo de ~35 µm. Efecto similar se observó cuando la monocapa de DITNC1 fue pre-incubada con anticuerpos contra la integrina β3. Interesantemente, cuando tratamos los astrocitos previamente con Hasa III y anti-β3, el largo de las neuritas incrementó en aproximadamente un 50% en comparación a las células CAD sembradas sobre astrocitos sin tratamiento, cuantificándose un largo de neuritas de ~52 µm (**Figura 7B**). De manera adicional a la cuantificación del largo de los procesos neuronales, se caracterizó la diferenciación morfológica de las células CAD, que se define por la presencia de al menos una neurita con un largo mayor o igual a 15 µm (Herrera-Molina *y cols*., 2012). Cuando las células CAD se sembraron sobre la placa, ~80% de éstas lograron diferenciarse (**Figura 7C**), en contraste al ~19% de células diferenciadas observadas en la condición de co-cultivo sobre astrocitos DITNC1. Sin embargo, el porcentaje de células diferenciadas se incrementó luego del pre-tratamiento de los astrocitos con Hasa III (~50%). Como se esperaba, este efecto fue incrementado cuando también la integrina β3 fue bloqueada (~62%). Adicionalmente, se cuantificó el número de varicosidades en los procesos neuronales de células CAD como otro criterio de diferenciación y maduración (Qi *y cols.*, 1997) (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). Interesantemente, el pre-tratamiento con Hasa III también previno la reducción en el número de varicosidades inducido por la monocapa de astrocitos DITNC1 (**Figura 7D**). Estos resultados indican que la unión de Thy-1 neuronal a sus ligandos astrocíticos, inhibe el crecimiento de las neuritas, así como también impide diferenciación morfológica y maduración de las células CAD, efectos que son prevenidos al bloquear la integrina αvβ3 y los proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie de los astrocitos DITNC1.

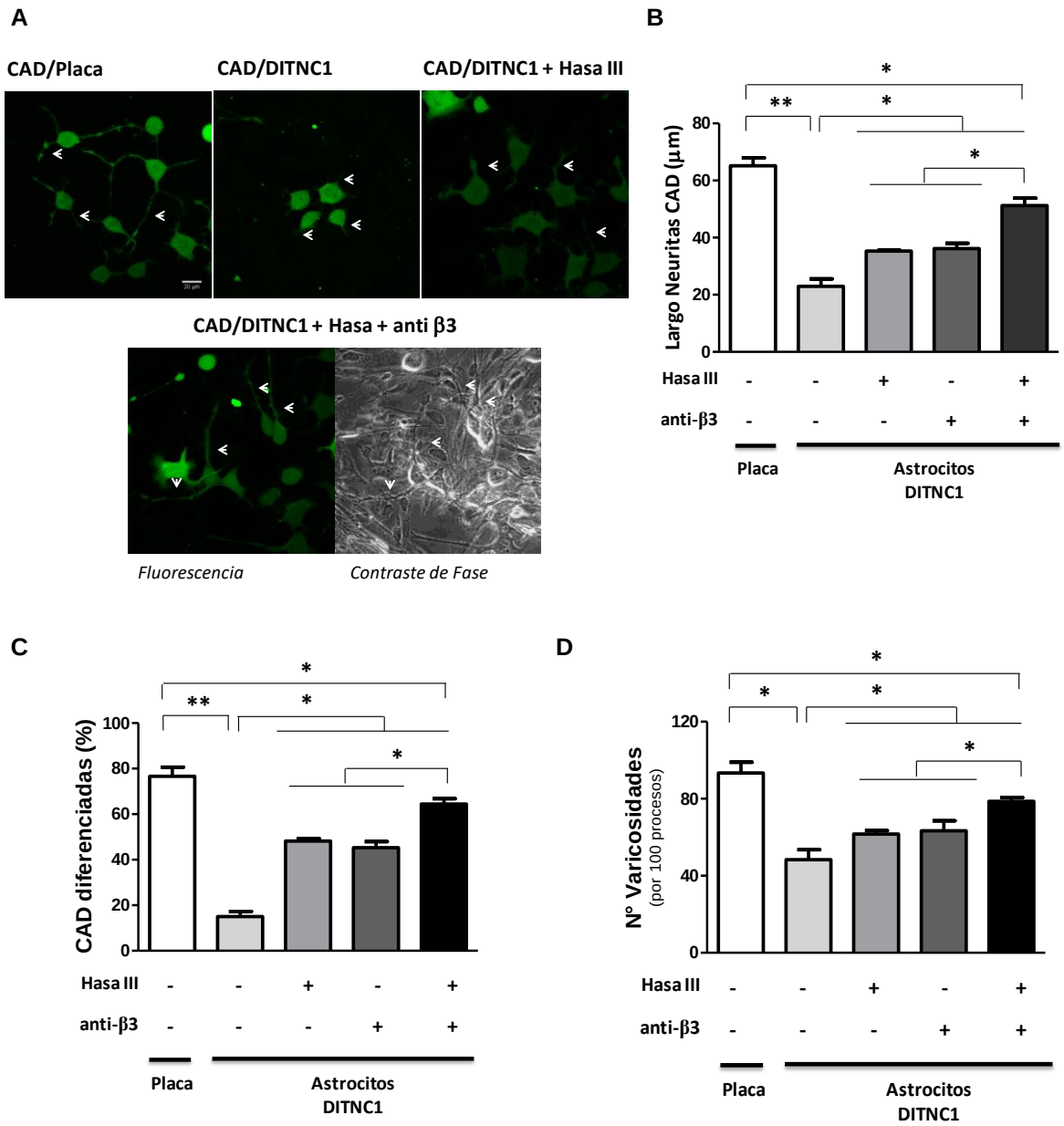


Figura 7. Efecto del pre-tratamiento con heparitinasa III sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD co-cultivadas sobre astrocitos DITNC1. Células CAD (5.000 células/cm^2) marcadas con Cell Tracker Green CMFDA (10 µM) fueron sembradas sobre la placa o sobre una monocapa de DITNC1 pre-incubados con Hasa III (0,5 mU) por 3 horas a 37°C en un medio libre de suero. Para bloquear la integrina $\alpha v\beta 3$, la monocapa de astrocitos fijada fue incubada adicionalmente con anticuerpos anti-β3 (5 µg/ml) por 1 hora a 37°C. La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero por 24 horas a 37°C. **(A)** Microfotografías representativas de las condiciones experimentales obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i 60X. Barra 20 µm **(B)** Cuantificación del largo de las neuritas (µm). **(C)** Porcentaje de células CAD diferenciadas morfológicamente con procesos ≥ 15 µm. **(D)** Número de varicosidades por 100 procesos. Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Flechas blancas en (A) indican neuritas extendidas sobre placa de cultivo o astrocitos DITNC1. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05; **p<0,01).

O.E. I (1.2) Pre-tratamiento de células CAD con Heparina

Considerando que Thy-1 interacciona directamente con glicosaminoglicanos sulfatados, como la heparina (Hep) (Avalos *y cols.*, 2009; Hueber *y cols.*, 1992), como segunda estrategia para estudiar la participación de los HSPG astrocíticos en la inhibición de la extensión de neuritas de células CAD, se pre-incubó las células CAD con Hep. En esta condición, la Hep competirá con las cadenas de heparán sulfato de la superficie de los astrocitos por el dominio de unión a Hep presente en la secuencia aminoacídica de Thy-1. En la **Figura 8A** podemos ver que la extensión de las neuritas es inhibida cuando las células CAD fueron sembradas sobre la monocapa de astrocitos, en comparación a la condición control donde células CAD pre-incubadas con Hep fueron sembradas directamente sobre la placa de cultivo (CAD+Hep/Plate). En contraste, se observó un crecimiento de los procesos neuronales cuando las células CAD fueron pre-incubadas con Hep (CAD + Hep/DITNC1), efecto potenciado por la adición de anticuerpos anti-β3 que bloquean la integrina β3 astrocítica (CAD + Hep/DITNC1 + anti-β3) (**Figure 8A**). La cuantificación del largo de las neuritas corroboró los resultados descritos previamente (**Figura 8B**). Los resultados obtenidos con los tratamientos con Hasa III y Hep sugieren que los HSPG astrocíticos participan en la inhibición de la extensión de las neuritas de células CAD mediada por Thy-1.

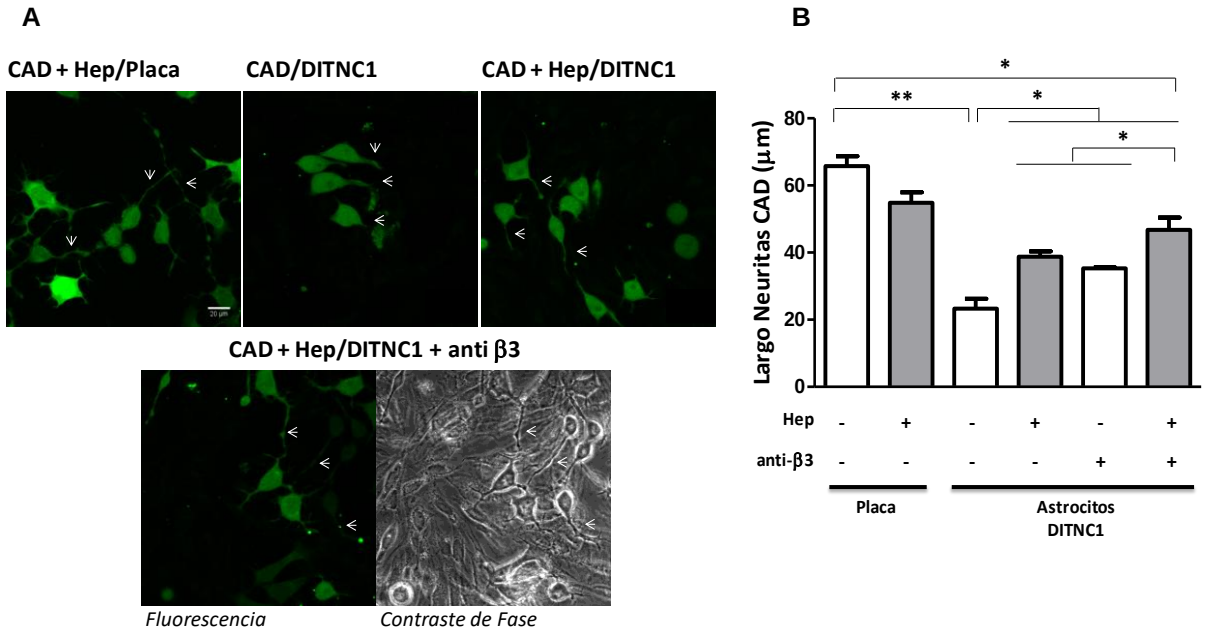


Figura 8. Efecto del pre-tratamiento con Heparina sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD co-cultivadas sobre astrocitos DITNC1. Células CAD (5.000 células/cm^2) marcadas con Cell Tracker Green CMFDA (10 µM) fueron pre-incubadas con heparina (400 µg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente y sembradas sobre la placa o sobre una monocapa de DITNC1 fijados. Para bloquear la integrina $\alpha v\beta 3$, la monocapa de astrocitos fijada fue incubada adicionalmente con anticuerpos anti-$\beta 3$ (5 µg/ml) por 1 hora a 37°C. La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero por 24 horas a 37°C. **(A)** Imágenes representativas de las condiciones experimentales obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i 60X. Barra 20 µm **(B)** Cuantificación del largo de las neuritas (µm). Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Flechas blancas en (A) indican neuritas extendidas sobre placa de cultivo o astrocitos DITNC1. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05; ** p<0,01).

O.E. I (1.3) Silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos DITNC1

Los resultados mostrados en las Figuras 7 y 8 sugieren la participación de los proteoglicanos de heparán sulfato de los astrocitos en la inhibición del crecimiento de las neuritas de células CAD; sin embargo, la participación particular de síndecan-4 en la respuesta neuronal requiere un análisis más específico. Para esto, se propuso silenciar los niveles endógenos de síndecan-4 en astrocitos DITNC1 usando "small interference RNA" (siRNA). El silenciamiento se realizó co-transfectando la línea celular DITNC1 con un plasmidio que codifica para la proteína fluorescente verde (pEGFP) y dos siRNA contra los exones 3 y 4 del mRNA de síndecan-4 (Avalos *y cols.*, 2009). Los niveles proteicos de síndecan-4 fueron detectados mediante Western blot de los lisados de las células DITNC1 co-transfectadas, y tratadas previamente con Hasa III. En la **Figuras 9A** podemos observar que la transfección con siRNA contra síndecan-4 (siSDC4) redujo en aproximadamente un 50% los niveles proteicos endógenos del proteoglicano, en comparación a las células no transfectadas (NT) o transfectadas con un siRNA control (siCTRL). Como control se evaluó los niveles proteicos de otros sindecanos presentes en la superficie de los astrocitos. No se observó cambios en los niveles de síndecan-1 y síndecan-2 luego de la transfección con siSDC4 en las células DITNC1 (**Figura 9B**). Con el objetivo de descartar un efecto secundario sobre los niveles de la integrina $\alpha v\beta 3$ producto de la transfección con siRNA contra síndecan-4, se estudió mediante ensayos de Western blot los niveles proteicos de la integrina $\beta 3$. Como se observa en la **Figura 9C**, el tratamiento de los astrocitos DITNC1 con siCTRL o siSDC4 no condujo a cambios significativos de los niveles la integrina $\beta 3$ y por tanto, del heterodímero $\alpha v\beta 3$.

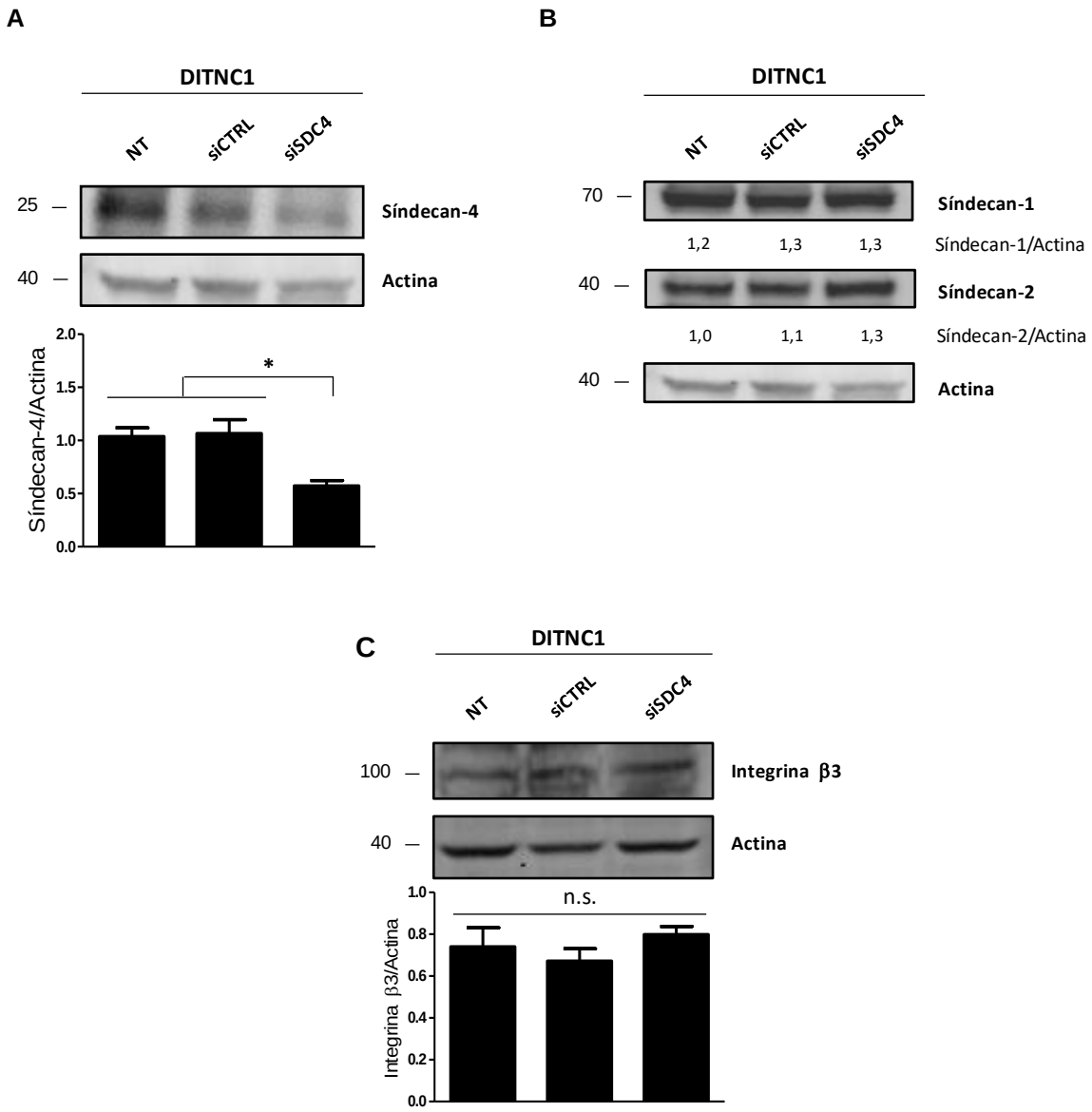


Figura 9. Niveles proteicos de síndecan-4,-2,-1 e integrina β3 en astrocitos DITNC1 "knock down" para síndecan-4. Astrocitos DITNC1 fueron transfectados con siRNA control (siCTRL), siRNA contra síndecan-4 (siSDC4), o no transfectados (NT), sembrados (25.000 células/cm^2) y mantenidos por 48 horas a 37°C. **(A)** y **(B)** Las células fueron lisadas y los extractos proteicos incubados con Hasa III por 3 horas a 37°C. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles al 12%, para luego ser analizadas mediante Western blot con anticuerpos anti-actina o anticuerpos anti-heparán sulfato 3G10. Este último reconoce los nuevos-epítopes generados tras la digestión con Hasa III. **(C)** Las células fueron lisadas y las proteínas de los extractos fueron separadas por SDS-PAGE en geles al 10%, para luego ser analizadas mediante Western blot con anticuerpos anti-β3 o anti-actina. En todas las figuras se muestran membranas representativas de cada proteína evaluada y la cuantificación por densitometría de las bandas obtenidas normalizada por las de actina. Los resultados en (A) y (C) son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05; n.s. no significativo). En (B) la cuantificación muestra el promedio de los valores normalizados por los niveles de actina correspondiente a dos experimentos diferentes (**n=2**).

Para estudiar el requerimiento de síndecan-4 en la inhibición del crecimiento de neuritas dependiente de la interacción integrina αvβ3/Thy-1, las células CAD fueron sembradas sobre astrocitos DITNC1 transfectados con siRNA contra síndecan-4. Al sembrar células CAD sobre una monocapa de astrocitos transfectados con un siRNA control (CAD/DITNC1 siCTRL), el crecimiento de las neuritas disminuyó en comparación a la extensión observada en células CAD sembradas directamente sobre la placa (CAD/Placa), en contraste, esta reducción de las extensión de los procesos fue prevenida cuando las células CAD fueron sembradas sobre astrocitos transfectados con siRNA contra síndecan-4 (CAD/DITNC1 siSDC4) (**Figura 10A**). La cuantificación del largo de las neuritas mostró una extensión de ~60 µm en la condición control, en contraste a la condición sobre astrocitos DITNC1 transfectados con siCTRL, donde el largo de las neuritas fue de sólo ~21 µm (**Figura 10B**). Esta disminución en el largo de las neuritas se vio atenuada cuando la integrina β3 fue bloqueada (~35 µm). Un efecto similar es observado cuando las células CAD fueron sembradas sobre astrocitos transfectados con siRNA contra síndecan-4 (~37 µm). Interesantemente, cuando la integrina β3 fue bloqueada en los astrocitos con los niveles de síndecan-4 silenciados (DITNC1 siSDC4), el largo de las neuritas incrementó a ~44 µm (**Figura 10B**). Estos resultados corroboran que la inhibición del crecimiento de los procesos neuronales mediado por Thy-1 depende de la acción combinada de la integrina αvβ3 y síndecan-4.

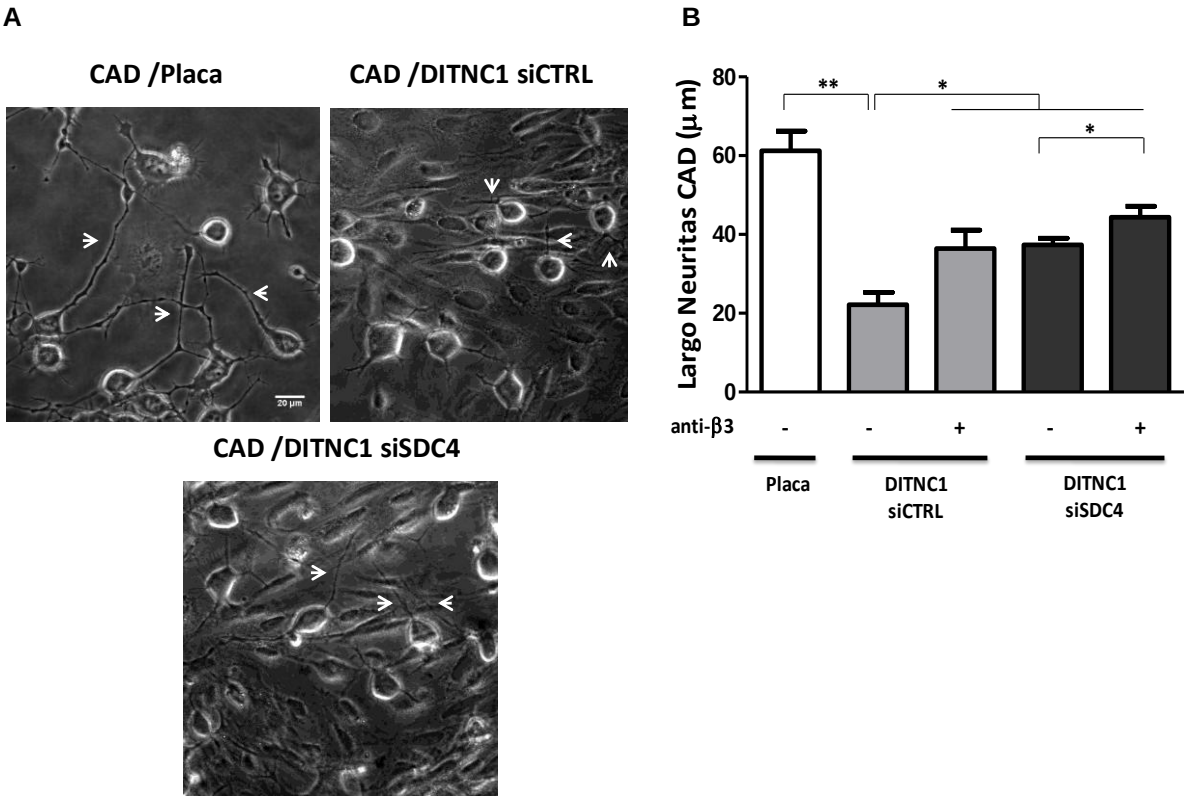


Figura 10. Efecto del silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos DITNC1 sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD. Células CAD (5.000 células/cm^2) fueron sembradas sobre la placa o sobre una monocapa de DITNC1 fijados, previamente transfectados con siRNA control (siRNA) o siRNA contra síndecan-4 (siSDC4). Para bloquear la integrina $\alpha v\beta 3$, la monocapa de astrocitos transfectados y fijados fue incubada adicionalmente con anticuerpos anti-β3 (5 µg/ml) por 1 hora a 37°C. La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero por 24 horas a 37°C. **(A)** Microfotografías representativas de las condiciones experimentales obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i. Barra 20 µm. **(B)** Cuantificación del largo de las neuritas (µm). Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Flechas blancas en (A) indican neuritas extendidas sobre placa de cultivo o astrocitos DITNC1. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05; ** p<0,01).

O.E. I (2) Participación de síndecan-4 - expresado en astrocitos primarios bajo condiciones inflamatorias - en la inhibición del crecimiento de neuritas en células CAD.

O.E. I (2.1) Caracterización astrocitos primarios bajo condiciones pro-inflamatorias

Se ha reportado que los astrocitos primarios poseen propiedades promotoras del crecimiento para la extensión de procesos neuronales (Hama *y cols.*, 2004). Concordantemente, experimentos previos realizados en nuestro laboratorio determinaron que células CAD sembradas sobre astrocitos primarios logran extender procesos neuronales de largo similar a la condición control donde las células CAD son cultivadas sobre una placa de cultivo (Tesis doctoral Herrera-Molina R.). Interesantemente, los astrocitos de individuos adultos no expresan la integrina $\alpha v\beta 3$ (Ellison *y cols.*, 1998); sin embargo, bajo condiciones patológicas asociadas a un incremento en la inflamación, los astrocitos adoptan un fenotipo reactivo y sobre-expresan la integrina $\alpha v\beta 3$ (Ellison *y cols.*, 1998) y síndecan-4 (Iseki *y cols.*, 2002; Okuyama *y cols.*, 2013). Considerando estas evidencias, se propuso estudiar la capacidad de astrocitos primarios, incubados con estímulos pro-inflamatorios, para promover la inhibición en la extensión de neuritas de células CAD, de manera dependiente de integrinas $\alpha v\beta 3$ y síndecan-4. Para esto, primero se evaluó mediante ensayos de Western blot los niveles de la integrina $\beta 3$ y síndecan-4 en astrocitos primarios tratados con TNF-α. Como se esperaba, la incubación de los astrocitos primarios con la citoquina pro-inflamatorio por 48 horas (+TNF-α), indujo un aumento en los niveles proteicos de integrina $\beta 3$ (**Figura 11A**) y síndecan-4 (**Figura 11B**), en comparación con la condición basal sin TNF-α (-TNF-α). Adicionalmente, mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se evaluó el cambio en los niveles proteicos de la integrina $\beta 3$ en la superficie celular y la proteína acídica fibrilar glial (GFAP), marcador del fenotipo reactivo de los astrocitos, en astrocitos primarios tratados con citoquinas pro-inflamatorias. Tanto el tratamiento de astrocitos primarios con TNF-α (**Figura 11C**) como con IL1β (**Figura 11D**) promovió un incremento en los niveles de la integrina $\beta 3$ y GFAP, indicando que el tratamiento con citoquinas pro-inflamatorias es efectivo en la promoción a un fenotipo reactivo de los astrocitos e incremento de los niveles proteicos de la integrina $\beta 3$ y síndecan-4.

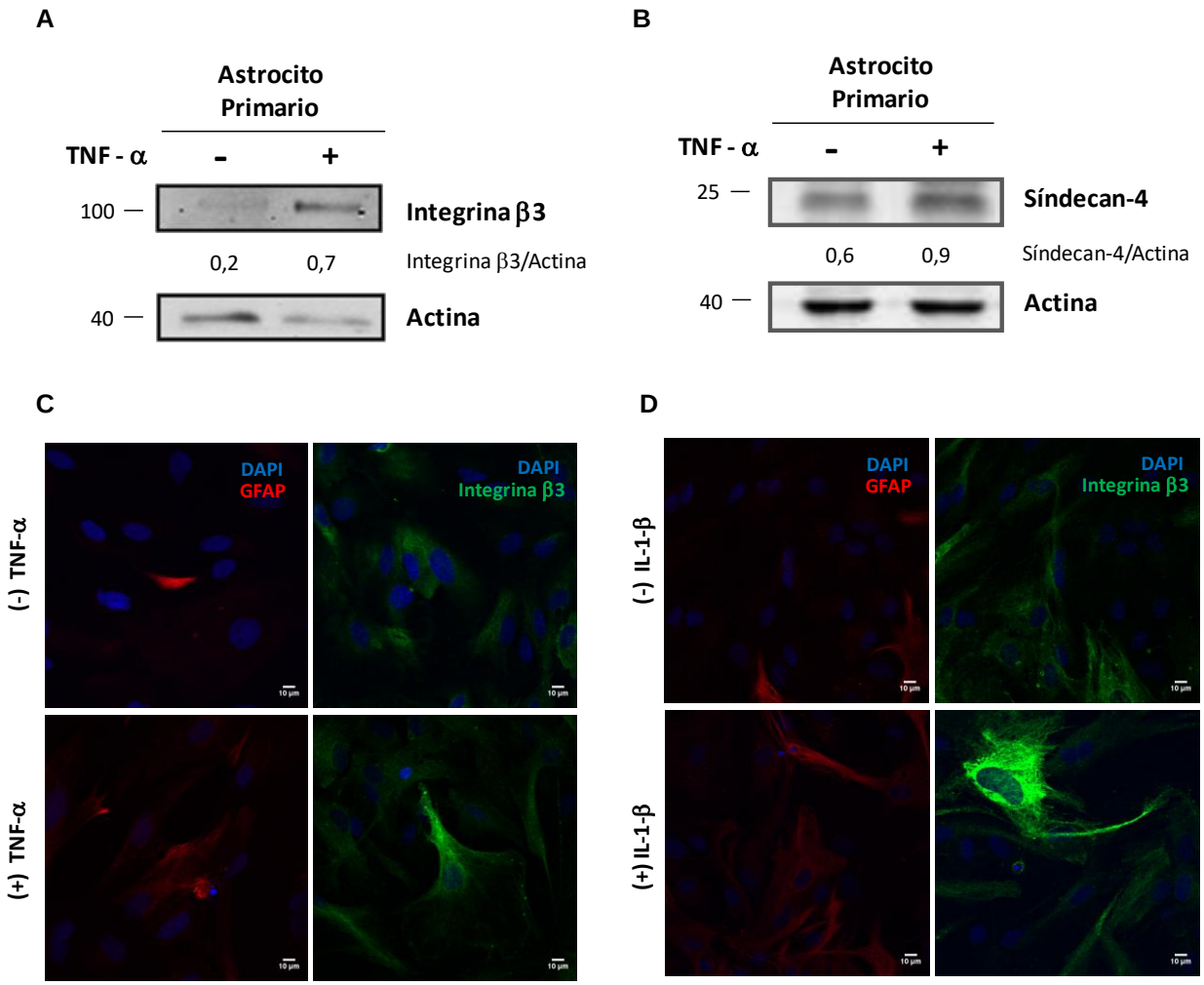


Figura 11. Niveles proteicos de síndecan-4, integrina β3 y GFAP en astrocitos primarios incubados con citoquinas pro-inflamatorias. (A) y **(B)** Cultivos de astrocitos primarios (25.000 células/cm^2) fueron pre-incubados o no con la citoquina pro-inflamatoria TNF-α (10 ng/ml) durante 48 horas a 37°C. Las células fueron lisadas y las proteínas de los extractos fueron: **(A)** separadas por SDS-PAGE en geles al 10%, para luego ser analizadas mediante Western blot con anticuerpo anti-β3 o anti-actina; **(B)** incubadas con Hasa III por 3 horas a 37°C, separadas por SDS-PAGE en geles al 12%, y analizadas mediante Western blot con anticuerpos anti-heparán sulfato 3G10 o anti-actina. En (A) y (B) se muestran imágenes representativas de los Western blot y los promedios de la cuantificación por densitometría de las bandas de la integrina β3 o síndecan-4 normalizada por las bandas de actina (**n=3**). **(C)** y **(D)** Cultivos primarios de astrocitos primarios (5.000 células/cm^2) fueron pre-incubados o no con las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α (10 ng/ml) o IL1β (20 ng/ml), durante 48 horas a 37°C. Las células fueron fijadas con paraformaldehido, lavadas y permeabilizadas con Triton-X100. El núcleo fue marcado con DAPI (azul). La integrina β3 fue detectada con el anticuerpo monoclonal anti-β3 seguido del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488 (verde). GFAP fue detectado con el anticuerpo monoclonal anti-GFAP seguido de anti-IgG de ratón Alexa Fluor 546 (rojo). Las imágenes son representativas de las condiciones estudiadas (**n=2**) y fueron obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i. Barra 10 µm.

O.E. I (2.2) Pre-tratamiento astrocitos primarios, bajo condiciones pro-inflamatorias, con Heparitinasa

Para estudiar el crecimiento de neuritas de células CAD sobre astrocitos primarios bajo condiciones pro-inflamatorias, las células tipo-neuronas fueron co-cultivadas sobre una monocapa de astrocitos primarios pre-incubados con la citoquina TNF-α, para luego inducir la extensión de las neuritas mediante depleción de suero. De la misma forma que en los ensayos de co-cultivo realizados con la línea celular de astrocitos DITNC1, se evaluó la participación de los proteoglicanos de heparán sulfato mediante el pre-tratamiento de los astrocitos primarios con Hasa III. La monocapa de astrocitos primarios tratados con TNF- α indujo una disminución en el crecimiento de los procesos neuronales en comparación a la extensión observada en células CAD sembradas directamente sobre la placa o sobre una monocapa de astrocitos primarios sin previo tratamiento con TNF- α (**Figura 12A**). Esta inhibición observada bajo condiciones pro-inflamatorias fue menos efectiva cuando los astrocitos primarios fueron pre-tratados con anticuerpos anti-β3 o Hasa. Es más, cuando ambos tratamientos fueron aplicados en conjunto (+ Hasa III + anti-β3), la extensión de las neuritas fue aún mayor (**Figura 12A**). De la misma forma que los resultados observados en las microfotografías representativas de cada condición, la cuantificación del largo de los procesos neuronales muestra que, al sembrar células CAD sobre astrocitos primarios pre-tratados con TNF-α, la extensión de las neuritas alcanza ~17 µm, en comparación a las células CAD sembradas directamente sobre la placa o sobre astrocitos primarios sin TNF-α, donde el largo llega a ~57 y ~42 µm, respectivamente (**Figura 12B**). Sin embargo, al incubar previamente los astrocitos con Hasa III, se observó un aumento en la extensión de los procesos neuronales, llegando a un largo de ~27 µm. Efecto similar observado al pre-incubar con anticuerpos contra la integrina β3 (~29 µm). Mientras que al combinar ambos pre-tratamientos, la extensión de los procesos llegó a ~40 µm (**Figura 12B**).

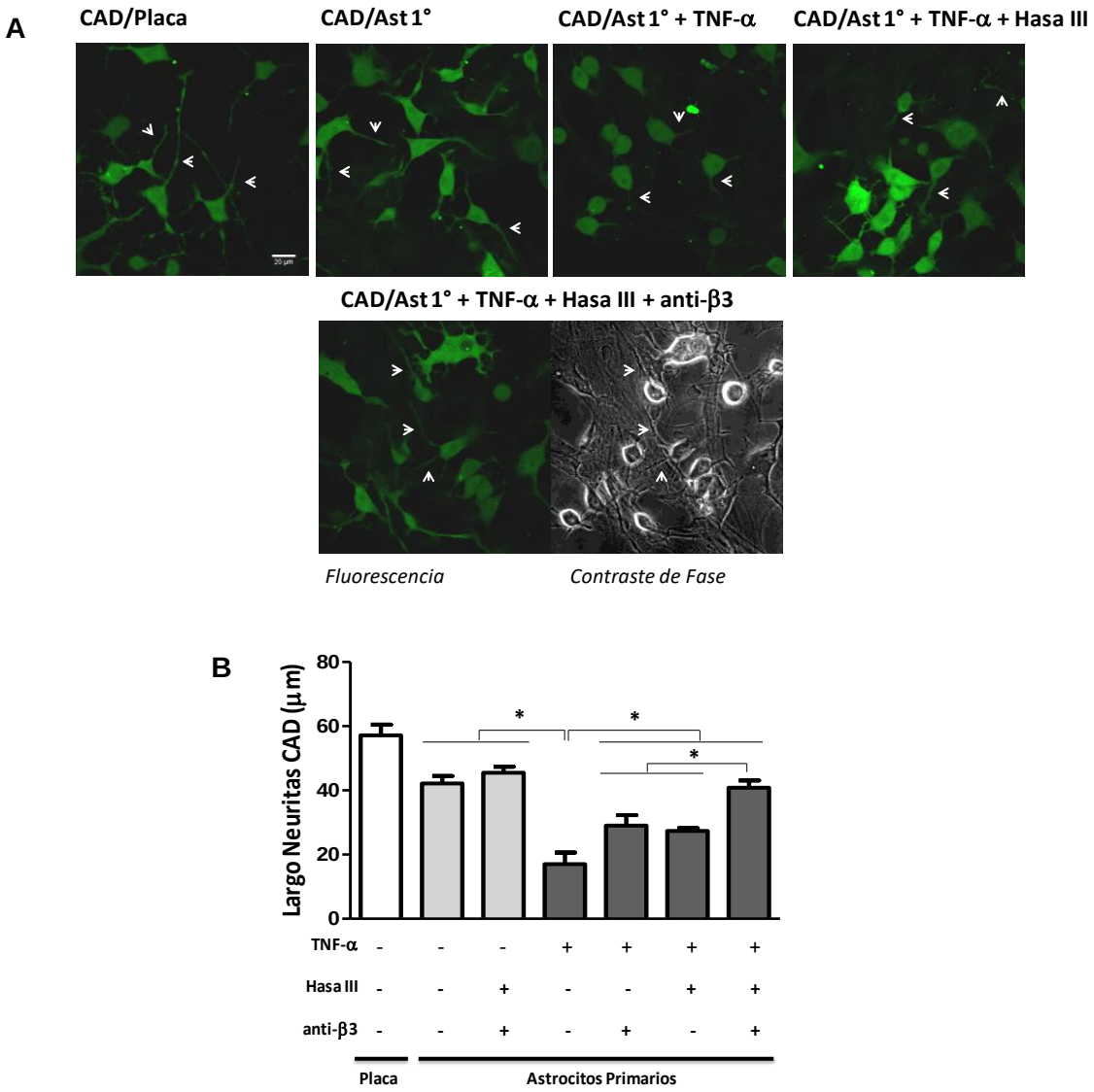


Figura 12. Efecto de astrocitos primarios incubados con citoquinas pro-inflamatorias sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD. Células CAD (5.000 células/cm^2) fueron sembradas sobre la placa o sobre una monocapa de astrocitos primarios pre-incubados o no con TNF-α (10 ng/ml) por 48 horas a 37°C. Para bloquear las cadenas de heparán sulfato y la integrina αvβ3, la monocapa de astrocitos fue incubada adicionalmente con Hasa III (0,5 mU; 3 horas a 37°C) y anticuerpos anti-β3 (5 µg/ml; 1 hora a 37°C), respectivamente. La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero por 24 horas a 37°C. **(A)** Microfotografías representativas de las condiciones experimentales obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i. Barra 20 µm. **(B)** Cuantificación del largo de las neuritas (µm). Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Flechas blancas en (A) indican neuritas extendidas sobre placa de cultivo o astrocitos primarios. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05).

O.E. I (2.3) Silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos primarios bajo condiciones pro-inflamatorias

Los resultados mostrados en la Figura 12 sugieren que los astrocitos primarios incubados con citoquinas pro-inflamatorias representan un modelo de "astrocito reactivo" que inducen una inhibición en el crecimiento de los procesos neuronales de células CAD de manera dependiente de la integrina $\alpha v\beta 3$ y las cadenas de heparán sulfato presentes en la superficie de los astrocitos. Para estudiar el papel específico del HSPG síndecan-4 en los fenómenos neuronales dependientes de Thy-1, se procedió a silenciar los niveles endógenos del proteoglicano en los astrocitos primarios, de la misma forma que fue realizado en astrocitos DITNC1. Los niveles proteicos de síndecan-4 fueron detectados a través de ensayos de Western blot en los lisados de las células transfectadas o no, tratadas previamente con Hasa III. En ausencia o presencia de TNF-α, se cuantificó una reducción en los niveles de síndecan-4 luego de la transfección con siRNA contra el proteoglicano (siSDC4), en comparación con la condición no transfectada (NT) o cuando los astrocitos fueron transfectados con un siRNA control (siCTRL) (**Figura 13**). Adicionalmente, podemos ver que los niveles absolutos de síndecan-4 son mayores en presencia de TNF-α, ya sea para los astrocitos NT, transfectados con siCTRL o con siSDC4 (**Figura 13**).

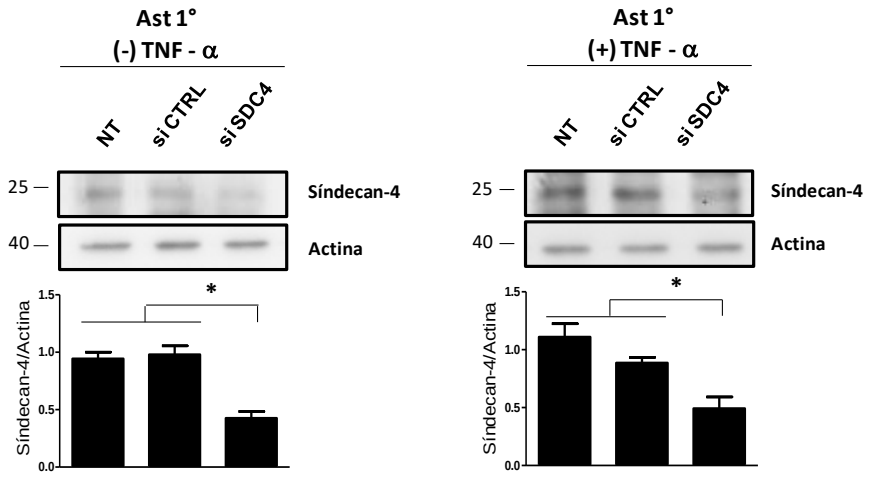


Figura 13. Niveles proteicos de síndecan-4 en astrocitos primarios *knock down* para el proteoglicano. Cultivos de astrocitos primarios (25.000 células/cm^2) no transfectados (NT), transfectados con siRNA control (siCTRL) y transfectados con siRNA contra síndecan-4, fueron incubados (+) o no (-) con la citoquina pro-inflamatoria TNF-α (10 ng/ml) durante 48 horas a 37°C. En ambos casos, las células fueron lisadas y los extractos proteicos incubados con Hasa III por 3 horas a 37°C. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles al 10%, para luego ser analizadas mediante Western blot con el anticuerpo 3G10. Imágenes representativas de los Western blot y la cuantificación por densitometría de las bandas de síndecan-4 normalizada por las de actina. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05).

Luego, se procedió a estudiar el requerimiento de síndecan-4 en la inhibición del crecimiento de neuritas dependiente de la interacción $\alpha v\beta 3$/Thy-1, realizando ensayos de co-cultivo sobre monocapa de astrocitos primarios transfectados con siRNA contra síndecan-4 y bajo condiciones pro-inflamatorias. Como se observa en las **Figuras 14**, **A** y **B**, cuando las células CAD fueron sembradas sobre astrocitos primarios transfectados con un siRNA control en ausencia de condiciones pro-inflamatorias (CAD/Ast 1° siCTRL; -TNF-α), el crecimiento de las neuritas alcanzó un largo de ~55 µm. Sin embargo, la pre-incubación con citoquinas resultó en una disminución significativa del largo de los procesos neuronales (~20 µm; CAD/Ast 1° siCTRL; +TNF-α). Esta inhibición fue parcialmente prevenida cuando la integrina $\beta 3$ fue bloqueada (~32 µm, CAD/Ast 1° siCTRL; +TNF-α + anti- $\beta 3$). Cuando las células CAD fueron sembradas sobre astrocitos con los niveles de síndecan-4 silenciados, en ausencia de condiciones pro-inflamatorias (CAD/Ast 1° siSDC4; -TNF-α), la extensión de las neuritas resultó similar a la condición control de la transfección (CAD/Ast 1° siCTRL; -TNF-α). Interesantemente, cuando estas mismas células "knock down" para síndecan-4 fueron tratados con la citoquina pro-inflamatoria, la extensión de las neuritas fue inhibida (~30 µm, CAD/Ast 1° siSDC4; +TNF-α), efecto inhibitorio menor al inducido por los astrocitos siCTRL bajo condiciones pro-inflamatorias (CAD/Ast 1° siCTRL; +TNF-α), sugiriendo la participación de síndecan-4 en la inhibición del crecimiento de neuritas promovido por los astrocitos primarios pre-tratados con TNF-α. Como lo determinado para la línea celular DITNC1 (**Figura 10**), cuando la integrina $\beta 3$ fue bloqueada en los astrocitos "knock down" para síndecan-4 bajo condiciones inflamatorias, se observó un incremento en la extensión de los procesos neuronales (~40 µm, CAD/Ast1° siSDC4; +TNF-α +anti-$\beta 3$). Estos resultados indican que bajo condiciones pro-inflamatorias, la acción combinada de la integrina $\alpha v\beta 3$ y síndecan-4, expresados en los astrocitos primarios, son suficientes para promover la inhibición del crecimiento de las neuritas en células CAD.

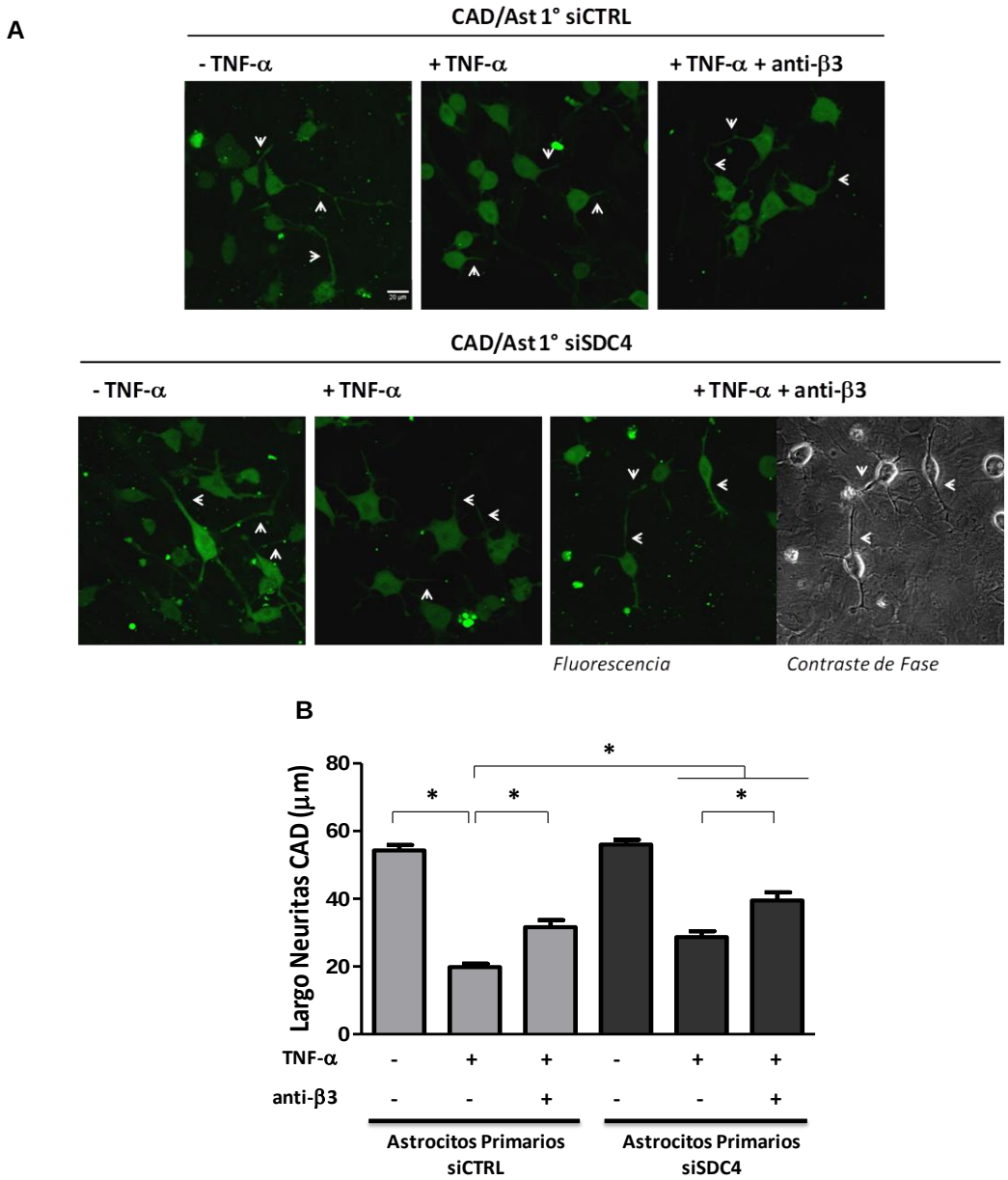


Figura 14. Efecto del silenciamiento de síndecan-4 en astrocitos primarios sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD. Células CAD (5.000 células/cm^2) fueron sembradas sobre la placa o sobre una monocapa de astrocitos primarios transfectados con siRNA control (siRNA) o con siRNA contra síndecan-4 (siSDC4), pre-incubados o no con TNF-α (10 ng/ml) por 48 horas a 37°C. Para bloquear la integrina αvβ3, la monocapa de astrocitos fue incubada con anticuerpos anti-β3 (5 µg/ml) por 1 hora a 37°C. La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero por 24 horas a 37°C. **(A)** Microfotografías representativas de las condiciones experimentales obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i. Barra 20 µm. **(B)** Cuantificación del largo de las neuritas (µm). Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Flechas blancas en (A) indican neuritas extendidas sobre placa de cultivo o astrocitos primarios. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05).

O.E. I (3) Participación de síndecan-4 - como proteína de fusión - en la inhibición del crecimiento de neuritas en células CAD.

Experimentos donde células CAD fueron diferenciadas morfológicamente en placas de cultivo pre-cubiertas con la proteína de fusión αvβ3-Fc mostraron que αvβ3-Fc es suficiente para restringir el crecimiento de los procesos neuronales de células CAD en proceso de diferenciación, en comparación a las células sembradas sobre placas de cultivo sin ningún tratamiento previo (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). Considerando los resultados obtenidos en esta tesis, donde se involucra a síndecan-4 de la superficie de astrocitos DITNC1 y astrocitos primarios bajo condiciones pro-inflamatorias, en la inhibición de la extensión de las neuritas mediada por la interacción de la integrina αvβ3 astrocítica y Thy-1 neuronal, se propuso evaluar el crecimiento de las neuritas de células CAD en proceso de diferenciación morfológica sobre placas de cultivos pre-tratadas con las proteínas de fusión de ambas moléculas astrocíticas, αvβ3-Fc y síndecan-4-Fc.

O.E. I (3.1) Caracterización proteína de fusión de síndecan-4 (síndecan-4-Fc)

Previo a esto, fue necesario caracterizar la proteína de fusión de síndecan-4, la cual está conformada por el dominio extracelular de síndecan-4 humano fusionado a la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1 (**Figura 15A**). La producción de esta proteína es a través de la transfección de células HEK293T con el plasmidio de expresión de síndecan-4-Fc (ver Materiales y Métodos, **Figura 15A**). Luego de la transfección, la proteína de fusión es liberada al sobrenadante celular, por lo que la detección de síndecan-4-Fc se realizó en el sobrenadante, mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra síndecan-4 y la porción Fc, previa precipitación de la proteína de fusión con esferas de sefarosa recubiertas con proteína A. Como podemos ver en la **Figura 15B**, síndecan-4-Fc fue detectado sólo en el sobrenadante de células transfectadas a un peso molecular de ~55 kDa, específicamente luego de ser precipitada. Adicionalmente, se caracterizó el peso molecular de la proteína por espectrometría de masa (Maldi-Tof-Tof). Concordantemente a lo obtenido con el análisis de Western blot, la masa del monómero de síndecan-4-Fc corresponde a ~56,8 kDa (**Figura Suplementaria 1, ver página 115**). De manera adicional a la detección de la proteína de fusión en el sobrenadante, se caracterizó la presencia de las cadenas de heparán sulfato en ésta, que de acuerdo a la literatura, corresponden a las estructura de la proteína involucradas en la interacción con

su respectivo ligando (Bass y Humphries, 2002). Para esto, también se desarrolló un ensayo de Western blot de la proteína de fusión pre-incubada con Hasa III, utilizando anticuerpos contra síndecan-4 o anticuerpos que reconocen el sitio resultante luego del corte realizado por Hasa III (anti-HS 3G10), hipotetizando que en presencia de la enzima, las cadenas de heparán sulfato serían eliminadas y de esta forma, el peso de la proteína disminuiría. Para realizar este análisis, el sobrenadante de las células transfectadas fue incubado con la proteína A-sefarosa, para luego de la centrifugación, incubar tanto el precipitado (pp: complejo síndecan-4-Fc-proteína A-sefarosa) como el sobrenadante depletado (dep: sobrenadante sin síndecan-4-Fc) con la enzima Hasa III. Adicionalmente, el sobrenadante sin incubar con la proteína A-sefarosa (completo) también fue incubado con la enzima. Podemos observar que todas las muestras pre-incubadas con Hasa III fueron detectadas a un peso menor que en la condición sin la enzima (**Figura 15C**). Estudios han reportado que el factor de crecimiento de fibroblastos interacciona con las cadena de heparán sulfato del proteoglicano síndecan-4 (Allen *y cols.*, 2001; Horowitz *y cols.*, 2002). Considerando lo anterior, se estableció como segunda estrategia para evaluar la presencia de las cadenas de HS en síndecan-4-Fc, y adicionalmente corroborar su funcionalidad, el desarrollo de un ensayo de ELISA para demostrar la unión de síndecan-4-Fc al factor de crecimiento FGF humano. Como control negativo, FGF fue incubado con la proteína de fusión del receptor del ligando soluble inductor de apoptosis, TRAIL (TRAIL-R2-Fc) (Schneider, 2000). En la **Figura 15D** podemos ver un aumento en la oxidación del sustrato cromogénico TMB cuando el sobrenadante que contiene la proteína de fusión síndecan-4-Fc fue incubado con el factor de crecimiento, en comparación a las otras condiciones controles de interacción. Los resultados obtenidos con ambas estrategias indican que la proteína de fusión síndecan-4-Fc contiene cadenas de heparán sulfato funcionales.

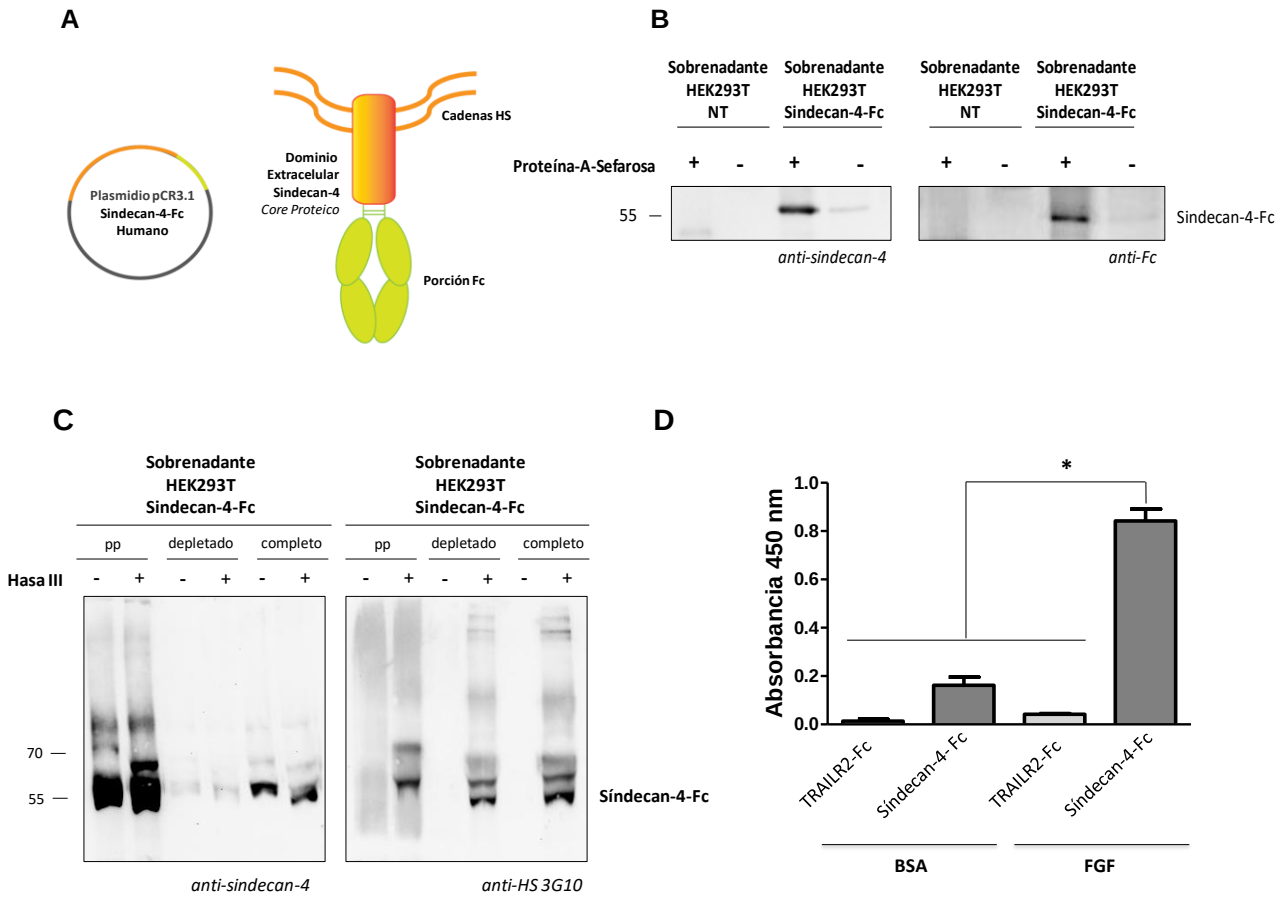


Figura 15. Detección y caracterización de la proteína de fusión síndecan-4-Fc. (A) Representación esquemática del plasmidio de expresión de síndecan-4-Fc y de la proteína de fusión. Células HEK293T (50.000 células/cm^2) fueron transfectadas o no (NT) con el plasmidio que contiene la secuencia génica de la proteína de fusión síndecan-4-Fc. **(B)** El sobrenadante celular libre de suero fue recolectado después de 48 horas, y 500 µl de este sobrenadante fue incubado (+) o no (-) con un exceso de proteína A-Sefarosa (50 µl) por 1 hora a 4°C y centrifugado. El precipitado obtenido tras la centrifugación, y el sobrenadante celular no incubado con la proteína A-Sefarosa fueron incubados con buffer de carga Laemmli, hervidos y cargados en un gel SDS-PAGE al 10%. El análisis de Western blot fue realizado con anticuerpos contra síndecan-4 (anti-síndecan-4) o contra la porción Fc de la IgG humana (anti-Fc). **(C)** Tras la incubación del sobrenadante celular con la proteína A-Sefarosa y posterior centrifugación, se obtuvo el precipitado (pp) y el sobrenadante depletado de la proteína de fusión (depletado). Ambas muestras, en adición al sobrenadante celular no incubado con la proteína A-Sefarosa (completo), fueron tratados (+) o no (-) con Hasa III (0,3 mU) por 3 horas a 37°C. Todas las muestras fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10% y analizados por Western blot con anticuerpos contra síndecan-4 (anti-síndecan-4) o anticuerpos que reconocen el sitio resultante luego del corte realizado por Hasa III (anti-HS 3G10). En (B) y (C) se muestran imágenes representativas de los Western blot de tres experimentos diferentes (**n=3**). **(D)** Ensayo de ELISA. Placa de 96 pocillos cubierta con el factor de crecimiento de fibroblastos humano (FGF; 1 µg/ml) y la albúmina de suero bovino (BSA; 1 µg/ml) se incubó con el sobrenadante que contiene síndecan-4-Fc (200 µl/pocillo) o TRAIL-R2-Fc (1 µg/ml). La detección de la interacción fue realizada con anticuerpos anti-Fc-conjugado a HRP. La presencia de HRP adherido se detectó mediante la oxidación del substrato TMB (Absorbancia a 450 nm). Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05).

O.E. I (3.2) Extensión de neuritas de células CAD sobre proteínas de fusión

Luego de caracterizar la presencia de cadenas de heparán sulfato funcionales en la proteína de fusión del proteoglicano, estudiamos si síndecan-4-Fc generaba un efecto en la extensión de las neuritas. Para esto, placas de cultivo fueron pre-incubadas con el sobrenadante que contiene la proteína síndecan-4-Fc en presencia o ausencia de $\alpha v\beta 3$-Fc, para luego sembrar células CAD e inducir la extensión de las neuritas en un medio sin suero. Cuando las células CAD fueron sembradas sobre placas pre-incubadas con síndecan-4-Fc, no se observó una diferencia significa en el largo de los procesos (~62 µm), comparado con la situación control donde las células CAD fueron sembradas sobre placas pre-tratadas con el sobrenadante de células no transfectadas (~64 µm) (**Figura 16**, **A** y **B**). En contraste y como se reportó previamente, el tratamiento de las placas con la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc condujo a un inhibición en la extensión de los procesos neuronales alcanzando un largo promedio de ~44 µm. Interesantemente, la reducción en el largo de los procesos neuronales fue mayor cuando las células CAD se diferenciaron morfológicamente sobre placas cubiertas con ambas proteínas de fusión, donde se logró una extensión promedio de las neuritas de ~34 µm (**Figura 16B**). Estos resultados sugieren que el proteoglicano, por sí solo, no genera una inhibición del crecimiento de las neuritas, sin embargo, potencia el efecto inducido por la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc.

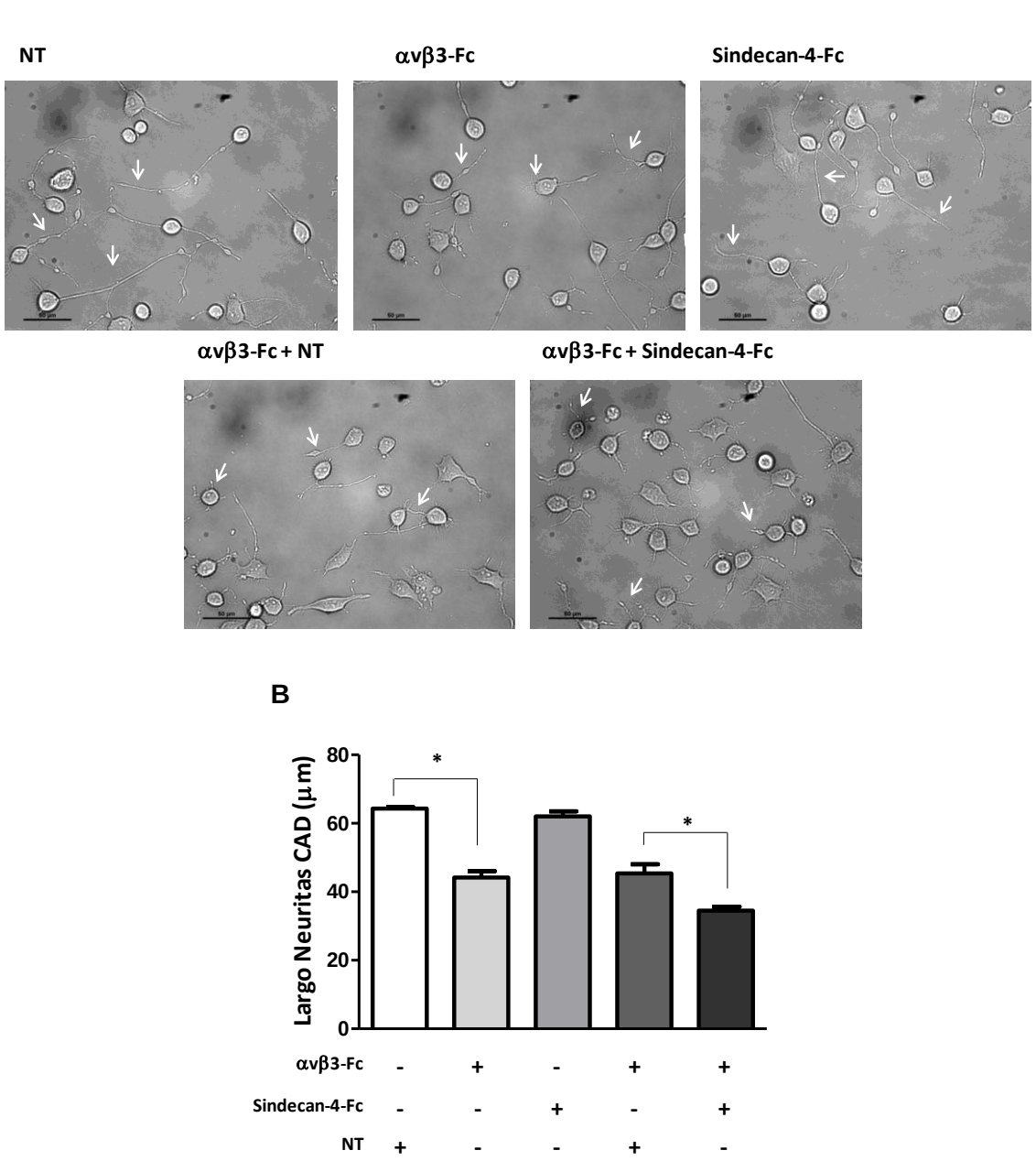


Figura 16. Efecto de síndecan-4-Fc sobre el crecimiento de neuritas de células CAD. Células CAD (5.000 células/cm^2) fueron sembradas sobre placas de cultivo pre-incubadas con sobrenadante de células HEK293T no transfectadas (NT), o sobrenadantes que contienen las proteínas de fusión αvβ3-Fc o síndecan-4-Fc. La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero por 24 horas a 37°C. **(A)** Microfotografías representativas de las condiciones experimentales obtenidas con Microscopio de Epifluorescencia *Olympus*. Barra 50 µm. **(B)** Cuantificación del largo de las neuritas (µm). Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05).

O.E. I (4) Participación de síndecan-4 en la retracción de neuritas de células CAD diferenciadas morfológicamente.

O.E. I (4.1) Efecto de la proteína de fusión síndecan-4-Fc en la retracción de neuritas de células CAD

Previamente nuestro laboratorio describió que células CAD diferenciadas morfológicamente, con neuritas ya formadas, retraen los procesos neuronales al incubarlas con la integrina $\alpha v\beta 3$ soluble ($\alpha v\beta 3$-Fc). Este fenómeno de retracción de procesos no ocurre al utilizar células CAD que carecen de Thy-1 (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). Considerando los resultados mostrados previamente (ver sección O.E. I 1.3 y 2.3), los cuales sugieren que síndecan-4 participa de la inhibición de la extensión de las neuritas mediada por la interacción integrina $\alpha v\beta 3$/Thy-1, se estudió si síndecan-4 participa también en la retracción de procesos neuronales. Como una primera aproximación, se estudió el efecto de síndecan-4-Fc en ausencia de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc sobre la retracción de procesos neuronales ya establecidos. Previamente, nuestro laboratorio determinó que la retracción de las neuritas ocurre luego de 20 minutos de incubación con $\alpha v\beta 3$-Fc, efecto estabilizado luego de 40 minutos de estimulación con la integrina (Maldonado *y cols.*, 2017). Por lo tanto, para estudiar el efecto de síndecan-4-Fc en la retracción de las neuritas, células CAD diferenciadas morfológicamente sobre una placa de cultivo (volumen final de 500 µl), fueron incubadas por 40 minutos con volúmenes crecientes del sobrenadante que contiene síndecan-4-Fc (25, 50, 100, 200 y 300 µl). La proteína de fusión no tuvo ningún efecto significativo sobre el largo de los procesos de células CAD en comparación al largo cuantificado en células CAD sin tratamiento (**Figura 17**). Este resultado sugiere que sindecan-4-Fc por sí solo no induce el acortamiento de los procesos neuronales.

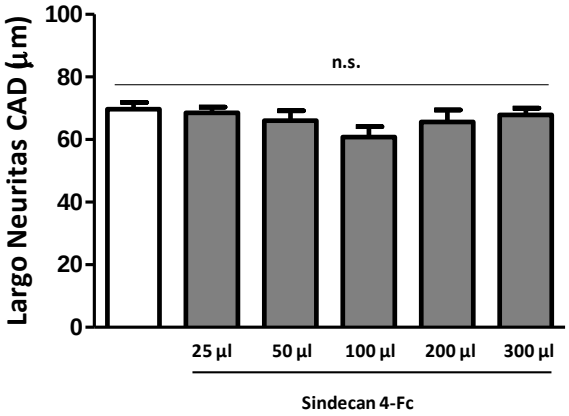


Figura 17. Efecto de síndecan-4-Fc sobre el largo de las neuritas de células CAD diferenciadas morfológicamente. Células CAD (5.000 células/cm^2) con sus procesos neuronales ya establecidos, fueron tratadas con volúmenes crecientes del sobrenadante obtenido desde células HEK293T transfectadas con síndecan-4-Fc (25, 50, 100, 200 y 300 µl). El largo de las neuritas fue evaluado luego de 40 minutos de incubación a 37°C. El gráfico muestra la cuantificación del largo de las neuritas (µm). Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; n.s. no significativo).

O.E. I (4.2) Efecto de la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc en presencia de síndecan-4-Fc en la retracción de neuritas de células CAD

Luego, se procedió a evaluar si la proteína de fusión del proteoglicano induce un cambio en el proceso de retracción de neuritas gatillado por la integrina αvβ3-Fc. Para ello, células CAD sembradas directamente sobre una placa de cultivo fueron mantenidas por 24 horas en un medio sin suero, con el objetivo de inducir la extensión de las neuritas, y luego incubadas con el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (100 µl) por 40 minutos. Como se esperaba, la incubación de células CAD con αvβ3-Fc provocó una retracción de los procesos neuronales, observando un largo promedio de ~38 µm, en comparación a la condición sin tratamiento (~60 µm) (**Figura 18**, **A** y **B**). Al adicionar αvβ3-Fc en presencia de volúmenes crecientes de síndecan-4-Fc (25, 50, 100, 200 y 300 µl), con o sin pre-incubación de ambas proteínas de fusión, no se observó ningún cambio significativo respecto al efecto de la integrina por si sola (**Figura 18**, **A** y **B**). Nuestro laboratorio reportó que el efecto de la integrina αvβ3-Fc sobre la retracción de procesos neuronales en células CAD o neuronas primarias, está directamente relacionado con la multimerización de Thy-1 en la membrana neuronal, efecto que se ve potenciado cuando previamente se incuba la integrina soluble con proteína A (Herrera-Molina *y cols.*, 2012). Posiblemente, porque la proteína A es capaz de interaccionar con más de una molécula de integrina αvβ3-Fc a la vez (posible relación 1:5) (Moks *y cols.*, 1986), lo que permitiría que la integrina interaccione con Thy-1 formando agregados, facilitando la multimerización de Thy-1 y por tanto, la señalización intracelular involucrada en los procesos de retracción. Para determinar si la multimerización de síndecan-4-Fc podría favorecer un efecto en la retracción de los procesos neuronales de células CAD, se evaluó el efecto del sobrenadante que contiene síndecan-4-Fc en presencia de la proteína A sobre el largo de las neuritas de células CAD diferenciadas morfológicamente. Síndecan-4-Fc no tuvo ningún efecto sobre el largo de las neuritas, en ausencia o presencia de la proteína A, en comparación a la retracción inducida por la integrina αvβ3-Fc (**Figura 18C**). La adición de la integrina en presencia de síndecan-4-Fc, no provocó ningún cambio significativo respecto al efecto de αvβ3-Fc por sí sola, ya sea en presencia o ausencia de la proteína A (**Figura 18C**). Estos resultados sugieren que luego de 40 minutos de incubación, síndecan-4-Fc no tendría ningún efecto sobre la retracción de los procesos neuronales dependiente de la interacción Thy-1/integrin αvβ3.

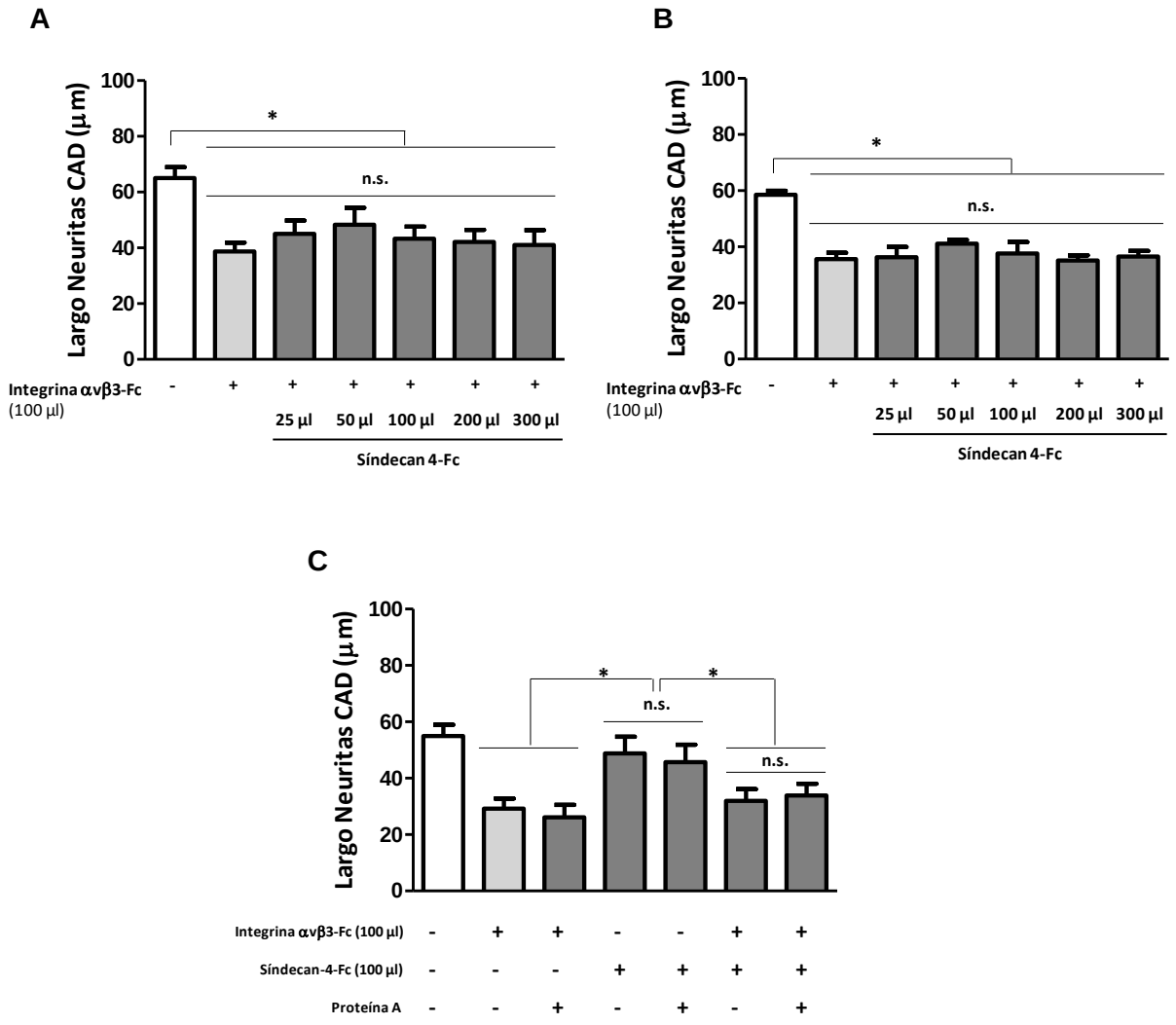


Figura 18. Efecto de la integrina αvβ3-Fc sobre el largo de las neuritas de células CAD en presencia de síndecan-4-Fc. Células CAD (5.000 células/cm^2) con sus procesos neuronales ya establecidos, fueron tratadas con 100 µl de integrina αvβ3-Fc (dilución 1/10) en presencia de volúmenes crecientes de síndecan-4-Fc (25, 50, 100, 200 y 300 µl), sin **(A)** y con **(B)** pre-incubación de ambas proteínas de fusión, **(C)** o en presencia de 100 µl síndecan-4-Fc , en presencia o no de proteína A. En los gráficos podemos ver la cuantificación del largo de las neuritas (µm), luego de 40 minutos de incubación a 37°C. Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; n.s. no significativo, *p<0,05).

O.E. I (4.3) Efecto de la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc en presencia de síndecan-4-Fc en la cinética de retracción de neuritas de células CAD

Previamente se ha reportado que síndecan-4 favorece el "clustering" de sus ligandos y co-receptores, favoreciendo la cinética de reacción entre ambos (Elfenbein y Simons, 2013). Considerando este antecedente, estudiamos el efecto de síndecan-4-Fc sobre la cinética de retracción de los procesos neuronales inducido por la integrina αvβ3-Fc. En la **Figura 19**, **A** y **B** podemos observar que la adición de síndecan-4-Fc no genera ningún cambio en la extensión de las neuritas en los diferentes tiempos evaluados (Sind-4-Fc). Además y tal como se esperaba, a partir de los 20 minutos de estimulación con integrina αvβ3-Fc, se produce una disminución significativa en el largo de las neuritas de células CAD (αvβ3-Fc), comparado con la condición control en ausencia de proteínas de fusión (Control). Como se esperaba, la incubación previa de αvβ3-Fc con proteína A indujo una retracción más rápida de los procesos neuronales, observándose una disminución significativa en el largo de las neuritas a los 5 minutos (αvβ3-Fc/PA). Interesantemente, un efecto similar se observó cuando la αvβ3-Fc se adicionó en presencia de la proteína de fusión síndecan-4-Fc en una relación 1:1 (αvβ3-Fc/Sind-4-Fc). Tal como se describió en la Figura 12, a los 40 minutos de incubación el largo de las neuritas es similar en todas las condiciones experimentales evaluadas con la integrina αvβ3-Fc. Estos resultados indican que la proteína de fusión síndecan-4-Fc acelera el proceso de retracción mediado por la integrina.

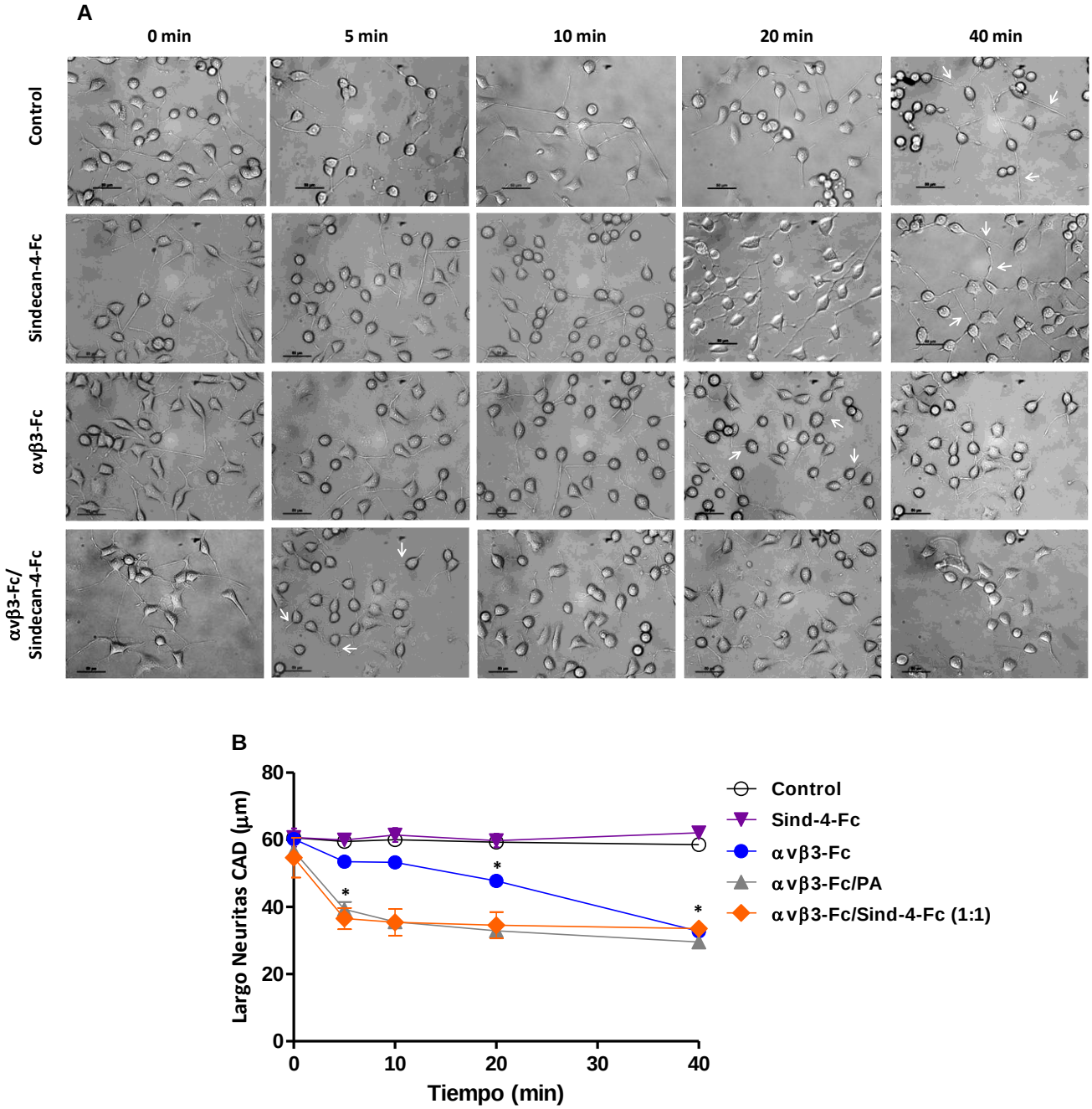


Figura 19. Efecto en el tiempo de la integrina αvβ3-Fc sobre el largo de las neuritas de células CAD en presencia de síndecan-4-Fc. Células CAD (5.000 células/cm^2) con sus procesos neuronales ya establecidos, fueron tratadas o no con el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (100 µl), en presencia de la proteína A (2 µg) o con 100 µl de síndecan-4-Fc. El largo de las neuritas fue evaluado a diferentes tiempos: 5, 10, 20 y 40 minutos. **(A)** Microfotografías representativas de las condiciones experimentales obtenidas con Microscopio de Epifluorescencia Olympus. Barra 50 µm. **(B)** Cuantificación del largo de las neuritas (µm) a los diferentes tiempos. Para cada cuantificación se evaluaron como mínimo 100 células por condición. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=3**; *p<0,05 comparado con la situación control en los respectivos tiempos analizados).

En conjunto, estos resultados indican que el proteoglicano síndecan-4 participa en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales, observado en los ensayos de co-cultivo neurona-astrocitos, potenciando el efecto inducido por la integrina $\alpha v\beta 3$ al interaccionar con Thy-1. Además, síndecan-4 acelera la retracción, inducida por la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, de los procesos neuronales previamente formados.

Objetivo Específico II (O.E. II)

Estudiar el mecanismo por el cual síndecan-4 favorece la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de procesos neuronales en células CAD, mediado por la interacción $\alpha v\beta 3$/Thy-1.

O.E. II (1) Caracterización de la interacción entre Thy-1 y síndecan-4

Los resultados obtenidos en el objetivo específico I indican que síndecan-4 cumple un papel tanto en la inhibición del crecimiento como en la retracción de neuritas inducida por la integrina $\alpha v\beta 3$; sin embargo, el mecanismo por el cual el proteoglicano estaría participando en ambos fenómenos neuronales no ha sido estudiado aún. Thy-1 posee un dominio putativo de unión a Hep en su secuencia primaria (Avalos *y cols.*, 2009), que podría mediar su interacción con síndecan-4 y así explicar la participación del proteoglicano en la respuesta neuronal inducida por la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$. Considerando lo anterior, se propuso evaluar si síndecan-4 interacciona directamente con Thy-1.

O.E. II (1.1) Interacción Thy-1/síndecan-4 mediante Inmunofluorescencia indirecta

Inicialmente, se propuso estudiar la posible interacción de síndecan-4 y Thy-1 mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), en ensayos de co-cultivo entre células CAD y astrocitos DITNC1, esperando observar una posible co-localización entre las dos proteínas, fenómeno que estaría relacionado directamente con la comunicación neurona-astrocito. Para esto, se estandarizó la detección del proteoglicano mediante IFI en células DITNC1. Utilizando un anticuerpo específico contra el ectodominio de síndecan-4, la visualización de la proteína fue más definida en la membrana de las células previamente tratadas con Hasa III (**Figura 20**). Estos resultados indican que las cadenas de heparán sulfato interfieren con la detección del antígeno por parte del anticuerpo.

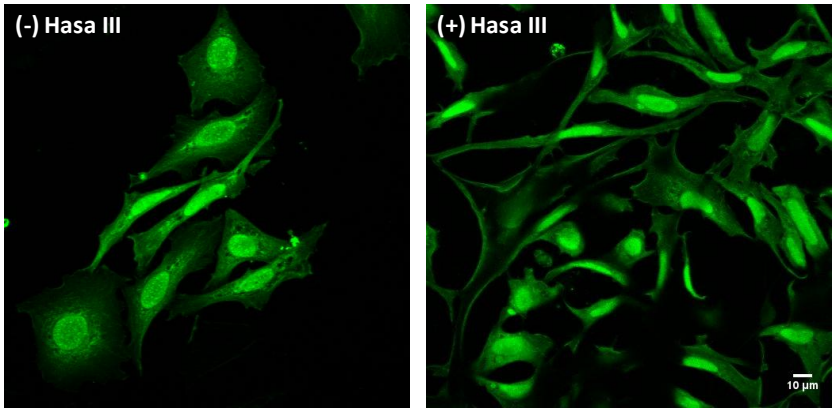


Figura 20. Inmunofluorescencia indirecta de síndecan-4 en astrocitos DITNC1. Astrocitos DITNC1 (5.000 células/cm^2) fueron pre-incubados (+) o no (-) con Heparitinasa III (Hasa III; 0,5 mU) durante 3 horas a 37°, para luego ser fijados con paraformadehído, lavadas y permeabilizadas con Triton-X100. Síndecan-4 fue detectado con el anticuerpo anti-síndecan-4 seguido del anticuerpo anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 (verde). Las imágenes son representativas de las condiciones estudiadas (**n=2**) y fueron obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i. Barra 10 µm.

O.E. II (1.2) Interacción Thy-1/síndecan-4 mediante ELISA

Considerando lo anterior, se propuso una segunda alternativa experimental para evaluar la interacción Thy-1/síndecan-4, la que consistió en un ensayo de ELISA entre la proteína de fusión de Thy-1 inmovilizada en una placa (Thy-1-Fc) y el extracto proteico obtenido de células HEK293T transfectadas con síndecan-4-HA. Para ensayar la unión Thy-1-Fc/síndecan-4-HA, se utilizaron anticuerpos contra síndecan-4 o contra el *tag* HA. Inicialmente, se evaluó mediante ensayos de Western blot los niveles de síndecan-4-HA en las células transfectadas. El mayor incremento de los niveles de expresión de síndecan-4-HA se logró 48 horas post-transfección (**Figura 21A**), mientras que la proteína no fue detectada en el sobrenadante de células no transfectadas. Luego de este análisis, se procedió a realizar el ensayo de ELISA, con el extracto proteico obtenido de células transfectadas o no. Como control de Thy-1-Fc, se utilizó la proteína de fusión del receptor del ligando soluble inductor de apoptosis, TRAIL (TRAIL-R2-Fc) (Schneider, 2000). Solo se observó un incremento en la oxidación del sustrato cromogénico TMB cuando las placas cubiertas con Thy-1-Fc fueron incubadas con el extracto proteico obtenido de células HEK293T transfectadas con síndecan-4-HA, en comparación a la condición donde el extracto proviene de células no transfectadas, o a la condición donde las placas fueron pre-incubadas con la proteína TRAIL-R2-Fc (**Figura 21B**). Resultados similares se

obtuvieron ya sea al usar anticuerpos anti-síndecan-4 como anti-HA. Los resultados sugieren que existe una interacción directa entre Thy-1 y síndecan-4.

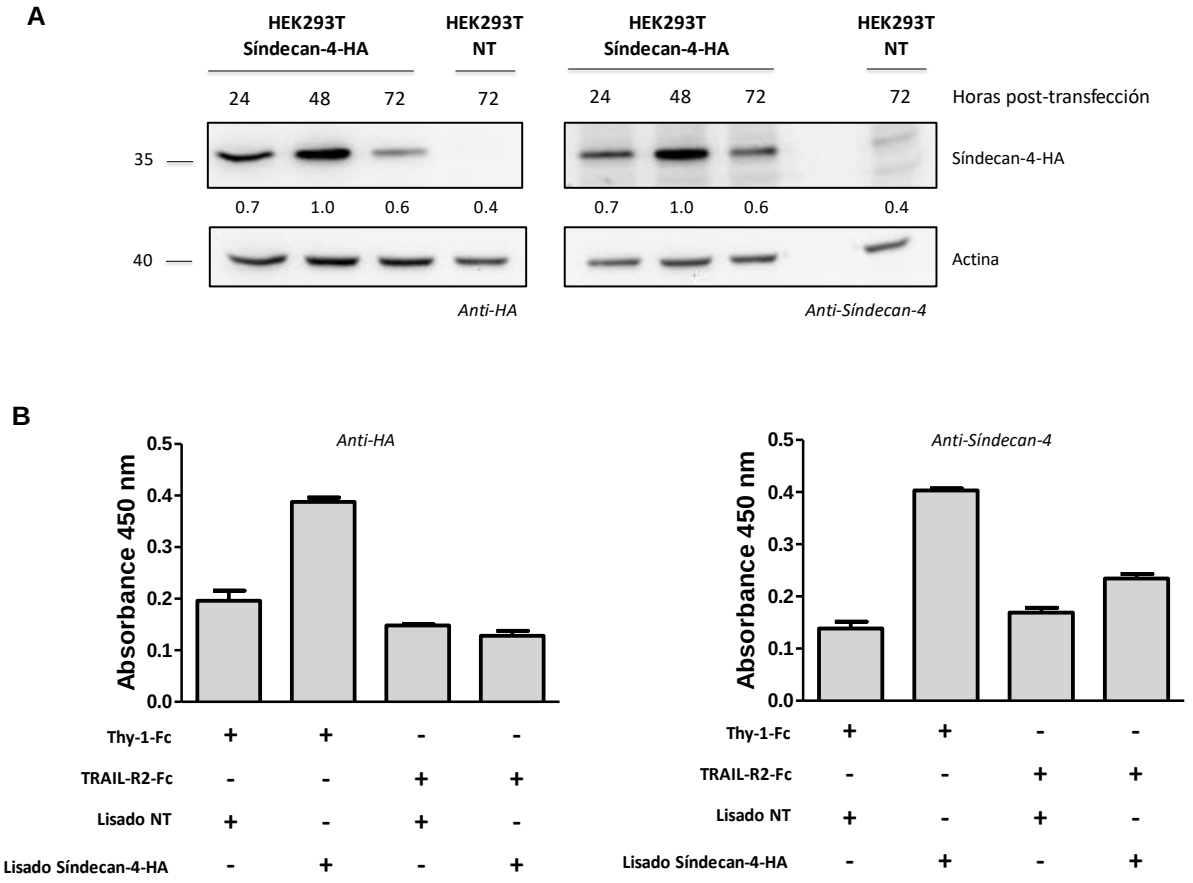


Figura 21. ELISA entre Thy-1-Fc y extracto proteico de células transfectadas con síndecan-4-HA. Células HEK293T (300.000 células) fueron transfectadas o no con el plasmidio de expresión de la proteína de fusión síndecan-4-HA, y mantenidas en cultivo por 24, 48 y 72 horas post-transfección. **(A)** A cada tiempo post-transfección, células fueron lisadas y los extractos proteicos separados por SDS-PAGE en geles al 10%, para luego ser analizadas mediante Western blot con el anticuerpo anti-síndecan-4 o anti-HA. Imágenes representativas de los Western blot de dos experimentos diferentes (**n=2**). **(B)** Las placas fueron recubiertas toda la noche con la proteína Thy-1-Fc (10 µg) o con la proteína de fusión del receptor de muerte TRAIL-R2-Fc (10 µg), bloqueadas, lavadas e incubadas por 2 horas con los extractos proteicos obtenidos de células HEK293T transfectadas o no con síndecan-4-HA. La unión fue detectada con anticuerpos anti-síndecan-4 o anti-HA, seguidos del anticuerpo anti-IgG-HRP de ratón. La presencia de HRP adherido se detectó mediante la oxidación del substrato TMB (Absorbancia a 450 nm). Los resultados son expresados como promedio ± DS estimado de dos experimentos diferentes realizados en triplicado (**n=2**).

Aun cuando los resultados mostrados en Figura 21 son positivos para nuestra hipótesis, estos también muestran altos niveles de oxidación de TMB en las condiciones controles, sugiriendo la posible detección de otro tipo de interacciones. Por lo tanto, se implementó una tercera estrategia experimental para corroborar la interacción Thy-1/síndecan-4.

O.E. II (1.3) Interacción Thy-1/síndecan-4 mediante Pinzas Ópticas

Diversos trabajos indican que los estudios a nivel de molécula-única constituyen una estrategia directa para caracterizar interacciones proteína-proteína (Litvinov *y cols.*, 2005; Stangner *y cols.*, 2013; Zhang *y cols.*, 2004). Específicamente, los estudios *in singulo* permiten obtener información directa sobre el comportamiento individual de las moléculas en tiempo real, en contraste a los estudios *in multiplo* que entregan información promediada e indirecta de una población de moléculas y que a menudo enmascaran la heterogeneidad inherente de las poblaciones de macromoléculas (Bustamante *y cols.*, 2014). Una ventaja importante de los estudio a nivel de molécula individual es que permiten cuantificar la fuerza involucrada en diversos procesos celulares, como las interacciones proteína-proteína, información que puede ser utilizada para caracterizar los parámetros cinéticos de una interacción (Dudko *y cols.*, 2008; Evans *y cols.*, 2010). La espectroscopía de fuerza molecular corresponde a la estrategia experimental que permite caracterizar las fuerzas involucradas en una interacción a nivel de molécula única (Yuan *y cols.*, 2000). Como transductores de fuerza existen diversas técnicas, como la microscopía de fuerza atómica (AFM), pinzas magnéticas y pinzas ópticas. Esta última fue desarrollada por Ashkin y colaboradores (Ashkin, 1997) y consiste en el atrapamiento óptico de partículas con alto índice de refracción (*e.g.* esferas de poliestireno) utilizando un haz luz enfocado a través del objetivo de un microscopio. En una trampa óptica, la fuerza se puede generar cuando la partícula es desplazada del centro de la trampa. Cuando la trampa se comporta como un resorte de Hook, la fuerza generada se puede calcular multiplicando la constante de resorte de la trampa óptica (k) y el desplazamiento desde el centro del atrapamiento (Δx), $F=k\ \Delta x$ (Smith *y cols.*, 2003). Considerando la disponibilidad, se propuso estudiar y caracterizar la interacción bimoleculares entre Thy-1 y síndecan-4 a través de pinzas ópticas.

O.E. II (1.3.1) Diseño experimental en Pinzas Ópticas para estudiar la interacción Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc

Para comprender la estrategia experimental, en la **Figura 22A** se muestra una representación esquemática de la técnica de pinzas ópticas, donde las proteínas de fusión de síndecan-4-Fc y Thy-1-Fc fueron unidas a esferas de poliestireno cubiertas con proteína G. Particularmente, síndecan-4-Fc está unida a la esfera atrapada ópticamente, mientras que Thy-1-Fc está unida a la esfera atrapada por succión a una micropipeta. <Para promover la interacción Thy-1/síndecan-4, la esfera atrapada por la luz se pone en contacto con la segunda esfera en la micropipeta (Acercamiento y Contacto), para luego ser separadas a una velocidad constante de 100 nm/s (Retracción) (**Figura 22B**). En el caso que la interacción proteína-proteína ocurra, la esfera atrapada por la luz es desplazada del centro de la trampa óptica y la fuerza es generada (fuerza que es proporcional al desplazamiento de la esfera según la Ley de Hook). Cuando la fuerza es mayor a la fuerza que disocia la interacción, la ruptura de la unión ocurre (Ruptura). La fuerza de ruptura es obtenida a partir de un gráfico que describe la fuerza en piconewton (pN) versus posición de la trampa (**Figura 22C**).

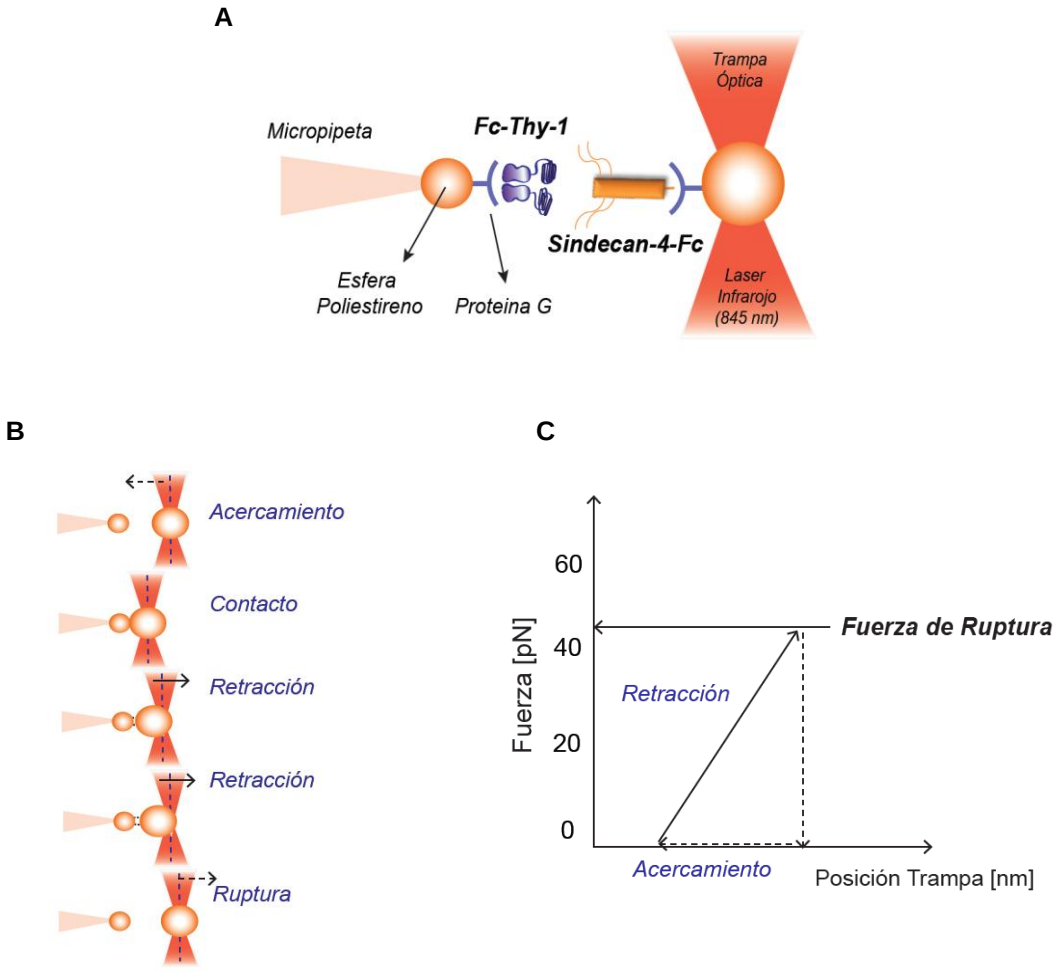


Figura 22. Sistema de pinzas ópticas para estudiar la interacción entre Thy-1 y síndecan-4. (A) Representación esquemática de la técnica de pinzas ópticas utilizada para estudiar la interacción Thy-1/síndecan-4. El diseño experimental consiste en dos esferas de poliestireno cubiertas con proteína G de diferentes tamaños; la esfera pequeña (2.1 µm) contiene la proteína Thy-1-Fc [1 µM] y es atrapada por una micropipeta, mientras que la esfera grande (3.1 µm) contiene la proteína síndecan-4-Fc [1 fM] y es atrapada por un láser infrarrojo (845 nm) y mantenido en el foco del microscopio. **(B)** Ciclo representativo de acercamiento-retracción de las esferas. Para promover la interacción, la esfera atrapada ópticamente se pone en contacto con la esfera unida a la micropipeta (Contacto). Luego de < 1 s de contacto, las esferas son separadas tirando la esfera atrapada por la luz a una velocidad constante (100 nm/s; Retracción) hasta que ocurre la disociación de la interacción (Ruptura). Las líneas punteadas azules en el laser representa el centro de la trampa óptica. **(C)** Gráfico representativo de la fuerza versus posición de la trampa que permite estimar la fuerza requerida para disociar una interacción (Fuerza de Ruptura).

O.E. II (1.3.2) Frecuencia de adhesión Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc

Aplicando el diseño experimental detallado previamente, se determinó si Thy-1-Fc interacciona directamente con síndecan-4-Fc. Como se describió previamente, en el caso que exista una interacción entre ambas moléculas, en el ciclo de acercamiento-retracción, específicamente durante proceso de retracción de la esfera atrapada por la luz, dicha esfera será desplazada del centro de la trampa óptica y una fuerza será generada (visualizado por un incremento en la fuerza en el gráfico de fuerza vs posición de la trampa; **Figura 22C**). Por lo tanto, inicialmente se procedió a caracterizar la frecuencia de adhesión entre ambas esferas, que corresponde al número de eventos donde el acercamiento entre ambas esferas generó una fuerza, indicador de la presencia de una interacción Thy-1/síndecan-4, respecto al número total de eventos de contacto (Robert *y cols.*, 2007). Para esto, se evaluó las fuerzas de ruptura de 5 pares de esferas nuevas, realizando como mínimo 50 ciclos de acercamiento-ruptura para cada par de esferas de poliestireno. Una frecuencia de adhesión mayor fue observada para la condición entre síndecan-4-Fc y Thy-1-Fc "wild type" (Thy-1-Fc), en comparación a la condición control estudiada con TRAIL-R2-Fc o con esferas incubadas sólo con buffer (**Figura 23**). Estos resultados sugieren una interacción directa entre el proteoglicano y Thy-1. Para evaluar si el dominio de unión a Hep (HBD) de Thy-1 media la interacción con síndecan-4, se determinó la frecuencia de adhesión entre síndecan-4-Fc y Thy-1 mutado en el HBD (REKRK→AEAAA). Como se observa en la **Figura 23**, una frecuencia de adhesión menor fue cuantificada para la condición síndecan-4-Fc/Thy-1(AEAAA)-Fc, en comparación a la condición con Thy-1-Fc "wild type", indicando la participación de este dominio en la interacción. Adicionalmente, estos resultados sugieren que las cadenas de heparán sulfato de síndecan-4 están involucrados en la unión directa con Thy-1. Cuando se estudió la interacción entre síndecan-4-Fc con Thy-1-Fc mutado en el dominio de unión a la integrina (RLE), se observó una frecuencia de adhesión similar a la proteína Thy-1-Fc "wild type", descartando la participación de este dominio en la interacción con síndecan-4.

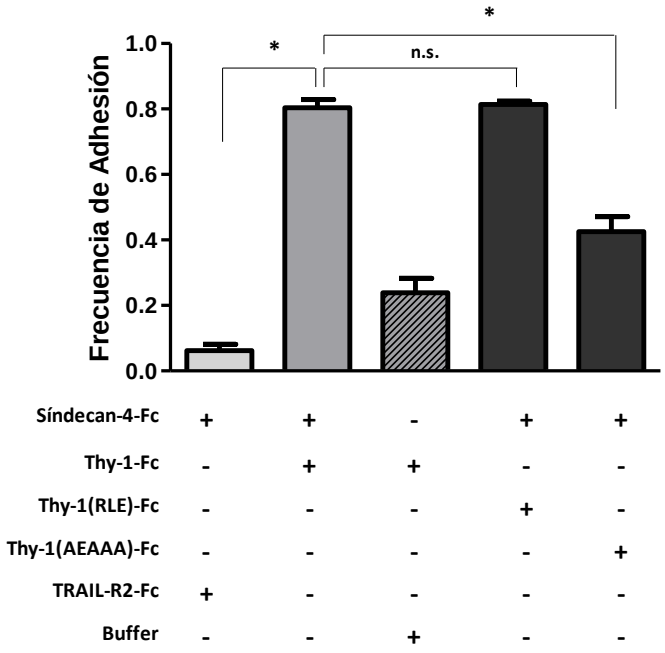


Figura 23. Frecuencia de adhesión entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc a nivel de molécula-única utilizando las pinzas ópticas. Frecuencia de adhesión evaluada midiendo el número de total de eventos de unión en al menos 50 ciclos de acercamiento-retracción por 5 pares de esferas nuevas y recién preparadas (~250 ciclos de acercamiento-retracción), entre esferas cubiertas con síndecan-4-Fc y esferas pre-incubadas con Thy-1-Fc "wild type" (Thy-1-Fc), Thy-1-Fc mutado en el dominio de unión a heparina (Thy-1-AEAAA-Fc), Thy-1-Fc mutado en el dominio de unión a integrina (Thy-1-RLE-Fc), o TRAIL-R2-Fc. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (*p<0,05; n.s. no significativo).

O.E. II (1.3.3) Fuerzas de ruptura y parámetros de unión Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc

Adicionalmente, utilizando la información obtenida con los ciclos de acercamiento-ruptura, se caracterizó el histograma de fuerzas de ruptura que describe la distribución de éstas, para la interacción Thy-1/síndecan-4 (**Figura 24A**). Aplicando la función Gaussiana, se caracterizó la fuerza de ruptura más probable para la interacción Thy-1/síndecan-4, equivalente a ~23 pN. Tanto los parámetros cinéticos como los del estado de transición del proceso de disociación entre Thy-1/síndecan-4 pueden ser calculados a partir del histograma de fuerzas de ruptura mostrado en **Figura 24A**. Lo anterior, aplicando el modelo de Dudko-Hummer-Szabo (DHS) (Dudko *y cols.*, 2008), que permite transformar las fuerzas de ruptura graficadas en el histograma en tiempos de vida dependientes de la fuerza, $\tau(F)$. Para esto, los tiempos de vida (τ) para cada barra del histograma fueron calculados utilizando la Ecuación [1] (Materiales y Métodos) y graficados versus las fuerzas de ruptura (**Figura 24B**). Luego, los tiempos de vida fueron ajustados al modelo no-lineal de DHS descrito en la Ecuación [2] (Materiales y Métodos) (**Figura 24B**). Este ajuste permitió caracterizar el perfil energético del proceso de disociación entre Thy-1 y síndecan-4 a fuerza cero (**Figura 24C**), es decir, se calculó el tiempo de vida a fuerza cero (τ^0 = 9,96 ± 2,33 s), la constante de disociación ("off-rate constant", k_{off}^0 = 0,10 ± 0,02 s^{-1}), la distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$ = 0,34 ± 0,09 nm) y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$ = 3,74 ± 0,49 $k_B T$).

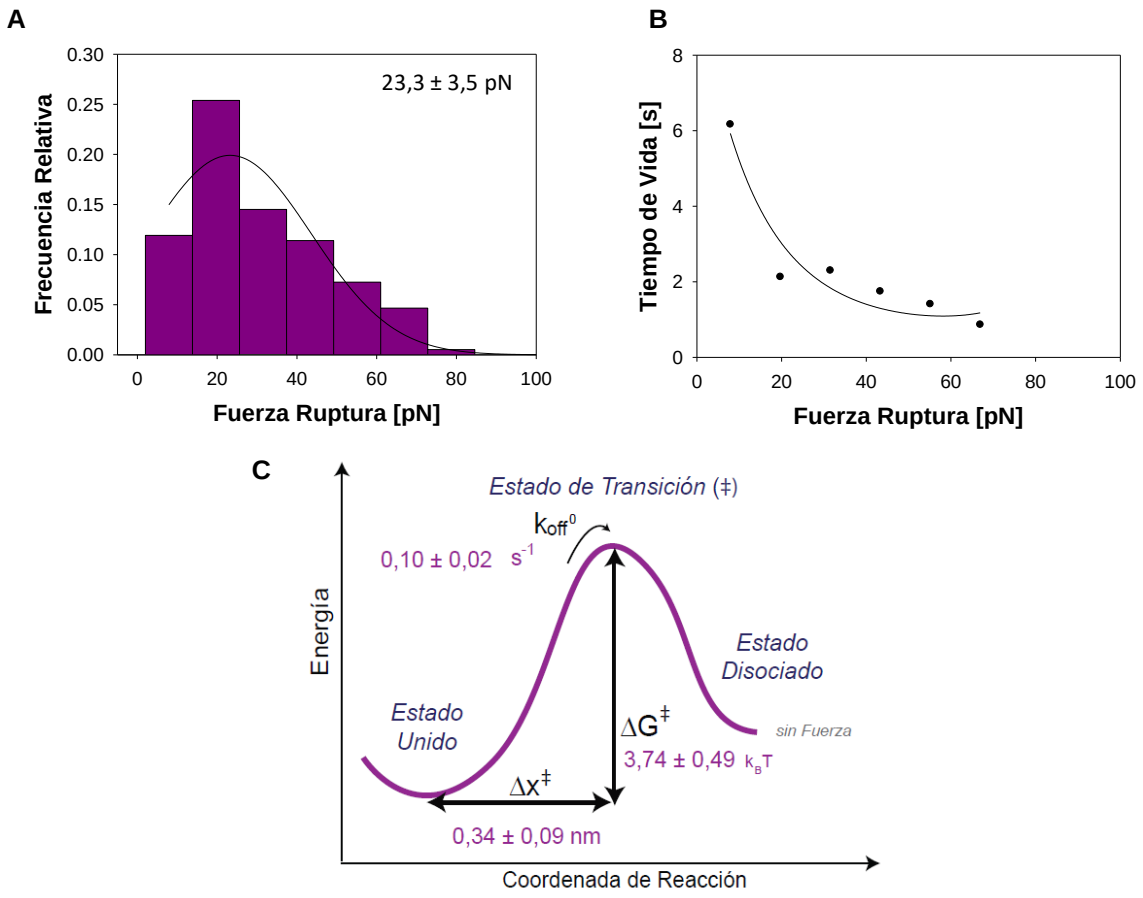


Figura 24. Fuerzas de ruptura y parámetros de unión entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc a nivel de molécula-única. (A) Histograma de fuerzas de ruptura para la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, que resume por lo menos 300 eventos de unión por cinco pares de esferas nuevas. La línea negra en el histograma corresponde a la curva obtenida luego de aplicar la función Gaussiana para ilustrar la distribución y el "peak" de la fuerza de ruptura. **(B)** Tiempos de vida dependiente de la fuerza para la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, calculados a partir de cada barra del histograma mostrado en (A), utilizando el modelo de DHS (Ecuación 1, Materiales y Métodos). La línea negra en (B) corresponde a la curva de ajuste obtenida al utilizar la Ecuación 2 (Materiales y Métodos; υ = 0,5). **(C)** Perfil energético del proceso de disociación entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, donde se muestra la constante de disociación a fuerza cero (k_{off}^0), distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$), y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$).

Los resultados mostrados hasta el momento indican que tanto la integrina $\alpha v\beta 3$ como el proteoglicano síndecan-4, ambos expresados en la superficie celular de astrocitos, participan en la inhibición de la extensión de neuritas y retracción de procesos neuronales dependientes de Thy-1. Adicionalmente, los resultados sugieren que síndecan-4 participa en los efectos neuronales, a través de su interacción directa con la proteína neuronal. Considerando que síndecan-4 no puede promover ambas respuestas neuronales en ausencia de la integrina $\alpha v\beta 3$, se propuso definir el mecanismo por el cual ambas

moléculas - en acción combinada - promueven los efectos neuronales. Una de las principales funciones atribuidas a síndecan-4 es su papel como co-receptor de factores de crecimiento (Carey, 1997), función caracterizada por la capacidad de interaccionar con su ligando con una afinidad inferior a la de la unión ligando-receptor primario (Elfenbein y Simons, 2013). En nuestro sistema, tanto síndecan-4 como la integrina αvβ3, actúan como ligandos del receptor neuronal Thy-1. Por lo tanto, considerando el papel de co-receptor reportado para el proteoglicano, se estudió si síndecan-4 podría estar actuando como un co-ligando de la proteína neuronal, siendo por tanto la integrina αvβ3 el ligando primario de Thy-1. Para esto, se evaluó inicialmente los parámetros de unión entre Thy-1/integrina αvβ3, con el fin de compararlos con los parámetros obtenidos para la interacción Thy-1/síndecan-4.

O.E. II (2) Caracterización de la interacción entre Thy-1 y la integrina αvβ3

O.E. II (2.1) Interacción Thy-1/αvβ3 mediante Pinzas Ópticas

Nuestro laboratorio reportó previamente, mediante la técnica de Resonancia de Plasmones Superficiales, la interacción directa e inter-especie entre Thy-1 y la integrina αvβ3, utilizando las proteínas de fusión de ambas moléculas, Thy-1-Fc y αvβ3-Fc (Hermosilla *y cols.*, 2008). Sin embargo, no fue posible medir los parámetros de unión debido a que la proteína αvβ3-Fc sólo estaba disponible en su condición no-purificada en el sobrenadante de células HEK293T transfectadas. Tal como se caracterizó para la interacción entre Thy-1 y síndecan-4, se propuso utilizar la espectroscopía de fuerza molecular, específicamente las pinzas ópticas, para determinar los parámetros de unión Thy-1/αvβ3 a nivel de molécula-única, y de esta forma realizar una correcta comparación entre ambas interacciones bimoleculares.

O.E. II (2.1.1) Diseño experimental en Pinzas Ópticas para estudiar la interacción Thy-1-Fc/αvβ3-Fc

La espectroscopía de fuerza molecular es una técnica altamente sensible, por lo tanto todos los estudios realizados para caracterizar interacciones proteína-proteína han sido realizados con proteínas purificadas para reducir la posibilidad de detectar interacciones

no-específicas (Fiore *y cols.*, 2014; Li *y cols.*, 2003). En nuestro caso, los intentos previos de purificar la integrina αvβ3 han generado una proteína de fusión no-funcional e inestable (Hermosilla *y cols.*, 2008), por lo que para superar esta limitante, se diseñó una estrategia experimental y matemática para caracterizar la interacción con Thy-1 a nivel de molécula individual utilizando la integrina αvβ3-Fc no purificada (*i.e.* directamente desde el sobrenadante de células transfectadas). En este caso, Thy-1-Fc fue unida a la esfera atrapada por succión a una micropipeta, mientras que la integrina αvβ3-Fc fue unida a la esfera atrapada ópticamente, mediante la incubación de las esferas con el sobrenadante obtenido de células HEK293T transfectadas con αvβ3-Fc (**Figura 25**).

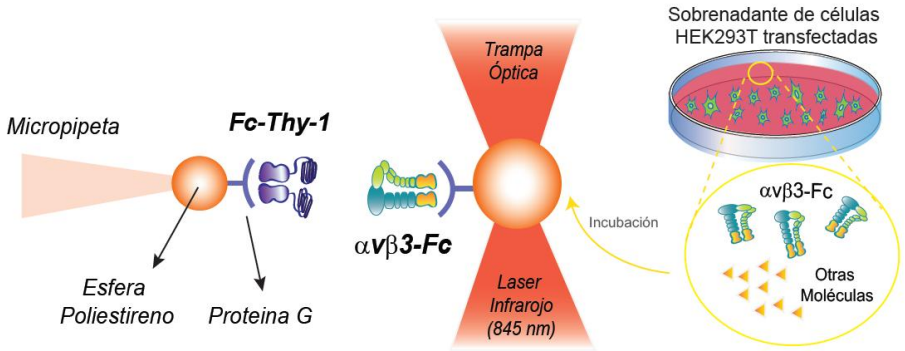


Figura 25. Sistema de pinzas ópticas para estudiar la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc. Representación esquemática de la técnica de pinzas ópticas utilizada para estudiar la interacción Thy-1/αvβ3. El diseño experimental consiste en dos esferas de poliestireno cubiertas con proteína G de diferentes tamaños; la esfera pequeña (2.1 µm) contiene la proteína Thy-1-Fc [1 µM] y es atrapada por una micropipeta, mientras que la esfera grande (3.1 µm) contiene la proteína αvβ3-Fc y es atrapada por un laser infrarrojo (845 nm) y mantenido en el foco del microscopio.

O.E. II (2.1.2) Estimación de la concentración de la integrina αvβ3-Fc en sobrenadante de células HEK293T transfectadas

Para caracterizar, a través de la espectroscopía de fuerza molecular, los parámetros de unión entre Thy-1-Fc purificado y la integrina αvβ3-Fc en el sobrenadante, fue fundamental trabajar sólo con las interacciones de molécula-única. Para determinar la menor concentración requerida de la integrina para lograr eventos de unión a nivel de molécula-única con Thy-1, inicialmente se estimó la concentración de la integrina en el sobrenadante. A través de un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, se observó que el sobrenadante obtenido de células HEK293T transfectadas con αvβ3-Fc

contiene adicionalmente otras proteínas (**Figura 26A**), por lo que, la estimación de la concentración de αvβ3-Fc fue realizada mediante un análisis de Western blot semi-cuantitativo, utilizando anticuerpos contra la fracción Fc y una curva de calibración con cantidades crecientes de la proteína TRAIL-R2-Fc (**Figura 26B**). Al aplicar la ecuación de regresión lineal obtenida con la curva de calibración (**Figura 26C**) y un peso molecular de ~300 kDa para la molécula αvβ3-Fc, se calculó una concentración de ~4 nM para la integrina en el sobrenadante.

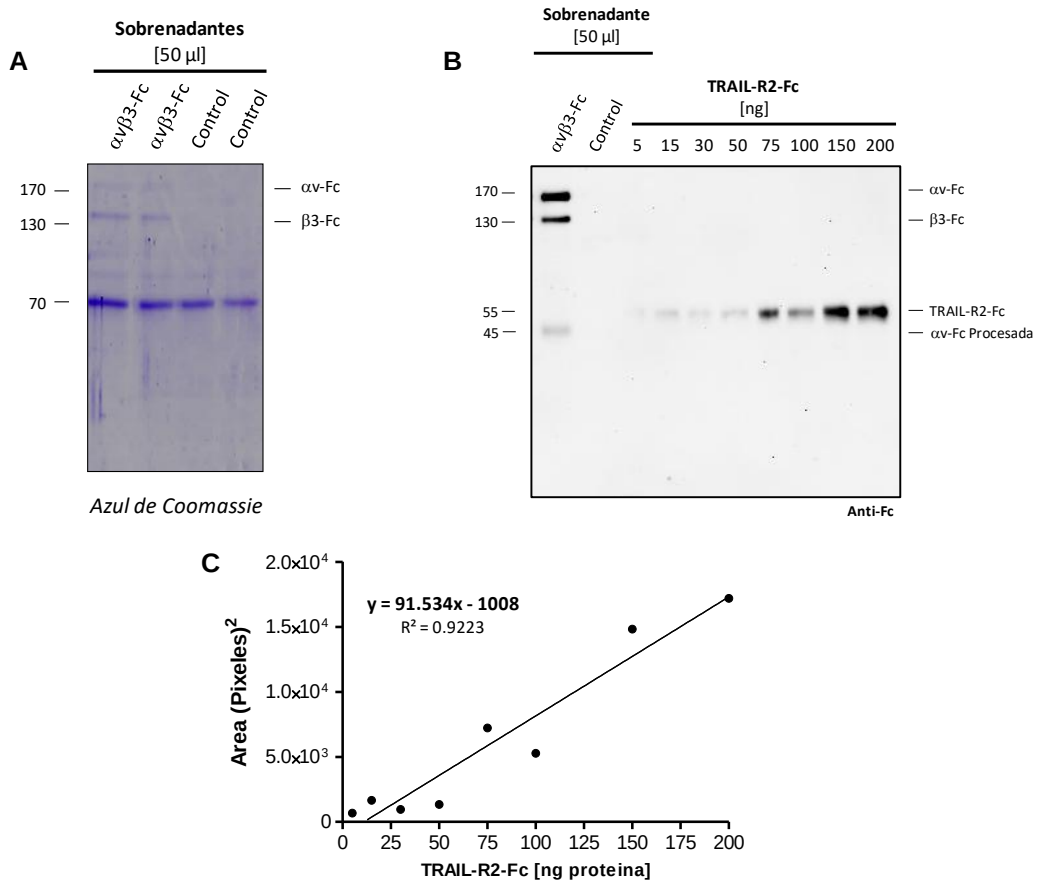


Figura 26. Estimación de la concentración de la proteína de fusión αvβ3-Fc en el sobrenadante de células HEK293T transfectadas. (A) Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie del sobrenadante de células transfectadas con la integrina αvβ3-Fc (αvβ3-Fc; 50 µl), y el sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio vacío (Control; 50 µl). **(B)** Análisis de Western blot semi-cuantitativo utilizado para estimar la concentración de la integrina αvβ3-Fc en el sobrenadante de células HEK293T transfectadas. El sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (αvβ3-Fc; 50 µl), el sobrenadante de células transfectadas con plasmidio vacío (Control; 50 µl), y cantidades crecientes de la proteína de fusión purificada TRAIL-receptor 2 (TRAIL-R2-Fc) fueron separadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y analizados por Western blot utilizando anticuerpos anti-Fc. **(C)** Las bandas de TRAIL-R2-Fc fueron escaneadas densitométricamente, y los valores resultantes fueron graficados contra las diferentes cantidades de la proteína. La cantidad de la integrina αvβ3-Fc en 50 µl de sobrenadante fue calculada utilizando la ecuación de regresión lineal (inserto).

O.E. II (2.1.3) Fuerzas de ruptura entre Thy-1-Fc y diferentes diluciones del sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc

Después de estimar la concentración de la integrina αvβ3-Fc en el sobrenadante, se caracterizó las fuerzas de ruptura usando las pinzas ópticas. Para esto, diferentes diluciones del sobrenadante que contiene la integrina (no-diluido, diluido 10^3, 10^6 o 10^9 veces) fueron incubadas con las esferas de poliestireno cubiertas con proteína G (**Figura 25**), para definir la menor concentración de la integrina necesaria para generar eventos de unión a nivel de molécula-única entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc. Como la concentración de la integrina en el sobrenadante se encuentra en el orden nanomolar, cada dilución del sobrenadante permitió evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la integrina (no diluido: nM; diluido 10^3 veces: pM; diluido 10^6 veces: fM; diluido 10^9 veces: aM). Considerando que el sobrenadante celular contiene diferentes tipos de proteínas, se pensó que algunas de éstas podrían competir con αvβ3-Fc por la interacción con Thy-1-Fc, y alterar parcialmente las fuerzas de ruptura obtenidas para la interacción específica entre la integrina y Thy-1. Para tratar de limitar las mediciones de fuerza de ruptura sólo a las uniones específicas, esferas cubiertas con proteína G fueron usadas para unir específicamente la integrina αvβ3-Fc desde el sobrenadante (**Figura 25**). Para evaluar si las posibles interacciones no-específicas son detectadas, aun cuando se use la proteína G para separar la integrina de las otras proteínas del sobrenadante, y para estimar la magnitud de dichos eventos, el sobrenadante de células HEK293T transfectadas con un plasmidio vacío fue utilizado como control (Control). La ausencia de la integrina αvβ3-Fc en este sobrenadante control fue confirmado en geles teñidos con azul de Coomassie (**Figura 26A**) y por Western blot (**Figura 26B**). Para los estudios en las pinzas ópticas, el sobrenadante control fue diluido de la misma forma que el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (no-diluido, diluido 10^3, 10^6 o 10^9 veces). Cuando se utilizó en las pinzas ópticas el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc sin ninguna dilución (no-diluido), se observó una distribución bimodal de las fuerzas de ruptura resultantes para la interacción con Thy-1-Fc, y cuyos "peaks" correspondieron a 19.9 ± 3.2 pN y 50.0 ± 6.4 pN (**Figura 27A**). Según la literatura, la presencia de más de un "peak" es equivalente a eventos de unión múltiples (Litvinov *y cols.*, 2005; Weisel *y cols.*, 2003). Sin embargo, sólo un "peak" de fuerza de ruptura, característico de interacciones a nivel de molécula-única, fue detectado tras realizar las diferentes diluciones del

sobrenadante (**Figura 27, C, E** y **G**). Por otra parte, se observó distribuciones de fuerza de ruptura similares en todos los experimentos donde se utilizó las diferentes diluciones del sobrenadante control (**Figura 27, B, D, F** y **H**), sugiriendo que Thy-1-Fc promueve interacciones no-específicas caracterizadas por una fuerza de ruptura más probable de ~10 pN. Diferencias entre los histogramas de fuerza de ruptura obtenidas para Thy-1-Fc/$\alpha v\beta 3$-Fc y Thy-1-Fc/control se detectaron solo hasta la dilución de 10^6-veces (**Figura 27, E** y **F**). Los gráficos representativos de fuerza versus posición de la trampa óptica, obtenidos a una dilución de 10^6 veces para Thy-1-Fc/$\alpha v\beta 3$-Fc y Thy-1-Fc/control se pueden ver en la **Figura 27**, **I** y **J**, respectivamente. Interesantemente, cuando la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc fue diluida 10^9 veces, el perfil del histograma y el "peak" de fuerza de ruptura, fueron similares a los obtenidos para la condición Thy-1-Fc/sobrenadante control (**Figura 27**, **G** y **H**). Estos resultados indican que la dilución de 10^6 veces del sobrenadante que contiene la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc corresponde a la condición más diluida donde las fuerzas de ruptura son diferentes a las observadas en la situación control (*i.e.* Thy-1-Fc/control). En consecuencia, la dilución de 10^6 veces representa la condición más diluida donde se pueden detectar interacciones específicas entre Thy-1-Fc y la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, y la condición donde hay mayor probabilidad de estar trabajando a nivel de molécula-única. Además, estos resultados sugieren que en nuestro sistema experimental se pueden detectar eventos de interacción no-específica, aun cuando se utilice la proteína G para unir específicamente la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc a las esferas.

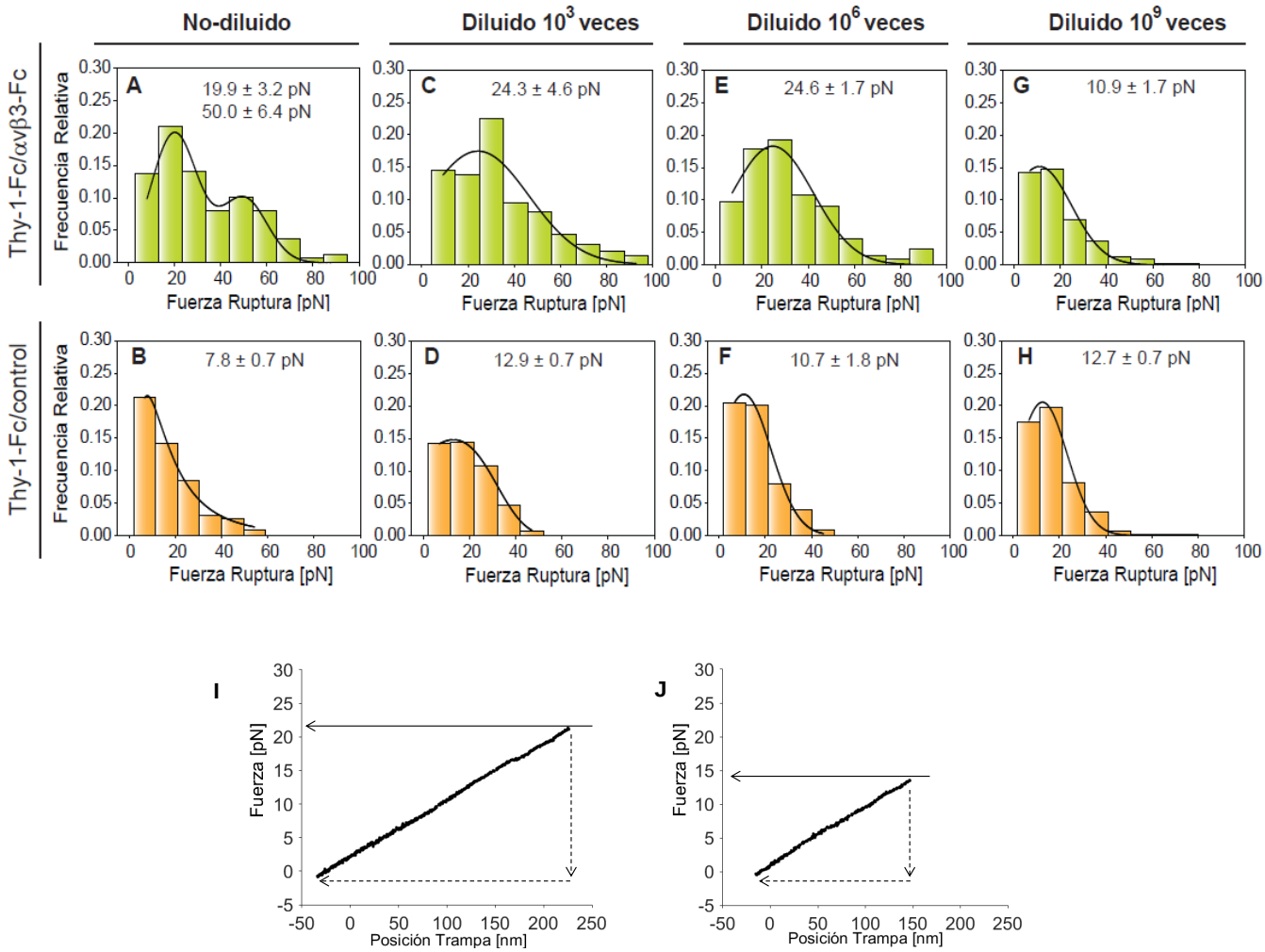


Figura 27. Fuerzas de ruptura para las interacciones específicas y no-específicas de Thy-1-Fc con diferentes diluciones de los sobrenadantes con o sin la integrina αvβ3-Fc. (A-H) Histogramas de fuerzas de ruptura para la interacción entre **(A, C, E, y G)** Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc), o entre **(B, D, F, y H)** Thy-1 y el sobrenadante control que no contiene la integrina (Thy-1-Fc/control). (A y B) Sobrenadantes no-diluidos, o sobrenadantes diluidos (C y D) 10^3 veces, (E y F) 10^6 veces, o (G y H) 10^9 veces. Todos los histogramas resumen por lo menos 300 eventos de unión por cinco pares de esferas nuevas. Las líneas negras en los histogramas corresponden a la curva obtenida luego de aplicar la función Gaussiana para ilustrar la distribución y el "peak" de la fuerza de ruptura. Gráficos representativos de fuerza versus posición de la trampa óptica obtenidos de las mediciones realizadas en las pinzas ópticas entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que (I) contiene la integrina αvβ3-Fc o (J) el sobrenadante control obtenido de células transfectadas con un plasmidio vacío, ambos diluidos 10^6 veces.

O.E. II (2.1.4) Frecuencias de adhesión entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc

De la misma forma que para la interacción Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc, se caracterizó la frecuencia de adhesión entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc, con el objetivo de lograr una mejor caracterización de la especificidad de unión entre la proteína neuronal y la integrina obtenida desde el sobrenadante de células transfectadas, y lograr discriminar entre los eventos de interacción específicos y no-específicos detectados en nuestro sistema experimental. La frecuencia de adhesión fue evaluada para todas las diluciones (no-diluido, diluido 10^3, 10^6 o 10^9 veces) del sobrenadante que contiene la integrina y del sobrenadante control. La mayor frecuencia de adhesión fue observada para la interacción entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc no-diluida (**Figura 28**). A pesar que se observó una tendencia a la disminución en los valores de frecuencia de adhesión cuantificados para las siguientes diluciones del sobrenadante con la αvβ3-Fc (10^3 y 10^6 veces) respecto a los valores obtenidos para el sobrenadante no-diluido, las diferencias no fueron significativas. Una disminución significativa en la frecuencia de adhesión se observó en la interacción entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la αvβ3-Fc diluido 10^9 veces (**Figura 28**). Considerando la similitud de este valor con aquellos cuantificados para la interacción entre Thy-1-Fc y las diferentes diluciones del sobrenadante control, estos resultados indican que los eventos de unión existentes entre Thy-1-Fc y el sobrenadante con la integrina αvβ3-Fc a una dilución de 10^9 veces, corresponden exclusivamente a interacciones no-específicas (comparar barra verde a la dilución de 10^9 veces con barras naranjas, **Figura 28**).

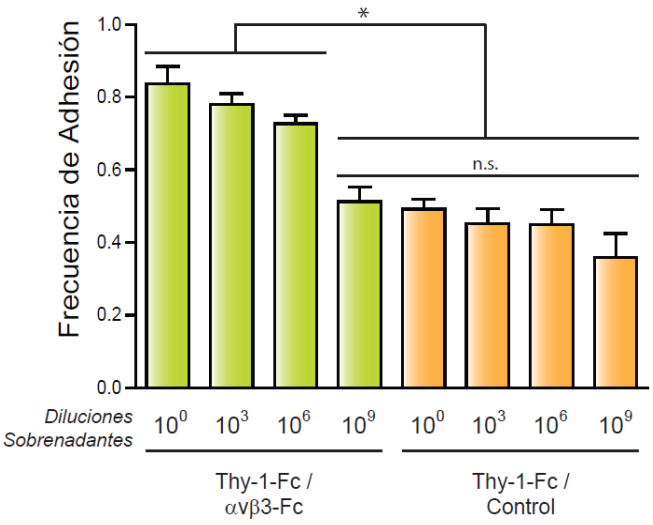


Figura 28. Frecuencias de adhesión entre Thy-1-Fc y el sobrenadante con o sin la integrina αvβ3-Fc utilizando las pinzas ópticas. Frecuencia de adhesión evaluada midiendo el número de total de eventos de unión en al menos 50 ciclos de acercamiento-retracción por 5 pares de esferas nuevas y recién preparadas. Las mediciones se realizaron entre Thy-1-Fc y diferentes diluciones de los sobrenadantes que contienen la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc) o el sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio vacío (Thy-1-Fc/Control). Los resultados son expresados como promedio ± SEM (*p<0,05; n.s. no significativo).

Para corroborar la existencia de eventos de unión específicos entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc a nivel de molécula única (*i.e.* sobrenadante con αvβ3-Fc a una dilución de 10^6 veces), se procedió a caracterizar la interacción entre Thy-1-Fc y el sobrenadante pre-depletado de la integrina αvβ3-Fc. La depleción fue realizada mediante incubaciones sucesivas del sobrenadante que contiene la αvβ3-Fc con esferas de sefarosa cubiertas con proteína A, para asegurar la completa depleción de la proteína de fusión (Ver Materiales y Métodos, **Figura 29A**). La incubación del sobrenadante con las esferas seguido de una centrifugación, permitió obtener un precipitado (complejo αvβ3-Fc-proteína A-sefarosa) y un sobrenadante, el cual fue incubado nuevamente con las esferas de sefarosa, proceso que fue repetido 4 veces. Tanto los sobrenadantes como precipitados obtenidos, fueron evaluados por Western blot con anticuerpo anti-Fc (**Figura 29B**). Sólo luego del cuarto ciclo de incubación/centrifugación, los niveles de αvβ3-Fc fueron indetectables en el precipitado, por lo que el sobrenadante obtenido luego de la 4ta incubación fue utilizado en las pinzas ópticas.

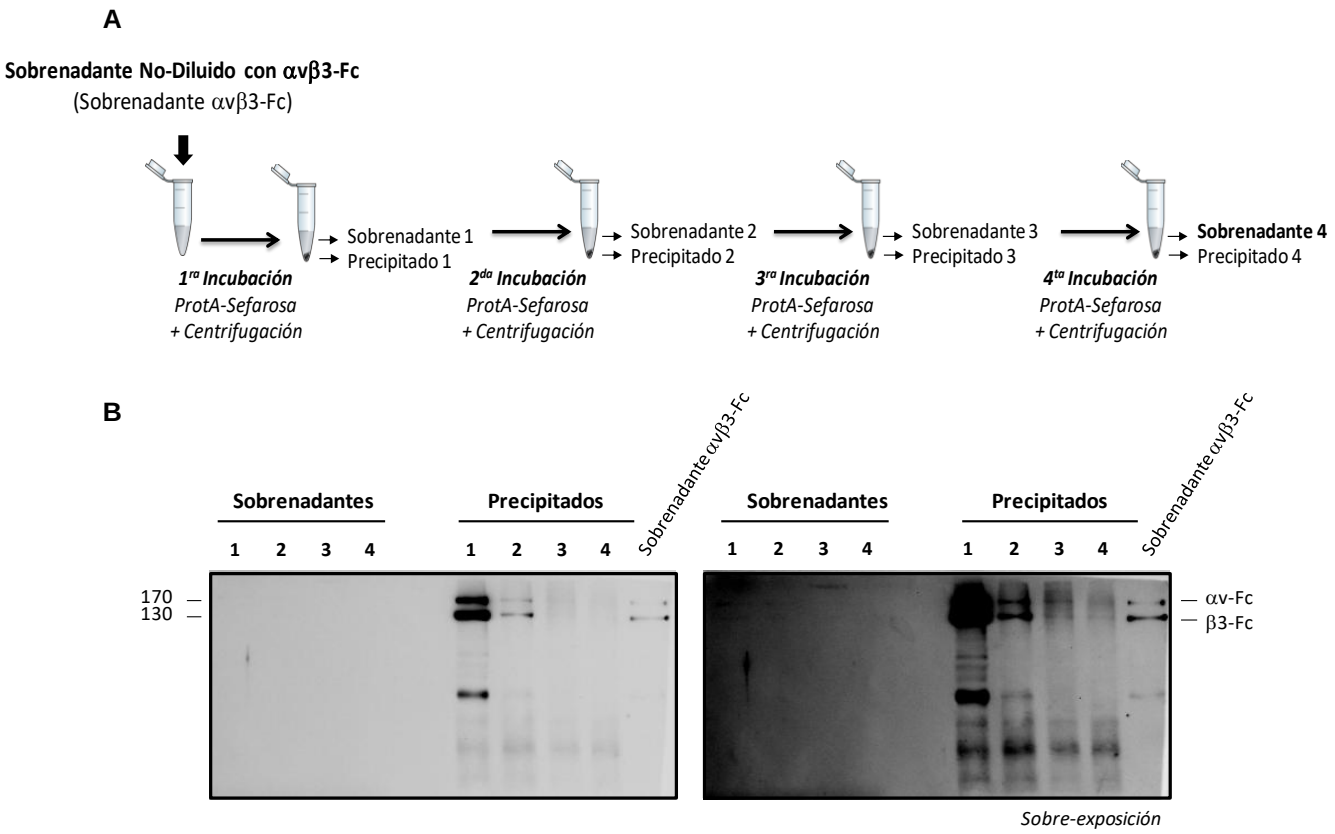


Figura 29. Depleción de la proteína de fusión αvβ3-Fc del sobrenadante de células HEK293T. (A) Representación esquemática del proceso de depleción. El sobrenadante no-diluido que contiene la integrina αvβ3-Fc (sobrenadante αvβ3-Fc; 500 µl) fue incubado con un exceso de esferas de sefarosa cubiertas con proteína A (50 µl) por 1 hora a 4°C, y luego de la centrifugación, se obtuvo el sobrenadante depletado de integrina. Este proceso fue repetido 4 veces, manteniendo la misma relación sobrenadante/esferas de proteína A, para asegurar la completa depleción de la proteína. **(B)** Todas las muestras (precipitados y sobrenadantes) fueron separados en un gel SDS-PAGE y analizados por Western blot con anticuerpos anti-Fc. Las membranas fueron expuestas por 1 minuto (izquierda) o por 5 minutos (derecha; sobre-exposición).

Como se observa en la **Figura 30**, la pre-depleción de la integrina αvβ3-Fc (Thy-1-Fc/depletado αvβ3-Fc) disminuyó la frecuencia de adhesión en aproximadamente un 30% respecto al valor obtenido para Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc). La frecuencia de adhesión entre Thy-1-Fc y el sobrenadante pre-depletado de la integrina fue equivalente al valor obtenido para la interacción entre Thy-1-Fc y el sobrenadante control (Thy-1-Fc/control; **Figura 30**). Estos resultados sugieren que la depleción de la proteína de fusión desde el sobrenadante elimina las interacciones específicas entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3, y que las interacciones no-específicas observadas entre Thy-1-Fc y el sobrenadante pre-depletado son comparables a las

observadas en la situación control (Thy-1-Fc/control). Como una estrategia para demostrar que las interacciones específicas entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc están mediadas por el sitio de unión a integrina de Thy-1 (RLD), usamos la proteína de fusión Thy-1(RLE)-Fc, donde dicho sitio está mutado (RLD-->RLE) (Hermosilla *y cols.*, 2008) (Thy-1(RLE)-Fc/αvβ3-Fc). En este caso, la frecuencia obtenida (Thy-1(RLE)-Fc/αvβ3-Fc), fue similar al valor de frecuencia observado para las interacciones no-específicas (Thy-1-Fc/control; **Figura 30**). Estos resultados confirman la presencia de interacciones específicas entre Thy-1 y la integrina αvβ3-Fc, e indican; i) que los eventos de unión específicos son mediados por la unión del tripéptido RLD de Thy-1 con la integrina y ii) que los eventos de unión no-específicos son independientes del sitio de unión a integrina de Thy-1. Adicionalmente, para estudiar si las interacciones no-específicas dependen de Thy-1-Fc y la proteína G de las esferas de poliestireno, la frecuencia de adhesión fue evaluada entre Thy-1-Fc y las esferas pre-incubadas solo con buffer Hepes (Thy-1-Fc/buffer). Un segundo control fue incluido para medir las interacciones no-específicas, utilizando ambas esferas incubadas solo con buffer (buffer/buffer). El valor de la frecuencia de adhesión entre Thy-1-Fc y las esferas incubadas solo con buffer fue ~53% menor que la condición control con el sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio vacío (*i.e.* Thy-1-Fc/buffer versus Thy-1-Fc/control, **Figura 30**). Notablemente, una disminución significativa en la frecuencia de adhesión también se observó entre las esferas sin nuestras proteínas de interés (*i.e.* Thy-1-Fc/buffer versus buffer/buffer, **Figura 30**), sugiriendo que Thy-1-Fc interacciona no solo con las otras proteínas solubles presentes en el sobrenadante de las células transfectadas, sino que también con las esferas cubiertas con proteína G. Importantemente, estos resultados sugieren que del total de eventos de unión cuantificadas en nuestra estrategia experimental a nivel de molécula-única entre Thy-1-Fc y la integrina no-purificada αvβ3-Fc, sólo ~30% son atribuibles a interacciones específicas entre Thy-1 y la integrina.

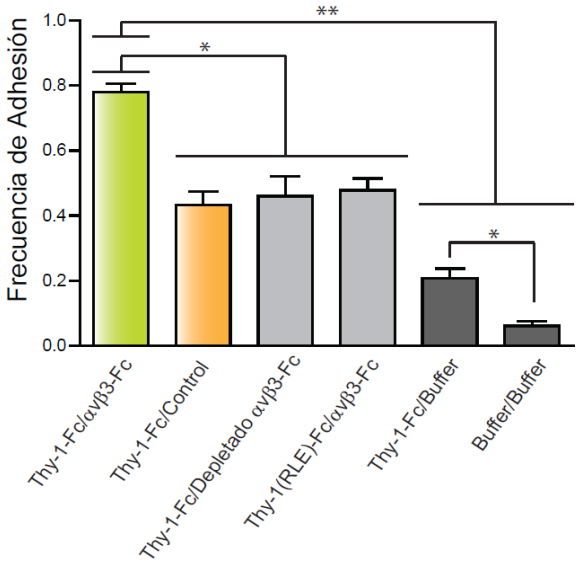


Figura 30. Frecuencias de adhesión entre Thy-1-Fc y diferentes condiciones controles a nivel de molécula-única utilizando las pinzas ópticas. Frecuencia de adhesión evaluada midiendo el número de total de eventos de unión en al menos 50 ciclos de acercamiento-retracción por 5 pares de esferas nuevas y recién preparadas. Las mediciones se realizaron entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc) o el sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio vacío (Thy-1-Fc/Control), ambos sobrenadantes a una dilución de 10^6 veces (condición de molécula-única). Como un control para las interacciones no-específicas, la frecuencia de adhesión también fue evaluada entre Thy-1-Fc y el sobrenadante pre-depletado de la integrina αvβ3-Fc (Thy-1-Fc/Depletado αvβ3-Fc) o con buffer Hepes (Thy-1-Fc/Buffer), así como también entre Thy-1(RLE)-Fc mutado en el sitio de unión a la integrina y el sobrenadante que contiene la proteína αvβ3-Fc (Thy-1(RLE)-Fc/αvβ3-Fc). La frecuencia de unión entre dos esferas también fue evaluada (Buffer/Buffer). Los resultados son expresados como promedio ± SEM (*p<0,05; **p<0.01; n.s. no significativo).

O.E. II (2.1.5) Caracterización de las fuerzas de ruptura resultantes de interacciones no-específicas generadas por Thy-1-Fc

Tal como se planteó para la interacción Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc, los parámetros de unión de la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc pueden ser calculados a partir del histograma de fuerzas de ruptura obtenido para los eventos de unión de molécula-única (**Figura 27E**), aplicando el modelo DHS (Dudko *y cols.*, 2008). Sin embargo, la estrategia experimental diseñada para estudiar la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina no-purificada, permitió cuantificar fuerzas de ruptura representativas de eventos de unión específicos como también aquellos no-específicos. Por lo tanto, para caracterizar los parámetros de unión correctos entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc, se pensó en restar las fuerzas de ruptura generadas por las uniones no-específicas, del total de fuerzas de rupturas obtenidas entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc a nivel de molécula-única. Para estimar el efecto de los eventos de unión no-específicos, las fuerzas

de ruptura fueron medidas a partir de la interacción entre Thy-1-Fc y el sobrenadante control de células transfectadas con el plasmidio vacío (**Figura 27F**). La presencia de solo eventos de unión no-específicos en esta condición fue corroborado a través de la caracterización de fuerzas de ruptura entre Thy-1-Fc y el sobrenadante depletado de $\alpha v\beta 3$-Fc (**Figura 31A**), y entre Thy-1(RLE)-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc (**Figura 31B**). Ambas condiciones mostraron una distribución de las fuerzas de ruptura y un "peak" de fuerza equivalentes a los obtenidos entre Thy-1-Fc y el sobrenadante control (**Figura 27F**), corroborando que en esta condición sólo se observan eventos de unión no-específicos. Estos resultados son consistentes con lo descrito en la Figura 24, donde se muestran valores de frecuencia de adhesión similares para cada condición donde sólo existen interacciones no-específicas.

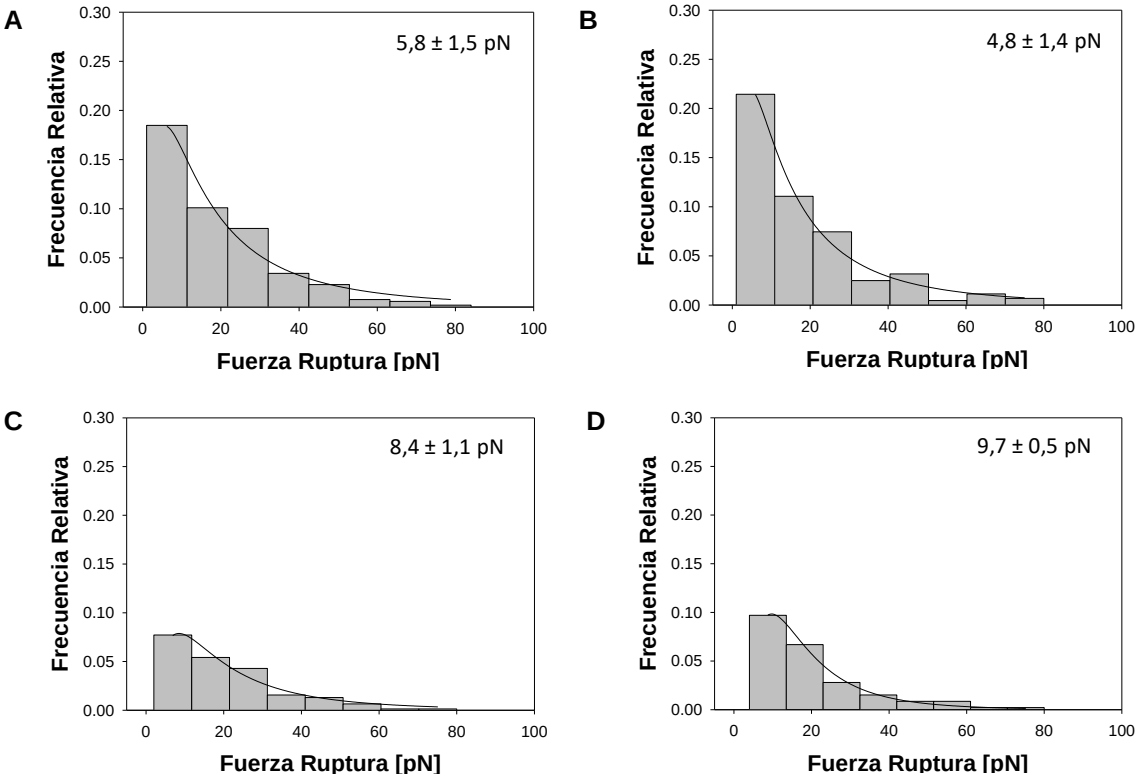


Figura 31. Fuerzas de ruptura para las interacciones no-específicas de Thy-1-Fc. Histograma de fuerzas de ruptura resultantes para la interacción **(A)** Thy-1-Fc con esferas pre-incubadas con el sobrenadante pre-depletado de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc; **(B)** Thy-1(RLE)-Fc con esferas pre-incubadas con sobrenadante que contiene la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc; **(C)** Thy-1(RLE)-Fc con esferas pre-incubadas con $\alpha v\beta 3$-Fc purificado; y **(D)** Thy-1-Fc con esferas pre-incubadas con el buffer Hepes. Todos los histogramas resumen por lo menos 250 eventos de unión por cinco pares de esferas nuevas. Las líneas negras en los histogramas corresponden a la curva obtenida luego de aplicar la función Gaussiana para ilustrar la distribución y el "peak" de la fuerza de ruptura.

O.E. II (2.1.6) Metodología matemática para filtrar las fuerzas de rupturas asociadas a las interacciones no-específicas generadas por Thy-1-Fc

Luego de caracterizar las fuerzas de ruptura asociadas a los eventos de unión no-específicos, se desarrolló una metodología matemática (ver detalles en Materiales y Métodos), que permitió substraer las fuerzas de ruptura no-específicas del total de fuerzas de ruptura obtenidas para Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene αvβ3-Fc (**Figura 27E**). Para una comprensión simplificada, esta metodología matemática se basó en la suposición que el total de fuerzas de rupturas medidas en la condición experimental entre Thy-1-Fc y el sobrenadante control deben resultar sólo de eventos de unión no-específicos, lo que ocurre con una probabilidad $P(\overline{AB})$ (**Figura 32A**). Mientras que el total de fuerzas de ruptura medidas entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc deben resultar de eventos de unión no-específicos y específicos. En este caso, la probabilidad de encontrar eventos no-específicos sigue siendo $P(\overline{AB})$, y la de encontrar eventos específicos fue definida como $P(AB)$ (**Figura 32B**). Dado que ambos eventos son exclusivos y complementarios, $P(\overline{AB}) + P(AB) = 1$, podemos calcular el valor de $P(AB)$. Para determinar la contribución de las interacciones específicas entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc a las fuerzas de ruptura medidas entre Thy-1-Fc y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc, estas fuerzas fueron pesadas por la probabilidad $P(AB)$.

O.E. II (2.1.7) Corrección de fuerzas de ruptura y parámetros de unión de la interacción específica entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc no-purificada

Al aplicar esta corrección matemática, se logró obtener un histograma de fuerzas de ruptura representativo sólo de interacciones específicas Thy-1-Fc/αvβ3-Fc (**Figura 32C**). La aplicación de la función Gaussiana, permitió caracterizar la fuerza de ruptura más probable para la interacción Thy-1/αvβ3-Fc, equivalente a 25,4 ± 1,6 pN. Luego, los tiempos de vida de la interacción Thy-1-Fc/αvβ3-Fc fueron calculados para cada barra del histograma de fuerza de ruptura mediante la Ecuación [1] (Materiales y Métodos; **Figura 32D**). Los tiempos de vida fueron ajustados al modelo no-lineal de DHS descrito en la Ecuación [2] (Materiales y Métodos; **Figura 32D**). Este ajuste permitió caracterizar el perfil energético del proceso de disociación entre Thy-1 y la integrina αvβ3 en ausencia de una fuerza externa (**Figura 32E**). Se obtuvo el tiempo de vida a fuerza cero (τ^0 = 19,30 ± 1,34

s), la constante de disociación (k_{off}^{0} = 0,051 ± 0,003 s^{-1}), la distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$ = 0,50 ± 0,05 nm) y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$ = 5,54 ± 0,47 $k_B T$). Estos resultados indican que a pesar de la condición no-purificada de la integrina, la estrategia matemática y experimental diseñada nos permitió caracterizar los parámetros cinéticos y del estado de transición del proceso de disociación entre Thy-1 y la integrina $\alpha v\beta 3$.

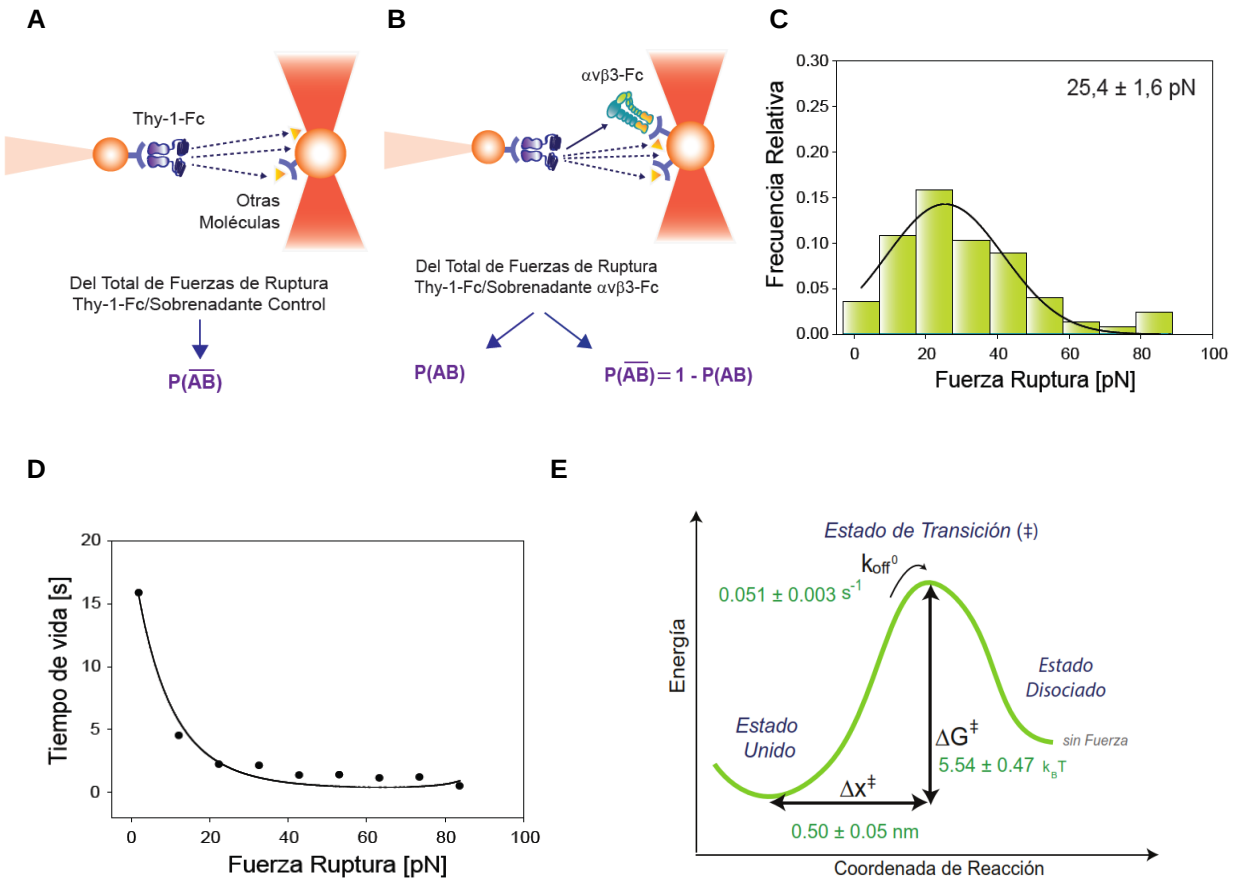


Figura 32. Corrección de los eventos de ruptura no-específicos y cuantificación de los parámetros de unión entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc en el sobrenadante. Para obtener las fuerzas de ruptura representativas sólo de los eventos de unión específicos entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc, se desarrolló una estrategia matemática para restar las fuerzas de ruptura resultantes de eventos de unión no-específicos. Supuestos realizados: **(A)** del total de fuerzas de ruptura observadas entre Thy-1-Fc y el sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio vacío, $P(\overline{AB})$ indica la probabilidad de uniones no-específicas (flechas de líneas discontinuas), y **(B)** del total de fuerzas de ruptura observadas entre Thy-1-Fc y el sobrenadante de células transfectadas con αvβ3-Fc, $P(\overline{AB})$ indica la probabilidad de uniones no-específicas y $P(AB)$ indica la probabilidad de uniones específicas (flecha de línea continua). **(C)** Histograma de fuerzas de ruptura resultante luego de aplicar la corrección matemática, representativo sólo de interacciones específicas Thy-1-Fc/αvβ3-Fc. La línea negra en el histograma corresponde a la curva obtenida luego de aplicar la función Gaussiana para ilustrar la distribución y el "peak" de la fuerza de ruptura. **(D)** Tiempos de vida dependiente de la fuerza para la interacción entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc, calculados a partir de cada barra del histograma mostrado en (C), utilizando el modelo de DHS (Ecuación [1], Materiales y Métodos). La línea negra en (D) corresponde a la curva de ajuste obtenida al utilizar la Ecuación [2] (Materiales y Métodos; υ = 0,5). **(E)** Perfil energético del proceso de disociación entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc, donde se muestra la constante de disociación a fuerza cero (k_{off}^0), distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$), y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$).

O.E. II (2.1.8) Purificación de la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc desde el sobrenadante de células HEK293T transfectadas

A pesar de lograr caracterizar los parámetros de unión entre Thy-1 y la integrina αvβ3 en su condición no-purificada, fue fundamental confirmar los resultados obtenidos, y validar la estrategia matemática diseñada. Para esto, se purificó la integrina αvβ3-Fc desde el sobrenadante, y calculó mediante pinzas ópticas los parámetros de unión entre Thy-1-Fc y la integrina purificada. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad con esferas de sefarosa cubiertas de proteína A (ver detalles en Materiales y Métodos). Tal como se mencionó anteriormente, experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio se enfocaron en purificar la proteína de fusión αvβ3-Fc; sin embargo, estos intentos generaron una proteína no-funcional e inestable (Hermosilla *y cols.*, 2008). Por lo tanto, se implementó la estrategia reportada por Coe y colaboradores para purificar la integrina α5β1-Fc (Coe *y cols.*, 2001), basada en la introducción de mutaciones en los dominios C_H3 de los fragmentos Fc de ambas subunidades, αv-Fc y β3-Fc, para incrementar las posibilidades de heterodimerización de éstas y de esta forma mantener funcional el heterodímero luego de la purificación (Materiales y Métodos). A través de una electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS y tinción de plata, se pudo detectar en el sobrenadante de células transfectadas con αvβ3-Fc la presencia de ambas subunidades, αv-Fc y β3-Fc, así como también la de otras proteínas con mayor movilidad electroforética. Sin embargo, sólo las subunidades αv-Fc y β3-Fc fueron detectadas luego de la purificación (**Figura 33A**). Adicionalmente, los productos de la purificación fueron detectados mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos contra la fracción Fc, bajo condiciones reductores y no-reductoras. Las subunidades αv-Fc y β3-Fc fueron detectadas luego de la purificación bajo condiciones reductoras, mientras que el heterodímero αvβ3-Fc fue encontrado en las condiciones no-reductoras (**Figura 33**, **B** y **C**). De la misma forma que con la integrina αvβ3-Fc no-purificada, la concentración de la integrina pura fue estimada mediante un ensayo de Western blot semi-cuantitativo (**Figura 33**, **D** y **E**). Este análisis permitió determinar una concentración de ~130 nM.

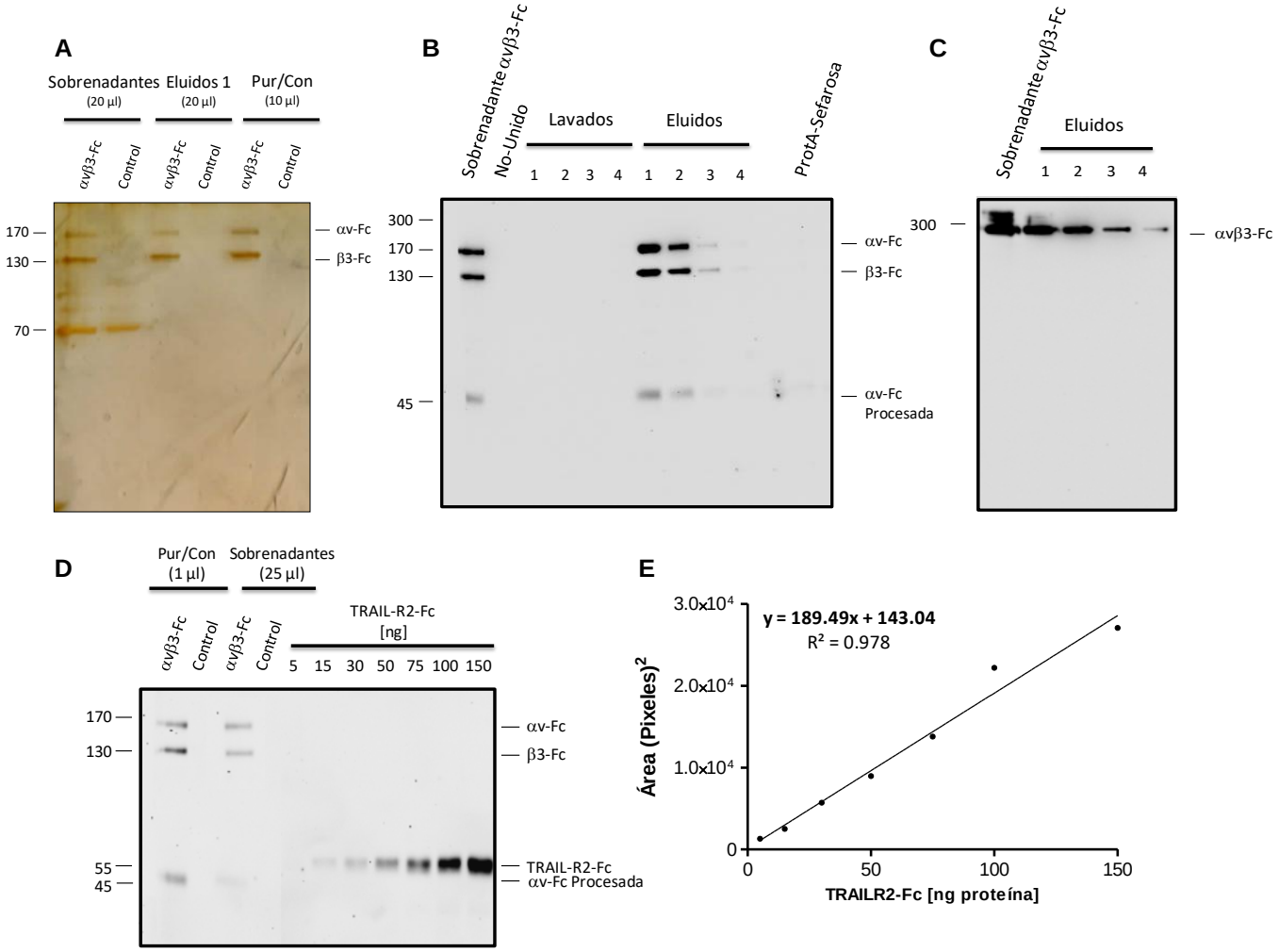


Figura 33. Purificación de la proteína de fusión αvβ3-Fc desde el sobrenadante de células HEK293T transfectadas. (A) SDS-PAGE teñido con plata de los sobrenadantes no-diluidos obtenidos de las células transfectadas (Sobrenadantes αvβ3-Fc y Control; 20 µl), de los primeros eluidos obtenidos durante la purificación (Eluidos 1 αvβ3-Fc y Control; 20 µl), y de los purificados que fueron concentrados 30 veces (Pur/Con αvβ3-Fc y Control; 10 µl). **(B)** Todas las fracciones obtenidas de la purificación (fracción no-unida, lavados, eluidos, y esferas de sefarosa cubiertas con proteína A), y el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc antes de la purificación (Sobrenadante αvβ3-Fc), fueron separados por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y analizadas por Western blot usando anticuerpos anti-Fc. **(C)** SDS-PAGE bajo condiciones no-reductoras y Western blot con anticuerpos anti-Fc, de sobrenadante que contiene la integrina antes de la purificación (Sobrenadante αvβ3-Fc), y los cuatro eluidos obtenidos durante la purificación. Los eluidos recuperados fueron concentrados por exclusión de tamaño (Amicon). **(D)** Western blot semi-quantitativo con anticuerpos anti-Fc, utilizado para estimar la concentración de αvβ3-Fc pura y concentrada (Pur/Con αvβ3-Fc; 1 µl), muestra comparada al sobrenadante no-diluido que contiene la integrina antes de la purificación (Sobrenadante αvβ3-Fc; 25 µl). Como control, el sobrenadante no-diluido de células transfectadas con el plasmidio vacío (Sobrenadante Control; 25 µl) fue sujeto al mismo proceso de purificación y concentración (Pur/Con Control; 1 µl). La curva estándar fue obtenida usando cantidades crecientes de la proteína de fusión TRAIL-R2-Fc. **(E)** Las bandas de TRAIL-R2-Fc fueron escaneadas densitométricamente, y los valores resultantes de área fueron graficados contra las diferentes cantidades de la proteína. La cantidad de la integrina αvβ3-Fc purificada y concentrada en 1 µl fue evaluada utilizando la ecuación de regresión lineal (inserto).

O.E. II (2.1.9) Funcionalidad de la proteína de fusión de la integrina αvβ3-Fc purificada

Para evaluar si la funcionalidad de la proteína αvβ3-Fc se mantuvo luego de la purificación, se realizó un ensayo de ELISA. Como se observa en la **Figura 34**, tanto la integrina αvβ3-Fc no-purificada como la pura se unieron a ligandos que contienen el dominio de unión a integrina RGD, incluyendo la fibronectina, vitronectina y péptidos Kis (Leyton *y cols*., 2001). En contraste, la unión no ocurrió con péptidos que contienen el sitio de unión a integrina mutado (RGE; **Figura 34**), indicando la especificidad de interacción con moléculas que poseen sitio de unión a integrina.

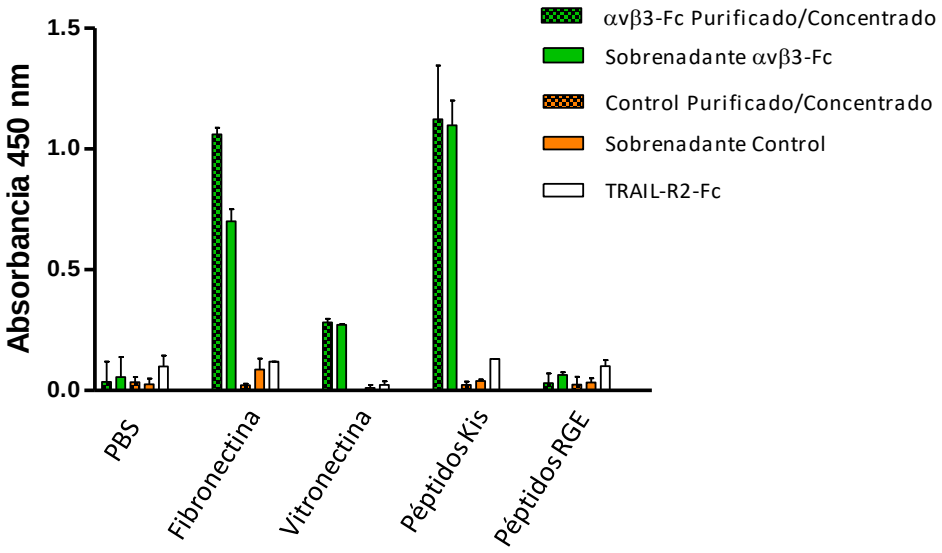


Figura 34. Caracterización de la proteína de fusión αvβ3-Fc purificada. La placa para realizar el ensayo de ELISA fue incubada toda la noche con fibronectina (0,5 µg), vitronectina (1 µg), Péptidos Kis (10 µg), o Péptidos RGE (10 µg) en PBS, y luego bloqueada con 1% BSA/PBS por 1 hora. Luego del lavado, 1 µl de la integrina αvβ3-Fc purificada y concentrada (αvβ3-Fc Purificado/Concentrado) o 25 µl del sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (Sobrenadante αvβ3-Fc) fueron adicionados a la placa e incubados por 2 horas a 37°C. Como control se usó la proteína TRAIL-R2-Fc y el sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio vacío (antes y después del proceso de purificación/concentración). La unión fue detectada con anticuerpos anti-Fc-conjugado a HRP. La presencia de HRP adherido se detectó mediante la oxidación del substrato TMB (Absorbancia a 450 nm). Los resultados son expresados como promedio ± SEM estimados de dos experimentos diferentes realizados en duplicado (**n=2**).

O.E. II (2.1.10) Frecuencia de adhesión y parámetros de unión entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada

Para asegurar la correcta comparación de los parámetros estimados para la proteína de fusión no-purificada, la integrina αvβ3-Fc pura fue diluida 10^6 veces para llevar a cabo los experimentos en las pinzas ópticas. Estos experimentos permitieron obtener el histograma de fuerzas de ruptura entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc pura a nivel de molécula-única, y determinar un "peak" de fuerza de ruptura correspondiente a 24,9 ± 2,1 pN (**Figura 35A**). Para evaluar la especificidad de unión entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc pura, también se evaluó la frecuencia de adhesión. Una mayor frecuencia de adhesión fue observada entre la integrina pura y Thy-1-Fc, en comparación a la condición estudiada con la proteína mutada Thy-1(RLE)-Fc (**Figura 35B**), indicando que la proteína purificada mantiene la capacidad de interaccionar directamente con el dominio RLD de Thy-1-Fc. Considerando que Thy-1-Fc interacciona de manera no-específica con las esferas cubiertas con proteína G, se evaluó la frecuencia de adhesión entre Thy-1-Fc y esferas pre-incubadas con el buffer Hepes. Se observó una frecuencia de adhesión similar a la condición Thy-1(RLE)-Fc/integrina αvβ3-Fc pura (**Figura 35B**). También se encontró un perfil de distribución de fuerzas de ruptura similar para ambas condiciones, Thy-1(RLE)-Fc/integrina αvβ3-Fc pura y Thy-1-Fc/Buffer (**Figura 31**, **C** y **D**). La similitud encontrada en las fuerzas de ruptura y frecuencias de adhesión sugieren la presencia de eventos de unión no-específicos comparables, aun cuando tanto Thy-1-Fc como αvβ3-Fc estén puros. De acuerdo a los resultados mostrados en **Figura 35B**, los eventos de unión no-específicos representan alrededor del 20% de la totalidad de eventos de unión, por lo tanto, para determinar correctamente los parámetros de unión Thy-1-Fc/αvβ3-Fc pura, se propuso aplicar la metodología matemática diseñada en esta tesis, para filtrar las fuerzas de ruptura no-específicas, lo que resultó en una distribución de fuerzas de ruptura con un "peak" de 24,5 ± 1,8 pN (**Figura 35C**). Luego, se calculó los tiempos de vida de la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc (**Figura 35D**), valores que fueron ajustados al modelo no-lineal de DHS. Este ajuste permitió caracterizar el perfil energético del proceso de disociación entre Thy-1 y αvβ3-Fc purificada (**Figura 35E**). Se obtuvo el tiempo de vida a fuerza cero (τ^0 = 27,25 ± 7,70 s), la constante de disociación (k_{off}^0 = 0,036 ± 0,010 s^{-1}), la distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$ = 0,54 ± 0,16 nm) y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$ = 6,16 ± 0,55 $k_B T$). Como se puede ver en la **Tabla I**, estos resultados son

bastante similares a los obtenidos con la integrina no-purificada luego de aplicar el modelo matemático para eliminar las fuerzas de ruptura no-específicas. En conjunto, estos hallazgos indican que la estrategia matemática y experimental desarrollada en esta tesis, permiten caracterizar con precisión los parámetros del proceso de disociación de la interacción Thy-1-Fc/$\alpha v\beta 3$-Fc, aun cuando una de estas proteínas no esté disponible en su estado purificado. Importantemente, estos resultados también indican que los eventos de unión no-específicos son detectados aun cuando ambas proteínas estén purificadas.

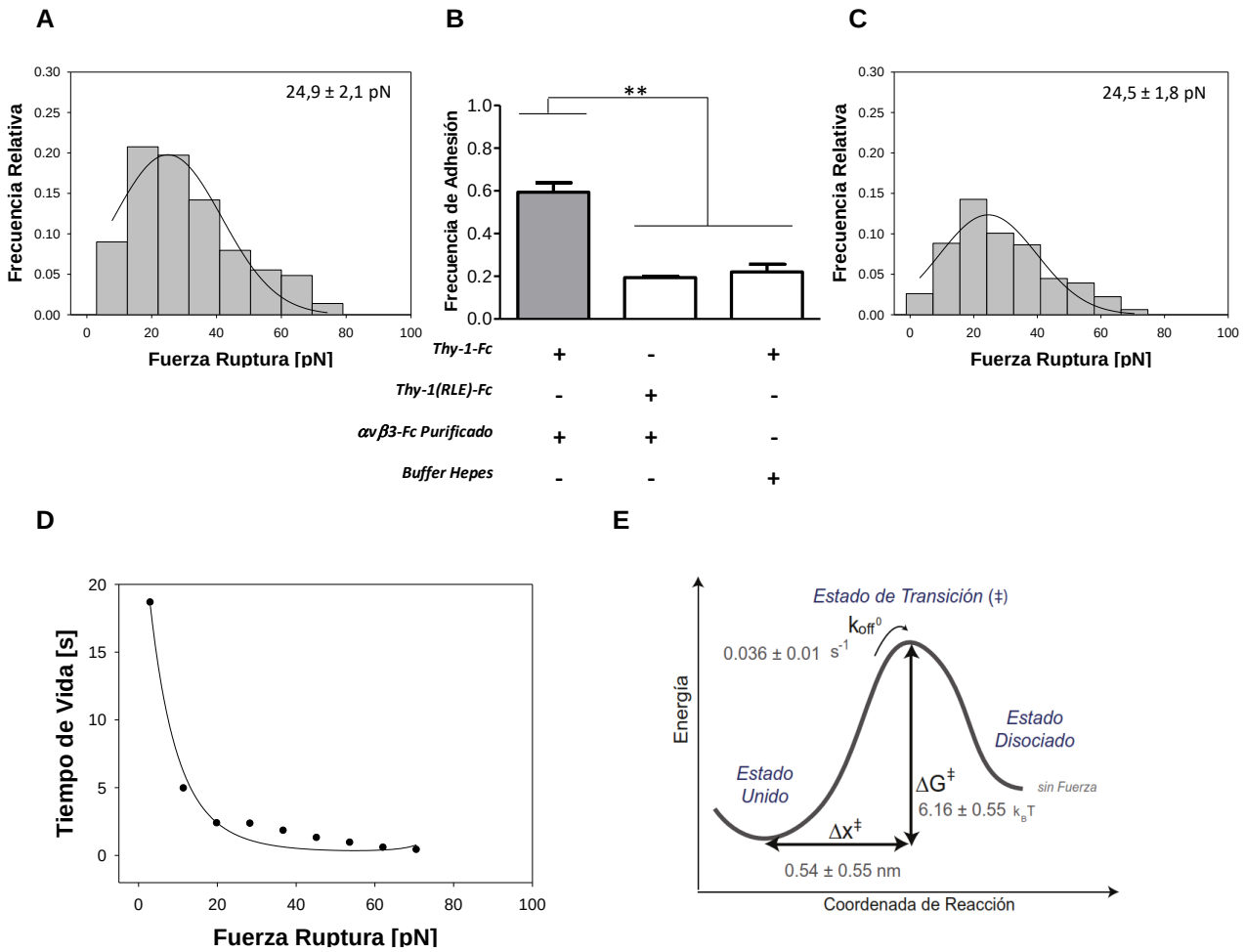


Figura 35. Caracterización de la distribución de fuerzas de ruptura, frecuencia de adhesión y parámetros de unión entre Thy-1-Fc y la proteína de fusión αvβ3-Fc purificada. (A) Histograma de fuerzas de ruptura para la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada a nivel de molécula-única. **(B)** Frecuencia de adhesión evaluada para las condiciones entre Thy-1-Fc/αvβ3-Fc purificada, Thy-1/(RLE)-Fc/αvβ3-Fc purificada, y Thy-1-Fc/Buffer Hepes. Todas las frecuencias de adhesión fueron evaluadas midiendo el número total de eventos de unión en al menos 60 ciclos de acercamiento-retracción por 5 pares de esferas nuevas y recién preparadas. **(C)** Histograma de fuerzas de ruptura para la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada resultante luego de aplicar la metodología matemática para restar las fuerzas de ruptura dadas por uniones no-específicas. Las líneas negras en (A) y (C) corresponden a las curvas obtenidas luego de aplicar la función Gaussiana para ilustrar la distribución y el "peak" de la fuerza de ruptura. **(D)** Tiempos de vida dependiente de la fuerza para la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada. La línea negra en (D) corresponde a la curva de ajuste obtenida al utilizar la Ecuación [2] (Materiales y Métodos; υ = 0,5). **(E)** Perfil energético del proceso de disociación entre Thy-1-Fc y αvβ3-Fc purificada, donde se muestran los valores obtenidos para la constante de disociación a fuerza cero (k_{off}^{0}), distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$), y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$).

Tabla I. Comparación de los parámetros cinéticos y termodinámicos en ausencia de fuerza, obtenidos para la interacciones entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc, ya sea con la integrina en el sobrenadante (no purificada), como purificada (purificada).

Interacción Bimolecular	Tiempo de Vida (τ^0; s)	Constante de Disociación (k_{off}^0; s^{-1})	Distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$; nm)	Energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$; K_BT)
Thy-1-Fc/αvβ3-Fc (no-purificada)	19,30 ± 1,34	0,051 ± 0,003	0,50 ± 0,05	5,54 ± 0,47
Thy-1-Fc/αvβ3-Fc (purificada)	27,25 ± 7,70	0,036 ± 0,010	0,54 ± 0,16	6,16 ± 0,55

O.E. II (2.1.11) Corrección fuerzas de ruptura y cálculo de parámetros de unión precisos entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc

Como se detalló en el párrafo anterior, para calcular los parámetros precisos de unión entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada, las fuerzas de ruptura asociadas a las interacciones no-específicas dadas por Thy-1-Fc (*i.e.* Thy-1-Fc /buffer Hepes; **Figura 35B**), fueron filtradas del total de fuerzas de rupturas calculadas para la interacción Thy-1-Fc/αvβ3-Fc purificada. Considerando esto, se procedió a aplicar la misma estrategia con la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, para así calcular parámetros más precisos de esta unión. En la **Figura 36A**, podemos observar las fuerzas de ruptura resultantes para la interacción Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc, luego de aplicar la metodología matemática para filtrar las fuerzas de ruptura no-específicas dadas por la interacción Thy-1-Fc y esferas incubadas solo con buffer Hepes. Al aplicar la función Gaussiana, se caracterizó la fuerza de ruptura más probable para la unión Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc, correspondiente a 24,2 ±1,6 pN (**Figura 36A**). Luego, se calculó los valores de tiempo de vida para cada barra del histograma (**Figura 36B**), los que fueron ajustados al modelo no-lineal de DHS aplicando la Ecuación [2] (Materiales y Métodos). Este ajuste permitió caracterizar los valores precisos de los parámetros cinéticos y del estado de transición de la interacción Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc. Se obtuvo el tiempo de vida a fuerza cero (τ^0 = 8,89 ± 0,99 s), la

constante de disociación (k_{off}^0 = 0,112 ± 0,012 s^{-1}), la distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$ = 0,26 ± 0,05 nm) y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$ = 3,27 ± 0,44 k_BT) (**Figura 36C**). Al comparar estos resultados con aquellos obtenidos en la Figura 20, podemos ver pequeñas modificaciones en los valores de los parámetros; sin embargo, se mantuvieron dentro del mismo orden de magnitud (**Tabla II**). Destacablemente, con esta estrategia matemática que filtra las fuerzas de ruptura no-específicas, podemos asegurar la obtención de parámetros precisos para la interacción Thy-1-Fc con síndecan-4-Fc, validando el uso de esta metodología.

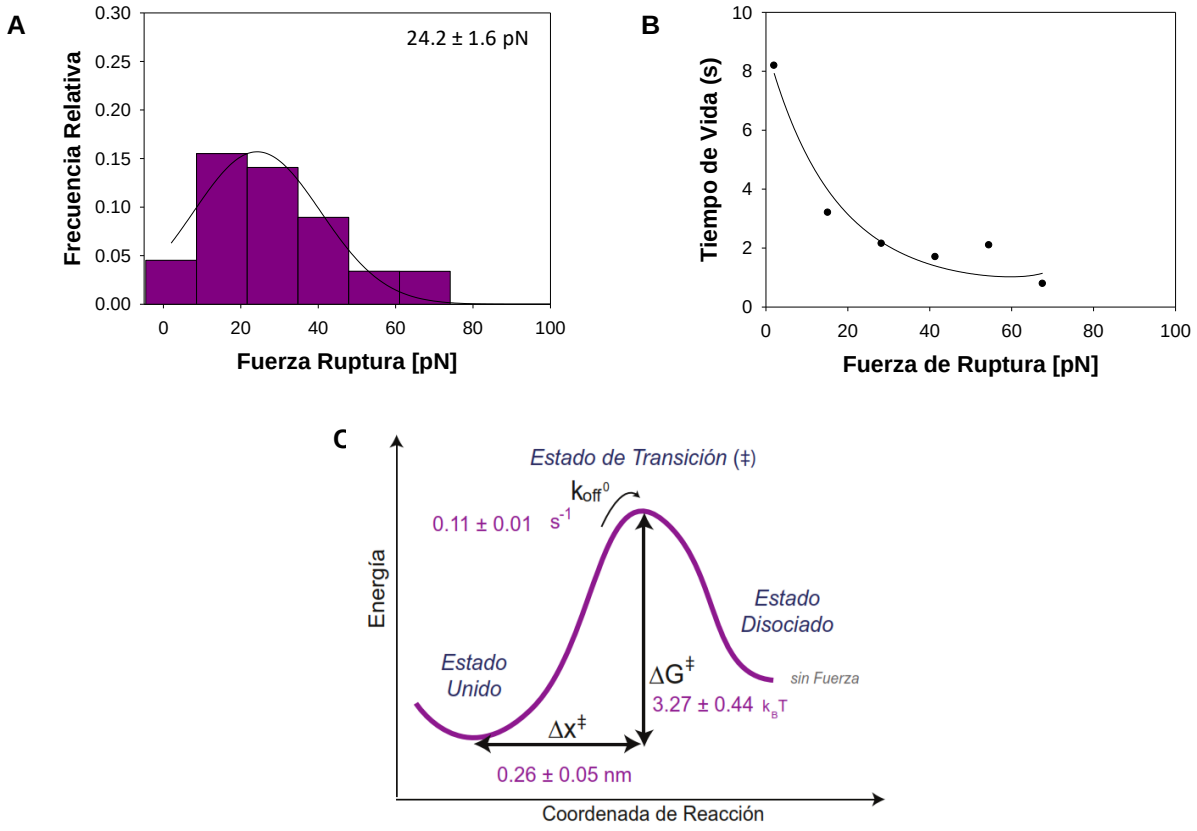


Figura 36. Fuerzas de ruptura y parámetros de unión corregidos entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc a nivel de molécula-única. (A) Histograma de fuerzas de ruptura para la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc. La línea negra en el histograma corresponde a la curva obtenida luego de aplicar la función Gaussiana para ilustrar la distribución y el "peak" de la fuerza de ruptura. **(B)** Tiempos de vida dependiente de la fuerza para la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, calculados a partir de cada barra del histograma mostrado en (A), utilizando el modelo de DHS (Ecuación [1], Materiales y Métodos). La línea negra en (B) corresponde a la curva de ajuste obtenida al utilizar la Ecuación [2] (Materiales y Métodos; υ = 0,5). **(C)** Perfil energético del proceso de disociación entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, donde se indica la constante de disociación a fuerza cero (k_{off}^0), distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$), y la energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$).

Tabla II. Comparación de los parámetros cinéticos y del estado de transición en ausencia de fuerza, obtenidos para la interacción entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc, antes (sin corrección) y después (con corrección) de aplicar la metodología matemática para filtrar las interacciones no-específicas dadas por Thy-1-Fc.

Interacción Bimolecular	Tiempo de Vida (τ^0; s)	Constante de Disociación (k_{off}^0; s^{-1})	Distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$; nm)	Energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$; K_BT)
Thy-1-Fc/ síndecan-4-Fc (sin corrección)	9,96 ± 2,33	0,100 ± 0,023	0,34 ± 0,09	3,74 ± 0,49
Thy-1-Fc/ síndecan-4-Fc (con corrección)	8,89 ± 0,99	0,112 ± 0,012	0,26 ± 0,05	3,27 ± 0,44

O.E. II (2.1.12) Comparación entre las interacciones bimoleculares Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc y Thy-1-Fc/αvβ3-Fc

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que síndecan-4 participa en la inhibición de la extensión de neuritas y retracción de procesos neuronales, a través de su interacción directa con Thy-1. Sin embargo, considerando que síndecan-4 no puede promover ambas respuestas neuronales en ausencia de la integrina αvβ3, se propuso que síndecan-4 podría actuar como un co-ligando de la proteína neuronal, donde su participación estaría relacionada en favorecer la interacción Thy-1/αvβ3, como un posible mecanismo para explicar cómo ambas moléculas actúan conjuntamente en la promoción de los efectos neuronales. Para demostrar su papel como co-ligando, se determinó y comparó los parámetros de unión de ambas interacciones bimoleculares, Thy-1/integrina αvβ3 y Thy-1/síndecan-4. Al compararlos, encontramos un valor mayor de tiempo de vida (τ^0) y por tanto menor constante cinética de disociación (k_{off}^0) para la interacción Thy-1-Fc/αvβ3-Fc (**Tabla III**), indicando que esta interacción es más estable que la interacción Thy-1/síndecan-4 en ausencia de fuerza, es decir, el tiempo que tomará la disociación de la

interacción con Thy-1 será mayor para la integrina que para síndecan-4, lo que podría explicar la ausencia de efecto a nivel neuronal de síndecan-4 en ausencia de la integrina αvβ3. La energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger}$) es mayor para la unión entre Thy-1 y la integrina αvβ3, concordante con el mayor tiempo que toma la disociación de dicha interacción respecto a la de Thy-1 con síndecan-4 (**Tabla III**). Además, el valor de distancia al estado de transición calculado para Thy-1/síndecan-4 (~0,26 nm) difiere al encontrado para Thy-1/αvβ3 (~0,54 nm), indicando que diferentes tipos de enlaces median ambas interacciones bimoleculares, y por tanto, corroborando que los sitios de unión presentes en la molécula de Thy-1 para síndecan-4 y la integrina αvβ3 son distintos. Estos resultados indican que ambas interacciones poseen un perfil cinético y termodinámico diferentes y apoyan el supuesto papel de co-ligando propuesto para el proteoglicano.

Tabla III. Comparación de los parámetros cinéticos y termodinámicos en ausencia de fuerza, obtenidos para la interacción entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc (Thy-1-Fc/αvβ3-Fc) y Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc (Thy-1-Fc/síndecan-4-Fc)

Interacción Bimolecular	**Tiempo de Vida** (τ^0; s)	**Constante de Disociación** (k_{off}^0; s^{-1})	**Distancia al estado de transición** ($\Delta x^{\ddagger}$; nm)	**Energía libre de activación** ($\Delta G^{\ddagger}$; K_BT)
Thy-1-Fc/ αvβ3-Fc	27,25 ± 7,70	0,036 ± 0,010	0,54 ± 0,16	6,16 ± 0,55
Thy-1-Fc/ síndecan-4-Fc	8,89 ± 0,99	0,112 ± 0,012	0,26 ± 0,05	3,27 ± 0,44

RESULTADOS ANEXOS

A continuación, se detallan los resultados adicionales obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral, que apoyan los resultados mostrados anteriormente y que podrían conducir a futuras investigaciones.

(1) Niveles de $[Ca^{+2}]_i$ durante el proceso de retracción de neuritas de células CAD inducido por αvβ3-Fc y síndecan-4-Fc

Inicialmente en esta tesis doctoral, se propuso evaluar si síndecan-4 modula eventos de señalización neuronal responsables de la inhibición en la extensión de neuritas y retracción de procesos neuronales dependientes de la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina astrocítica αvβ3. Lo anterior, con el objetivo de complementar la caracterización de la participación del proteoglicano en los fenómenos neuronales. Este propósito se incluyó dentro de un tercer objetivo específico, establecido como *"Evaluar si la interacción entre αvβ3, síndecan-4 y Thy-1 modula eventos de señalización, específicamente un incremento del Ca^{+2} citosólico e inhibición de Src, durante los procesos de retracción e inhibición del crecimiento de procesos neuríticos"*. Sin embargo, por razones de tiempo y de acuerdo a lo sugerido por la comisión durante el primer avance de tesis, el trabajo se enfocó en completar los objetivos específico I y II. A pesar de esto, se logró obtener algunos resultados interesantes descritos a continuación.

Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio identificaron que la vía de señalización neuronal río abajo de Thy-1, activada por la integrina astrocítica αvβ3 y responsable del remodelamiento del citoesqueleto que conduce a la retracción de neuritas en células CAD, corresponde a la vía RhoA/ROCK/Cofilina (Maldonado *y cols.*, 2017). Resultado concordante con lo descrito previamente para las moléculas inhibitorias de la regeneración neuronal, específicamente aquellas asociadas a la mielina (Nogo, MAG, OMpg) y los proteoglicanos de condroitín sulfato (Yiu y He, 2006). Interesantemente, también se ha descrito que los efectos neuronales inducidos por Nogo, MAG y OMpg están precedidos de un incremento rápido y transitorio en la concentración de Ca^{+2} intracelulares ($[Ca^{+2}]_i$) (Bandtlow *y cols.*, 1993; Snow *y cols.*, 1994; Wong *y cols.*, 2002). Considerando la similitud en las vías de señalización activadas por Thy-1 y las moléculas inhibitorias asociadas a la mielina, se propuso evaluar si la retracción de los procesos

neuronales de células CAD promovido por la integrina $\alpha v\beta 3$, está precedido por un incremento de $[Ca^{+2}]_i$, y si este fenómeno es afectado por el proteoglicano síndecan-4. Los niveles de calcio se midieron a través de indicadores que entran a la célula y exhiben un aumento en su fluorescencia al unirse a calcio (Fluo-4-AM), en células CAD diferenciadas morfológicamente sobre una placa de cultivo e incubadas con las proteínas de fusión de la integrina ($\alpha v\beta 3$-Fc) y síndecan-4 (síndecan-4-Fc). A nivel experimental, se logró estandarizar la técnica de medición de calcio y se determinó el efecto individual de ambas proteínas de fusión. Luego de 2 minutos de medición de los cambios de fluorescencia de las células CAD incubadas con Fluo-4-AM, se adicionó el sobrenadante que contiene la proteína de fusión de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, o el sobrenadante con la proteína síndecan-4-Fc. Como control, se adicionó el sobrenadante de células no-transfectadas. La adición de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc provocó inmediatamente un incremento en la fluorescencia (**Figura 37A**), efecto que también se observó tras la adición del sobrenadante control (**Figura 37C**), sugiriendo un efecto experimental. Sin embargo, a diferencia del control, luego de 6 minutos de incubación con $\alpha v\beta 3$-Fc, se observó un incremento drástico de dos veces la fluorescencia inicial en los procesos neuronales, indicando un incremento en los niveles de Ca^{+2}_i (**Figura 37A**). Este "peak" de calcio se repitió a los 10 y 14 minutos luego de la adición de $\alpha v\beta 3$-Fc. De la misma forma que ocurrió para el sobrenadante control y del que contiene la integrina, la adición de síndecan-4-Fc, generó un incremento drástico en la fluorescencia, el cual disminuyó rápidamente, llegando a niveles basales de fluorescencia (**Figura 37B**). A diferencia del efecto observado con $\alpha v\beta 3$-Fc, luego de 1 minuto de incubación con síndecan-4-Fc, se observó un leve incremento en los niveles de Ca^{+2}_i, sin embargo este incremento comenzó a disminuir luego de 3 minutos de incubación, llegando a niveles basales luego de 6 minutos. Estos resultados sugieren que el incremento de calcio a nivel intracelular podría ser parte de las señales intracelulares que inducen la retracción de las neuritas inducida por la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, y explicar por qué el proteoglicano por sí solo no genera un efecto en el largo de los procesos neuronales. Es fundamental complementar esta caracterización, asociando los niveles de calcio al largo de las neuritas en el tiempo, además de evaluar el efecto de ambas proteínas en conjunto.

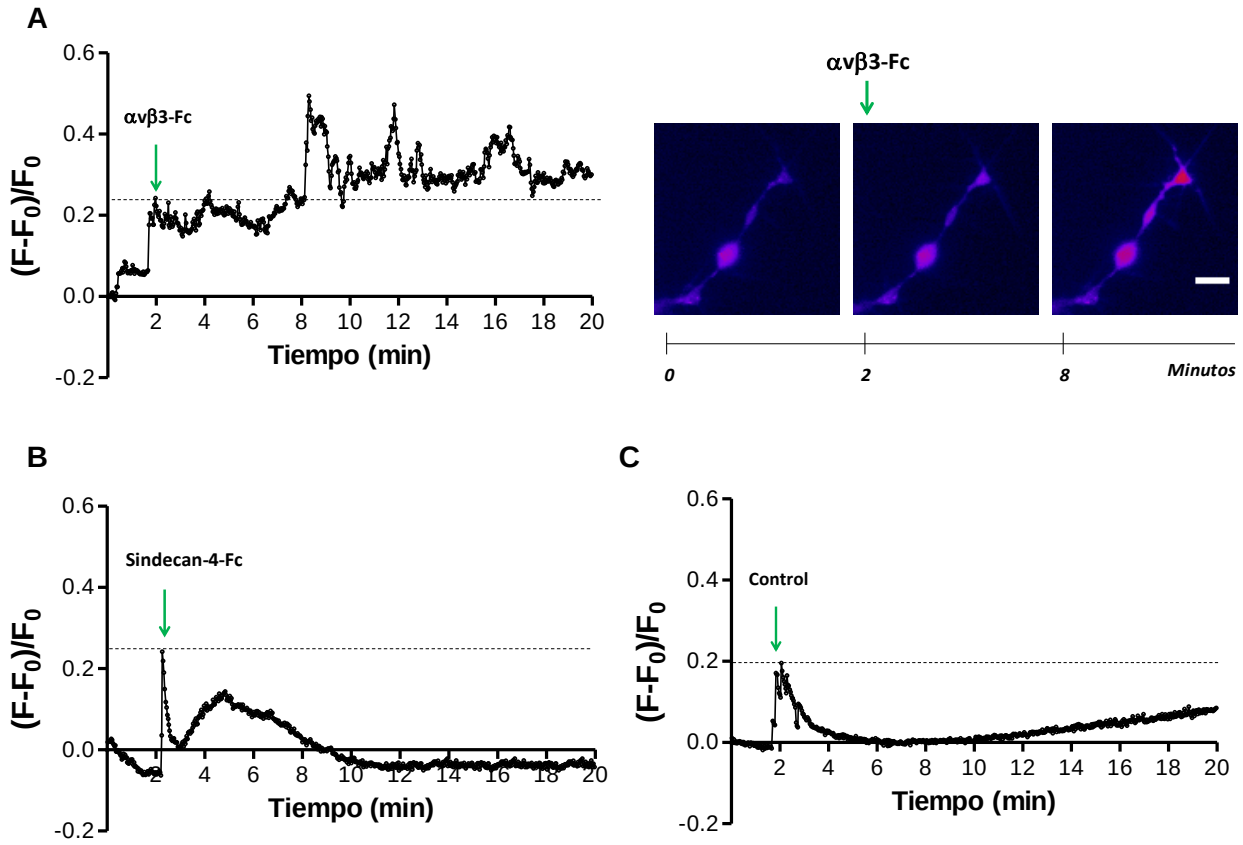


Figura 37. Niveles de $[Ca^{+2}]_i$ en células CAD diferenciadas morfológicamente tras la adición de las proteínas de fusión αvβ3-Fc o síndecan-4-Fc. Células CAD (5.000 células/cm^2) diferenciadas morfológicamente en placas con un volumen final de 500 µl, fueron incubadas con el marcador Fluo-4-AM (1 µM) durante 30 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas y mantenidas en Buffer Tyrode durante la medición de los cambios de fluorescencia, evaluación realizada cada 2 segundos por 20 minutos. Los cambios de fluorescencia fueron medidos al adicionar 50 µl de sobrenadante de células HEK293T que contiene **(A)** la integrina αvβ3-Fc, **(B)** síndecan-4-Fc, o **(C)** sobrenadante de células no-transfectadas. En (A) también se muestran imágenes representativa del incremento de calcio inducido por la adición de αvβ3-Fc obtenidas con Microscopio Confocal Spinning Disk 40X. Barra 20 µm. Los cambios de fluorescencia fueron cuantificados en 50 células por condición usando Image J, específicamente en los procesos neuronales, y normalizados por la fluorescencia inicial. Los resultados son representativos de un experimento (**n=1**).

(2) Extensión de neuritas de células CAD en proceso de diferenciación, sembradas sobre astrocitos primarios transfectados con integrina β3.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que la sobre-expresión de la integrina β3 en astrocitos primarios, mediante la transfección con el vector β3-GFP, resulta en la promoción de un perfil tipo-reactivo capaz de responder a Thy-1 (Lagos-Cabré *y cols*., 2017). En estos astrocitos, la sobre-expresión de la integrina β3 resultó adicionalmente en un incremento en los niveles del proteoglicano síndecan-4 y marcadores de reactividad astrocítica, como GFAP e iNOS, sugiriendo que solo el incremento de la expresión de la integrina β3 es suficiente para que los astrocitos muestren un fenotipo reactivo. La incubación con citoquinas pro-inflamatorias lleva a un fenotipo reactivo donde se ve un aumento de ambas proteínas. Considerando estos resultados, se propuso evaluar la capacidad de estos astrocitos β3-GFP positivos para inducir la inhibición en la extensión de los procesos neuronales de células CAD en proceso de diferenciación morfológica. Para esto, se sembró células CAD sobre astrocitos primarios transfectados con el vector β3-GFP (**Figura 38A**), para luego, inducir la extensión de los procesos neuronales en un medio sin suero. La sobre-expresión de la integrina β3 provocó una inhibición en la extensión de las neuritas (~20 µm), en comparación a la condición donde células CAD fueron sembradas directamente sobre la placa de cultivo (~55 µm, **Figura 38**, **B** y **C**). Como se esperaba, cuando las células CAD fueron sembradas sobre astrocitos transfectados con el vector control (GFP), condición donde los niveles de la integrina β3 son casi indetectables mediante el ensayo de Western blot (**Figura 38A**), no se observó una inhibición en la extensión de las neuritas, cuantificando un largo promedio de las neuritas de ~50 µm. Estos resultados sugieren que la sola sobre-expresión de la integrina β3 promueve una inhibición del crecimiento de neuritas. De todas formas, es fundamental repetir estos experimentos y evaluar si la inhibición en el crecimiento de los procesos se debe a la acción de la integrina αvβ3 en combinación a síndecan-4, utilizando estrategias experimentales similares a las aplicadas en el objetivo específico I. De esta forma, se apoyaría consistentemente el perfil tipo-reactivo, inducido por la sola sobre-expresión de la integrina β3 en astrocitos primarios.

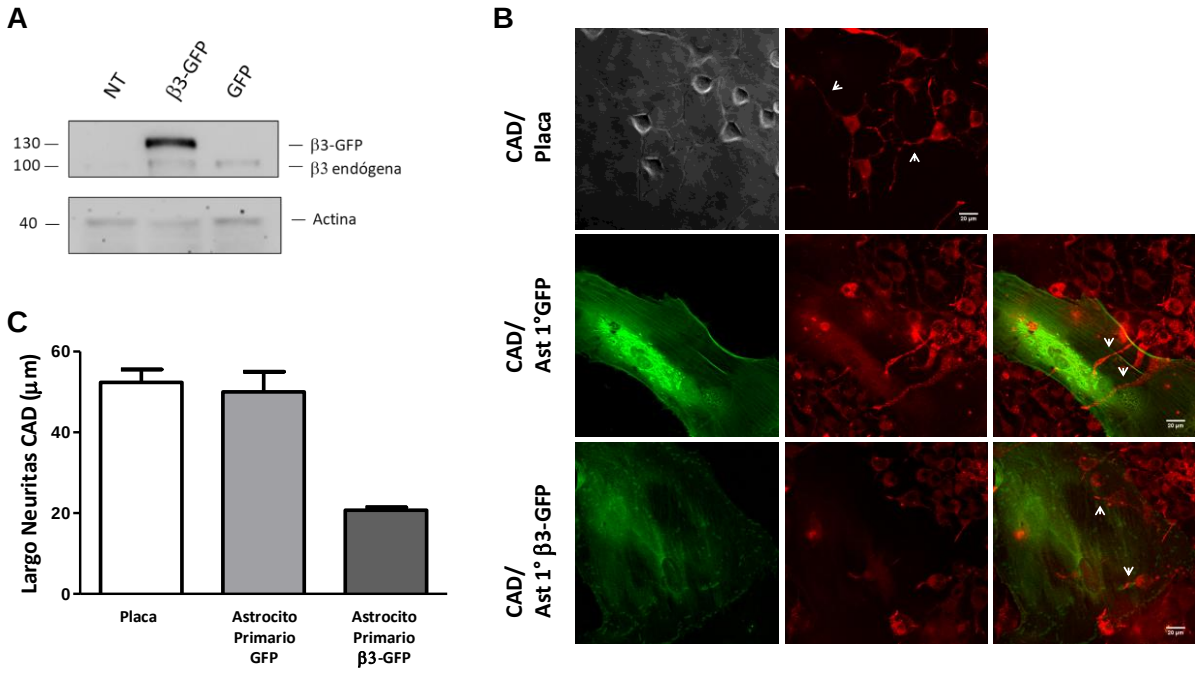


Figura 38. Efecto de astrocitos primarios transfectados con la integrina β3-GFP sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD. (A) Cultivos de astrocitos primarios (25.000 células/cm^2) no transfectados (NT), transfectados con GFP o transfectados con vector β3-GFP fueron mantenidas por 48 horas a 37°C. Las células fueron lisadas y las proteínas de los extractos fueron separadas por SDS-PAGE en geles al 10%, para luego ser analizadas mediante Western blot con anticuerpo anti-β3 o anti-actina. **(B)** Células CAD (5.000 células/cm^2), marcadas con una tinción vital roja (10 µM; *Cell tracker* rojo), fueron sembradas sobre la placa o sobre astrocitos primarios transfectados con vector β3-GFP o GFP, y mantenidas en cultivo por 24 horas a 37°C. La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero por otras 24 horas a 37°C. En la figura se muestran microfotografías representativas de las condiciones experimentales, obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i. Barra 20 µm. Flechas blancas indican neuritas extendidas sobre placa de cultivo o astrocitos primarios. **(C)** Cuantificación del largo promedio de las neuritas (µm), evaluada en 50 células por condición. Los resultados son expresados como promedio ± SEM (**n=2**).

(3) Extensión de neuritas de células CAD en proceso de diferenciación morfológica, sembradas sobre astrocitos primarios provenientes de un modelo animal de la enfermedad neurodegenerativa Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Los modelos de astrocitos utilizados en esta tesis, caracterizados por altos niveles de expresión de la integrina β3, síndecan-4, y marcadores de reactividad como GFAP, fueron la línea celular DITNC1 y astrocitos primarios bajo condiciones pro-inflamatorias. Con estos modelos celulares se logró determinar que la inhibición en la extensión y retracción de procesos neuronales dadas por la comunicación neurona-astrocito, dependen de las interacción entre la proteína neuronal Thy-1 y las proteínas astrocíticas integrina αvβ3 y síndecan-4. En la literatura se ha reportado ampliamente que los astrocitos son el principal impedimento para la regeneración axonal en el sistema nervioso central luego de una lesión (Sofroniew, 2009), asignando un papel importante a los proteoglicanos de condroitín sulfato (Silver y Miller, 2004). Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que tanto la integrina αvβ3 como síndecan-4, podrían ser identificados como nuevos componentes astrocíticos que contribuyen al ambiente no-permisivo de la regeneración axonal dada por los astrocitos reactivos y es probable que sean relevante en condiciones patológicas del SNC. Con el objetivo de poner nuestros hallazgos en un contexto más fisiopatológico, se propuso utilizar como modelo de astrocito reactivo a los astrocitos primarios provenientes de un modelo de ratón de la enfermedad neurodegenerativa Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Este modelo es un ratón transgénico hemicigoto que expresa la enzima Superóxido Dismutasa humana mutada ($hSOD^{G93A}$) (Apolloni *y cols.*, 2013; van Zundert *y cols.*, 2012). Nuestro laboratorio caracterizó estos astrocitos tipo-ELA, identificando altos niveles de la integrina β3, síndecan-4 y marcadores de reactividad como GFAP, Conexina-43 e iNOS, en comparación a los astrocitos primarios provenientes de ratones transgénicos que sobre-expresan hSOD "wild type" ($hSOD^{wt}$) (Lagos-Cabré *y cols*., 2017. Manuscrito en revisión en *J. Neuroinflammation*). Considerando estos resultados, se propuso evaluar mediante ensayos de co-cultivo, el efecto de estos astrocitos primarios sobre la extensión de los procesos neuronales de células CAD en proceso de diferenciación morfológica. Para esto, se sembró células CAD sobre astrocitos primarios $hSOD^{wt}$ o $hSOD^{G93A}$, para luego, inducir la extensión de los procesos neuronales en un medio sin suero. Células CAD extendieron largos procesos cuando fueron sembradas directamente sobre la placa de cultivo (~48 µm), efecto que se repitió al sembrarlas sobre astrocitos $hSOD^{wt}$ (~41 µm) (**Figura 39**, **A** y **B**). En contraste,

se observó una reducción en el largo de las neuritas cuando las células CAD fueron co-cultivadas con astrocitos hSOD^{G93A}, logrando un largo de ~18 µm. Este resultado representa solo un experimento; sin embargo, se puede observar que los astrocitos tipo-ELA tienden a inhibir el crecimiento de los procesos neuronales, en comparación a los astrocitos "wild type". De la misma forma que los resultados mostrados en la Figura 32, es fundamental repetir estos experimentos y evaluar la participación de la integrina $\alpha v\beta 3$ y síndecan-4 en la inhibición de la extensión de las neuritas de células CAD generadas por los astrocitos provenientes del modelo animal de ELA, para comprobar de esta forma el efecto de las dos proteínas astrocíticas a un nivel más cercano a la condición *in vivo* de reactividad astrocítica.

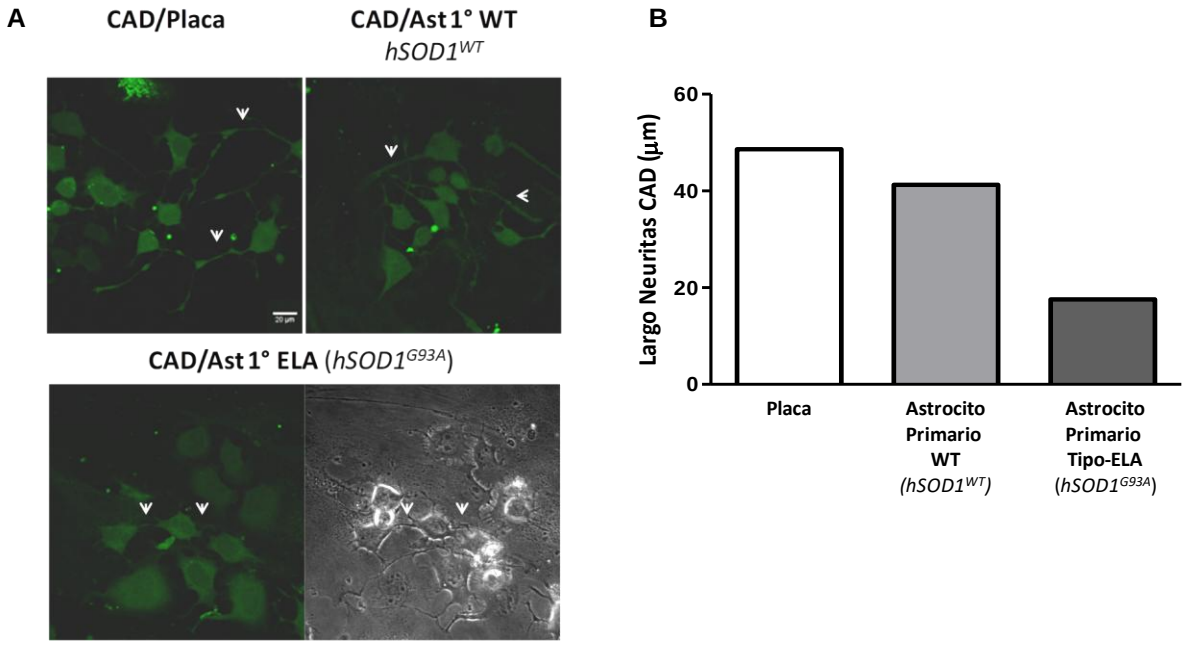


Figura 39. Efecto de astrocitos tipo-ELA sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD. Células CAD (5.000 células/cm^2), marcadas con una tinción vital verde (*Cell Tracker Green* CMFDA, 10 µM), fueron sembradas sobre una placa de cultivo o sobre astrocitos primarios provenientes de un modelo animal de la enfermedad neurodegenerativa Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA; hSOD^{G93A}) o animales "wild type" (hSOD^{wt}). La extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero durante 24 horas a 37°C. **(A)** Microfotografías representativas de las condiciones experimentales, obtenidas con Microscopio Confocal Fluoview FV10i. Barra 20 µm. Flechas blancas en (A) indican las neuritas de células CAD sobre placa de cultivo o astrocitos primarios. **(B)** Cuantificación del largo promedio de las neuritas (µm), evaluada en 100 células por condición. Estos resultados son representativos de un experimento realizado en duplicado (**n=1**).

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura Suplementaria 1

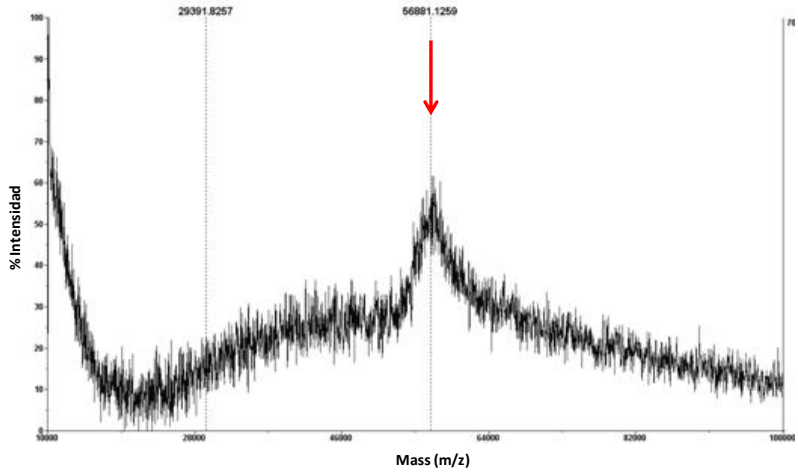


Figura Suplementaria 1. Determinación del peso molecular de la proteína de fusión síndecan-4-Fc mediante espectrometría de masas. Espectro de masas de síndecan-4-Fc. El espectro se obtuvo en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Abi Sciex) en el modo de adquisición lineal (*lineal High*) positivo. Flecha roja indica peso "peak" de peso molecular aproximado de 56,88 kDa. No fue posible una determinación exacta de la masa molecular producto de la baja resolución de la señal. (Datos obtenidos por Horacio Maldonado durante su pasantía doctoral en Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay)

DISCUSIÓN

1. Síndecan-4 participa en la inhibición del crecimiento de neuritas de células CAD

En este objetivo se muestra que el proteoglicano de heparán sulfato (HSPG), síndecan-4, expresado en la superficie de la línea celular de astrocitos DITNC1 y astrocitos primarios bajo condiciones pro-inflamatorias, participa en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales de células tipo-neurona CAD inducido por el contacto célula-célula entre astrocitos y neuronas; fenómeno descrito por nuestro laboratorio como dependiente de la interacción proteica entre Thy-1 neuronal y la integrina astrocítica $\alpha v\beta 3$ (Hermosilla *y cols.*, 2008; Herrera-Molina *y cols.*, 2012; Leyton *y cols.*, 2001).

Estudios *in vitro* realizados previamente por nuestro laboratorio, demostraron que la comunicación neurona-astrocito mediada por la interacción en *trans* entre Thy-1 neuronal y la integrina astrocítica $\alpha v\beta 3$, promueve la inhibición de la extensión de procesos neuronales (Herrera-Molina *y cols.*, 2013). Estos resultados sugirieron que la integrina $\alpha v\beta 3$, molécula sobre-expresada en astrocitos bajo condiciones patológicas del SNC, como trauma e isquemia (Ellison *y cols.*, 1999; Ellison *y cols.*, 1998), correspondería a un componente de la superficie celular de los astrocitos que, a través de su interacción con la proteína neuronal Thy-1, contribuiría al ambiente no-permisivo para la regeneración axonal en el SNC luego de un daño, indicando por tanto, que la integrina $\alpha v\beta 3$ cumpliría un papel importante en la respuesta de los astrocitos frente a un daño en el SNC (Herrera-Molina *y cols.*, 2012; Maldonado *y cols.*, 2017). Otras moléculas presentes en astrocitos e involucradas en la inhibición de la regeneración axonal son los proteoglicanos de condroitin sulfato (CSPGs). Luego de una lesión en el SNC, los astrocitos adquieren un fenotipo reactivo, caracterizado entre otras cosas, por la sobre-expresión y secreción de los CSPGs en el sitio de la lesión, específicamente donde se está formando la cicatriz glial (Asher *y cols.*, 2001; Properzi y Fawcett, 2004; Silver y Miller, 2004). Se ha descrito ampliamente que tanto el "core" proteico como las cadenas de condroitin sulfato de los CSPGs ejercen de manera independiente una acción inhibitoria de la regeneración axonal (Asher *y cols.*, 2001; Bandtlow y Zimmermann, 2000; Moon *y cols.*, 2001). En contraste, existe poca información en la literatura sobre la regulación y función de los proteoglicanos de heparán sulfato astrocíticos en respuesta a una condición patológica del SNC.

En este contexto, se ha evidenciado que las cadenas de heparán sulfato son sobre-expresadas en la cicatriz glial luego de una lesión al sistema nigroestriatal del SNC

(Properzi y Fawcett, 2004). Así también, luego de diversos daños al cerebro, se ha observado en astrocitos reactivos la sobre-expresión de varios tipos de HSPGs, entre éstos, glipican 1 (Hagino *y cols.*, 2003), y sindecanos (Iseki *y cols.*, 2002; Properzi *y cols.*, 2008). Respecto a estos últimos, se ha determinado que un crio-daño a nivel cortical del SNC de ratones está asociado a un incremento en la expresión de los sindecanos (sindecan-1, -2, -3 y -4), específicamente en los astrocitos reactivos presentes alrededor de la cicatriz glial, exhibiendo un "peak" en los niveles de mRNA a los 7 días post-daño (Iseki *y cols.*, 2002). Estos antecedentes son concordantes con lo encontrado en este trabajo, donde se observó un incremento en los niveles endógenos de síndecan-4 en cultivos de astrocitos primarios de rata mantenidos bajo condiciones pro-inflamatorias dadas por la citoquina TNF-α (Lagos-Cabré *y cols*., 2017), molécula que ha sido reportada como gatillante de la activación de la reactividad astrocítica (Buffo *y cols.*, 2010; Xie y Zheng, 2008), y que concordantemente, promovió el incremento en los niveles endógenos del marcador de reactividad, GFAP. Estas condiciones pro-inflamatorias también indujeron un incremento en los niveles de la integrina $\alpha v\beta 3$ en los astrocitos primarios (Lagos-Cabré *y cols*., 2017), resultado consistente con la sobre-expresión encontrada *in vivo* luego de una lesión al SNC.

El incremento de los sindecanos en astrocitos reactivos presenta un patrón de expresión que se superpone con los del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos FGF tipo 1 (FGFR-1), por lo que considerando que FGF induce el fenotipo reactivo en astrocitos *in vivo* e *in vitro* (Goddard *y cols.*, 2002) y el papel de co-receptor de FGF reportado para síndecan-4 (Carey, 1997), algunos autores han postulado que la sobre-expresión de HSPGs en los astrocitos en respuesta a una lesión podría potenciar la señalización del factor de crecimiento FGF y regular la reactividad de los astrocitos y la formación de la cicatriz glial (Iseki *y cols.*, 2002; Santos-Silva *y cols.*, 2007). Por otra parte, también se ha postulado que este aumento de HSPGs en los astrocitos reactivos, específicamente síndecan-2 y -4, interferiría la interacción entre los factores promotores del crecimiento axonal (*e.g.* HB-GAM, "heparin-binding growth-associated molecule") y sus receptores neuronales (*e.g.* glipican-2), lo que resultaría en el favorecimiento del ambiente no-permisivo presente en el SNC luego de una lesión, al impedir que dichos factores induzcan el crecimiento y regeneración axonal (Properzi y Fawcett, 2004; Yamaguchi, 2001).

Aun cuando los astrocitos reactivos son componentes claves del ambiente no-permisivo de la regeneración axonal en el SNC, y a pesar del reportado incremento de los

HSPGs en los astrocitos luego de un daño, pocos estudios se han enfocado en aclarar la función de estos proteoglicanos en la respuesta de los astrocitos frente a un daño. Por ello, en este trabajo se planteó estudiar *in vitro* la participación de los HSPGs astrocíticos en la inhibición del crecimiento de neuritas, a través de ensayos de co-cultivo entre astrocitos y las células tipo-neuronas CAD en proceso de diferenciación morfológica, es decir, en proceso de extensión de las neuritas (Qi *y cols.*, 1997). Ensayo previamente utilizado para determinar la participación de la integrina $\alpha v\beta 3$ en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales dependiente de Thy-1 (Herrera-Molina *y cols.*, 2012), y que permite exponer a las neuritas en crecimiento las diferentes moléculas de la superficie astrocítica. En los experimentos de co-cultivo, los astrocitos son fijados antes de sembrar sobre éstos las células CAD, para evitar el "cross-linking" de la integrina y la respuesta migratoria de los astrocitos inducida por Thy-1 (Leyton *y cols*., 2001; Ávalos *y cols*., 2004; Kong *y cols*., 2013; Álvares *y cols*., 2016). De acuerdo a estudios realizados previamente por nuestro laboratorio, la fijación no interfiere con la actividad de la integrina $\alpha v\beta 3$, ya que la inhibición del crecimiento de neuritas se observó en co-cultivos realizados tanto con astrocitos fijados como sin fijación (Herrera-Molina *y cols*., 2012). Sin embargo, es importante tener en consideración que la fijación podría estar sub-estimando la acción de las moléculas astrocíticas, al evitar que éstas puedan redistribuirse en la superficie celular y agruparse en "clusters" de mayor tamaño en respuesta a Thy-1, lo que subsecuentemente podría favorecer la señalización dependiente de Thy-1 y los efectos neuronales. En este trabajo se identificó que el solo bloqueo de las cadenas de HS de la superficie de los astrocitos permitió reducir significativamente la inhibición del crecimiento de las neuritas inducido por el astrocito, efecto similar al obtenido al bloquear la integrina $\alpha v\beta 3$, indicando que los HSPGs participan en la inhibición de la extensión de procesos neuronales observada en la comunicación neurona-astrocito. Los HSPGs tienen diferentes patrones de expresión en el SNC, en particular en la superficie de los astrocitos reactivos podemos encontrar algunos miembros de la familia de sindecanos, como síndecan-1, -2, y -4, y algunos miembros de la familia de los glipicanos, como glípican-1, -4, -5 y -6 (Iseki *y cols.*, 2002; Properzi *y cols.*, 2008). Previamente nuestro laboratorio determinó que en la comunicación bidireccional neurona-astrocito mediada por la interacción integrina $\alpha v\beta 3$/Thy-1, los eventos celulares hacia los astrocitos requieren adicionalmente de los HSPGs astrocíticos, en particular de síndecan-4 (Ávalos *y cols*., 2009), razón por la cual en este trabajo se estudió la participación específica de síndecan-4 en los fenómenos de inhibición del crecimiento de neuritas. El silenciamiento de la

proteína llevó a una disminución del efecto inhibitorio de la extensión de las neuritas de células CAD generado por los astrocito, sugiriendo que síndecan-4 participa en la acción inhibitoria del crecimiento de procesos neuronales. Interesantemente, también se observó que la proteína de fusión síndecan-4-Fc, al ser adicionada a una placa de cultivo para que forme un matriz en conjunto a la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, provoca una mayor inhibición en la extensión de las neuritas de células CAD en comparación a la inhibición observada en ausencia del proteoglicano, corroborando que síndecan-4 participa y amplifica el efecto inhibitorio inducido por la integrina $\alpha v\beta 3$.

En los ensayos de co-cultivo, los tratamientos con heparitinasa, heparina, y el silenciamiento de síndecan-4, redujeron la inhibición de la extensión de neuritas generada por los astrocitos, y destacablemente, este efecto se vio potenciado cuando dichos tratamientos fueron acoplados al bloqueo de la integrina astrocítica $\alpha v\beta 3$, logrando incrementar más del doble la extensión de las neuritas respecto a la condición donde los astrocitos no fueron tratados previamente. Sin embargo, en ninguna condición donde se bloqueó tanto los HSPGs como la integrina $\beta 3$, se logró observar una extensión de las neuritas similar al logrado por las células CAD al ser sembradas directamente sobre una placa de cultivo, es decir, en ninguna condición se evitó completamente la inhibición del crecimiento de procesos neuronales inducido por los astrocitos. Estos resultados sugieren que adicionalmente, otras moléculas de la superficie del astrocito podrían estar promoviendo la inhibición del crecimiento de las neuritas. En este sentido, las otras moléculas astrocíticas que podrían estar ejerciendo una acción inhibitoria son los proteoglicanos de condroitin sulfato, principalmente a través de las cadenas de CS (Bradbury *y cols.*, 2002; Gilbert *y cols.*, 2005; Snow *y cols.*, 1994). La mayoría de los CSPGs son secretados al medio extracelular (Properzi y Fawcett, 2004), por lo tanto, debido a que en nuestro ensayo de co-cultivo sólo estamos evaluando las moléculas de la superficie celular de los astrocitos, podríamos descartar la participación de este tipo de proteoglicanos en la inhibición del crecimiento de neuritas de células CAD. Cabe mencionar que se ha reportado un tipo de CSPG de transmembrana denominado NG2, que es sobre-expresado luego de una lesión en el SNC y que ejerce una fuerte acción inhibitoria de la regeneración axonal (Dou y Levine, 1994; Levine, 1994; Lorber, 2006; Nishiyama *y cols.*, 1996); sin embargo, éste es selectivamente expresado en la superficie de los oligodendrocitos precursores *in vivo* (Horner *y cols.*, 2002). De todas formas, habría que evaluar si en nuestros modelos de astrocitos, NG2 está presente, ya que se describió que la línea celular de astrocitos Neu7 expresa altos niveles de NG2 en su superficie

(Fidler *y cols.*, 1999). Interesantemente, tanto síndecan-1 como síndecan-3, poseen cadenas de HS y CS en su estructura (Kokenyesi y Bernfield, 1994; Szatmari *y cols.*, 2015). Considerando ésto, las cadenas de CS de síndecan-1 y síndecan-3 podrían estar participando en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales de células CAD ejercida por los astrocitos. No obstante, esto se deberá caracterizar en futuros trabajos, a través del pre-tratamiento de los astrocitos con la enzima condroitinasa, para remover las cadenas de CS del "core" proteico (Yamagata *y cols.*, 1968). Los receptores neuronales de las cadenas de CS que inducen su acción inhibitoria sobre la regeneración axonal, son las proteínas de transmembrana tirosina fosfatasa, PTPσ (Shen *y cols.*, 2009), y los receptores de Nogo, NgR1 y NgR2 (Dickendesher *y cols.*, 2012). Por lo tanto, también habría que evaluar si la línea celular tipo-neuronas CAD expresa en su superficie dichos receptores y si éstos son capaces de modular el posible efecto inhibitorio de las cadenas de CS. Es importante destacar que el mecanismo de acción de las cadenas de CS sería diferente al mediado por la integrina $\alpha v\beta 3$ y síndecan-4, ya que el receptor neuronal de la integrina es Thy-1 (Hermosilla *y cols.*, 2008; Herrera-Molina *y cols.*, 2012; Leyton *y cols.*, 2001), al igual que para síndecan-4 considerando los resultados obtenidos en esta tesis (discutido más adelante).

Los HSPGs han sido involucrados en la respuesta a un daño en el SNC; sin embargo, las funciones específicas no han sido caracterizadas. Tal como se mencionó, sus funciones han sido asociadas mayoritariamente a la regulación de la reactividad astrocítica (Iseki *y cols.*, 2002; Santos-Silva *y cols.*, 2007). Además, basándose en el papel reportado para los HSPGs durante el desarrollo del SNC, donde éstos regulan la neuritogénesis, crecimiento axonal hacia los blancos correctos y formación de las sinapsis (Van Vactor *y cols.*, 2006; Yamaguchi, 2001), algunos autores han sugerido que estas moléculas podrían estar cumpliendo una función similar luego de una lesión al SNC. Algunos estudios apoyan este postulado, por ejemplo, se ha reportado que el tratamiento *in vivo* con glípican mejora la sobrevivencia neuronal y la recuperación del comportamiento, luego de una isquemia cerebral en ratones, mientras que *in vitro*, este tratamiento incrementa el crecimiento de neuritas (Coles *y cols.*, 2011). Así también, se ha visto que la introducción de heparán sulfato exógeno en nervios ciáticos lesionados de roedores resulta en la regeneración axonal y remielinización de éstos (Yamaguchi, 2001). Sin embargo, en la literatura también existen estudios que postulan una función inhibitoria del crecimiento de procesos neuronales de los HSPGs. Estudios realizados con membranas plasmática libre de mielina aisladas desde cerebros lesionados de ratas

adulta, y enriquecidas en proteoglicanos de condroitin y heparán sulfato, indicaron que éstas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las neuritas en cultivos primarios de neuronas de hipocampo y retina, en contraste al efecto promotor del crecimiento de neuritas inducido por membranas aisladas de cerebros normales de ratas adultas (Bovolenta *y cols.*, 1993). Es más, estas membranas también indujeron el colapso del cono de crecimiento y retracción (Bovolenta *y cols.*, 1997; Bovolenta *y cols.*, 1993). Importantemente, todas estas propiedades inhibitorias fueron disminuidas significativamente al pre-tratar los extractos de membranas con la enzima heparitinasa y de menor forma al tratarlas con condroitinasa, apoyando el postulado que los HSPG ejercen un papel inhibitorio del crecimiento de neuritas. Este efecto se caracterizó como dependiente de las cadenas de glicosaminoglicanos, y no del "core" proteico, ya que el pre-tratamiento con proteasas no afectó la inhibición de la extensión de neuritas (Bovolenta y Fernaud-Espinosa, 2000; Bovolenta *y cols.*, 1993). Adicionalmente, se reportó que las membranas obtenidas desde el cerebro expuesto a una lesión están enriquecidas en membranas provientes de astrocitos reactivos (Bovolenta y Fernaud-Espinosa, 2000), sugiriendo que el efecto inhibitorio inducido por los HSPGs luego de una lesión están asociados a su expresión en los astrocitos, concordante con lo observado en este trabajo, donde la acción inhibitoria del crecimiento de neuritas promovida por síndecan-4 depende de su expresión en los astrocitos.

Es fundamental mencionar que previamente se han mostrado resultados controversiales respecto a la función de los proteoglicanos en el crecimiento neuronal. Por ejemplo, a pesar de la conocida acción inhibitoria de los CSPGs, se ha evidenciado acciones promotoras del crecimiento axonal para algunas de éstas moléculas. Por ejemplo, la habilidad para promover la extensión de las neuritas ha sido observada para el proteoglicano denominado DSD-1-PG (fosfocan murino), que contiene tanto cadenas de condroitin sulfato como dermatán sulfato. Esta molécula expresada en las células gliales promueve activamente *in vitro* el crecimiento de neuritas de neuronas de rata embrionarias (E14) de mesencéfalo e hipocampo (Faissner *y cols.*, 1994). Los autores indicaron que esta actividad es atribuida a los niveles de sulfatación de las cadenas de este proteoglicano, que poseen una secuencia única de hexasacaridos (Clement *y cols.*, 1998). Otros estudios han mostrado que células NG2 positivas promueven el crecimiento axonal en cultivos de neuronas hipocampales y corticales *in vitro* (Yang *y cols.*, 2006). Así como también substratos ricos en NG2 favorecen la extensión de axones descendentes y ascendentes de la medula espinal lesionada de ratas (Jones *y cols.*, 2003). Ensayos *in*

vitro demostraron que los CSPG neurocan y fosfocan son capaces de ejercer una fuerte acción inhibitoria del crecimiento de axones de neuronas cerebelares, corticales y talámicas, de manera dependiente de la concentración de los proteoglicanos (Maeda y Noda, 1996; Margolis *y cols.*, 1996; Pearlman y Sheppard, 1996). Sin embargo, en presencia de fibronectina o polilisina, son capaces de promover la extensión de las neuritas de diferentes tipos celulares, producto de su interacción con moléculas de adhesión como N-CAM y Ng-CAM (Friedlander *y cols.*, 1994; Milev *y cols.*, 1994). Para explicar este efecto dual, Kinnunen y colaboradores propusieron que los efectos inhibitorios de CSPGs podrían estar siendo enmascarados y equilibrados a través de su interacción con las diferentes moléculas de adhesión, específicamente en regiones donde los niveles de estas proteínas de adhesión es alto (Grumet *y cols.*, 1996; Kinnunen *y cols.*, 1999). Adicionalmente, se ha reportado que la modulación del efecto sobre la extensión de las neuritas generada por los CSPGs depende del tipo neuronal y de la forma en que los proteoglicanos son presentados a la neuronas. Por ejemplo, cuando los CSPG son distribuidos de manera gradual y escalonada, se observa el crecimiento de los axones de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), ganglionales de la retina, y del prosencéfalo, en contraste a la inhibición del crecimiento observado cuando las neuronas son expuestas a altas concentraciones de CSPG (Snow y Letourneau, 1992). A pesar que este efecto inhibitorio se visualizó en los tres tipos celulares, las neuronas DRG fueron las más sensibles al efecto de CSPG. En esta tesis se utilizó como modelo neuronal la línea celular CAD derivadas de neuronas catecolaminérgicas cerebelares, por lo tanto, considerando estos antecedentes, sería deseable corroborar la función descrita para síndecan-4 con otros tipos neuronales.

El hecho de identificar que síndecan-4 astrocítico participa en la inhibición del crecimiento de procesos neuronales inducido por la comunicación neurona-astrocito, previamente descrito como dependiente de la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha v\beta 3$ astrocítica, representa un avance en la caracterización de la función que éste tipo de proteoglicanos podría cumplir *in vivo* en la respuesta celular de los astrocitos luego de un daño en el SNC. Sugiriendo que síndecan-4, en adición a la integrina $\alpha v\beta 3$, podría ser parte de las moléculas astrocíticas que promueven un ambiente no-permisivo para la regeneración axonal.

2. Síndecan-4 participa en la retracción de procesos neuronales de células CAD

En este objetivo se logró identificar que síndecan-4, por sí solo, no genera un cambio en la extensión de las neuritas de células CAD diferenciadas morfológicamente, sino que hace más rápida la retracción de procesos neuronales inducida por la integrina $\alpha v\beta 3$.

Luego de una lesión al SNC, el segmento axonal distal a la lesión experimenta el proceso de degeneración, mientras que el extremo del segmento proximal forma un cono de crecimiento distrófico, caracterizados por una forma inusual tipo-globular, que no logra regenerarse producto del ambiente no-permisivo que lo rodea, y que tiende a alejarse del sitio de la axotomía mediante el proceso de retracción axonal. En el caso que la lesión sea cercana al soma, la retracción conlleva a una degeneración y muerte celular (Siddique y Thakor, 2014; Wang *y cols.*, 2012; Yiu y He, 2006). Respecto a los inductores de retracción, se han descrito algunas moléculas que promueven dicho fenómeno neuronal. Por ejemplo, la proteína Efrina A1, regulador del desarrollo neuronal y sobre-expresada luego de un daño, promueve el colapso del cono de crecimiento y retracción de los procesos neuronales corticales mediante la interacción con el receptor neuronal tirosina quinasa EphA4 (Beg *y cols.*, 2007; Coulthard *y cols.*, 2012). Así también, se ha reportado que los macrófagos activados, mediante una interacción célula-célula con los axones dañados, son capaces de promover la retracción axonal (Horn *y cols.*, 2008). En este contexto, nuestro laboratorio estableció previamente mediante ensayos *in vitro* que la integrina $\alpha v\beta 3$, como proteína de fusión $\alpha v\beta 3$-Fc, estimula la retracción de la porción distal de procesos neuronales, en la línea celular tipo-neuronas CAD diferenciadas morfológicamente y en cultivos primarios de neuronas corticales maduras, proceso dependiente de la interacción con Thy-1 neuronal (Herrera-Molina *y cols.*, 2012).

En esta tesis se observó que la proteína de fusión de síndecan-4 (síndecan-4-Fc) no generó un cambio significativo en la extensión de las neuritas de células CAD previamente diferenciadas morfológicamente. Esto en contraste al efecto inducido por la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, la cual promueve la retracción de las neuritas a los 20 minutos de incubación, tal como se reportó previamente (Herrera-Molina *y cols.*, 2012; Maldonado *y cols.*, 2017). Sin embargo, cuando las células CAD fueron incubadas con ambas proteínas de fusión, se observó una retracción de los procesos neuronales a los 5 minutos de incubación, sugiriendo que síndecan-4-Fc disminuye el tiempo al cual la integrina soluble $\alpha v\beta 3$-Fc promueve la retracción de los procesos neuronales, es decir, acelera la

respuesta neuronal. Este efecto se puede evidenciar con la velocidad promedio a la que ocurren los cambios morfológicos de las neuritas durante los primeros 5 minutos de incubación, la velocidad de retracción tras la adición de la integrina αvβ3-Fc corresponde a 1,34 ± 0,07 µm/min, mientras que la adición de ambas proteínas (αvβ3-Fc más síndecan-4-Fc) incrementa la velocidad de retracción a 3,63 ± 1,23 µm/min. Esta diferencia de velocidad de retracción entre ambas condiciones se mantuvo durante los primeros 20 minutos de incubación, ya que a los 40 minutos, las velocidades de retracción alcanzaron valores similares (αvβ3-Fc: 0,68 ± 0,01 µm/min; αvβ3-Fc/síndecan-4-Fc: 0,52 ± 0,12 µm/min), corroborando que la función del proteoglicano tendría relación con acelerar la acción de la integrina αvβ3-Fc haciéndola más eficiente, ya sea favoreciendo la constante de asociación entre Thy-1/αvβ3 o disminuyendo su constante de disociación (discutido más adelante). Es importante también mencionar que los cambios de extensión de las neuritas tras la adición de la integrina αvβ3-Fc se deben solo al proceso de retracción y no a un desbalance entre crecimiento/retracción (Herrera-Molina *y cols*., 2012), sugiriendo que el efecto de síndecan-4 está directamente asociado al proceso de retracción inducido por la integrina αvβ3.

Este resultado se podría relacionar con los fenómenos neuronales observados *in vivo*, considerando solo los niveles de expresión de las proteínas Thy-1, integrina αvβ3 y síndecan-4, ya sea bajo condiciones normales como en respuesta a un daño al SNC. Los niveles de la integrina αvβ3 son casi indetectables en los astrocitos postnatales, o en astrocitos maduros de individuos adultos bajo condiciones fisiológicas normales (Kanamori *y cols.*, 2004; Milner y Campbell, 2006); sin embargo, en condiciones patológicas como enfermedades neurodegenerativas (Milner y Campbell, 2006), o isquemia (Ellison *y cols.*, 1999; Ellison *y cols.*, 1998), los astrocitos cambian su fenotipo a uno reactivo y sobre-expresan esta integrina. Por lo tanto, considerando que las neuronas expresan altos niveles de Thy-1 (Herrera-Molina *y cols.*, 2013), se podría esperar que la retracción de los procesos neuronales inducidos por la integrina αvβ3-Fc *in vitro*, también ocurriese *in vivo* luego de una lesión al SNC, producto del incremento en la expresión de dicha integrina en respuesta al daño. En contraste, bajo condiciones fisiológicas normales, se ha demostrado que los astrocitos sí expresan síndecan-4 en su superficie celular (Hsueh y Sheng, 1999; Iseki *y cols.*, 2002). Considerando los altos niveles de Thy-1 en las neuronas y que se ha reportado que un solo astrocito puede contactar hasta 10^5 sinapsis (Bushong *y cols.*, 2002) y cientos de dendritas (Halassa *y cols.*, 2007), se podría esperar

que síndecan-4 astrocítico esté normalmente en contacto con Thy-1 neuronal. Por lo tanto, la ausencia de retracción de los procesos neuronales dada por síndecan-4-Fc *in vitro* es un resultado concordante con la esperado ocurra *in vivo*, donde se espera que el largo de los procesos neuronales no sea afectado por los astrocitos en un cerebro de un adulto saludable.

Estudios previos realizados por nuestro laboratorio indicaron que la activación de la señalización intracelular involucrada en la retracción de los procesos neuronales inducida por la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, está directamente relacionada con la multimerización previa de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc y Thy-1 (Herrera-Molina *y cols.*, 2012; Maldonado *y cols.*, 2017). Se ha reportado que los HSPGs al interaccionar con proteínas con domino de unión a heparina, favorecen el "clustering" de éstas moléculas (Ornitz *y cols.*, 1992). Esto producto de que las cadenas de heparán sulfato ofrecen varios sitios de unión para sus ligandos, debido a su longitud, naturaleza multivalente (*i.e.* más de un glicosaminoglicano por núcleo proteico) y el estado multimerizado del proteoglicano en la membrana (Elfenbein y Simons, 2013). Interesantemente, tanto la integrina $\alpha v\beta 3$ como Thy-1 poseen dominios de unión a heparina en su secuencia primaria que podrían estar mediando su interacción con síndecan-4 (Avalos *y cols.*, 2009; Ballut *y cols.*, 2013). Todos estos antecedentes sugieren que las cadenas de heparán sulfato presentes en la proteína de fusión síndecan-4-Fc podrían estar favoreciendo, mediante la interacción directa, el estado multimerizado de Thy-1 y/o la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc, favoreciendo la activación de la vía de señalización involucrada en la retracción de los procesos neuronales en menor tiempo. En apoyo a este postulado, ensayos de retracción realizados con la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc pre-incubada con la proteína A, molécula que posee cinco dominios de unión a Fc (Moks *y cols.*, 1986) y que permitiría que la integrina interaccione con Thy-1 de una manera agregada, resultaron en una retracción más rápida de los procesos neuronales respecto a la condición en ausencia de la proteína A, hipotetizando una función similar para síndecan-4-Fc. Es importante destacar que en este trabajo se determinó que síndecan-4 puede interaccionar con Thy-1, por lo que el mecanismo de acción del proteoglicano podría incluir otros procesos adicionales al favorecimiento del estado multimerizado de la integrina. Estos posibles mecanismos serán descritos más abajo.

Previamente, se describió que los efectos neuronales inducidos por los inhibidores de la regeneración axonal asociados a la mielina, como Nogo, MAG y OMpg, están precedidos de un incremento rápido y transitorio en la concentración de Ca^{+2} intracelulares (Bandtlow *y cols.*, 1993; Snow *y cols.*, 1994; Wong *y cols.*, 2002). En este

sentido, observamos que síndecan-4-Fc no generó cambios significativos en los niveles de calcio intracelular en células CAD diferenciadas morfológicamente, lo que concuerda con los resultados generados por el proteoglicano en los ensayos de retracción. En contraste, sí observamos incrementos en los niveles citoplasmáticos de Ca^{+2} tras la adición de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc. Específicamente se caracterizó varios "peaks" de incremento del calcio intracelular, principalmente en el extremo de las neuritas y varicosidades, a los 6, 10 y 14 minutos luego de la adición de la proteína de fusión. Considerando que la adición de $\alpha v\beta 3$-Fc promueve la retracción de las neuritas a los 20 minutos de incubación, los resultados sugieren que el incremento del calcio intracelular podría estar precediendo la retracción de las neuritas. De la misma forma que la integrina, se ha evidenciado que el glutamato, mediante su interacción con los receptores ionotrópicos AMPA, promueve la retracción axonal al ser adicionado directamente sobre el soma de neuronas granulares de rata, efecto precedido por un incremento en los niveles citoplasmáticos de Ca^{+2} (Yamada *y cols.*, 2008). Estudios *in vitro* realizados con cultivos neuronales de sanguijuela, demostraron que la despolarización de la membrana producto de la adición de altas concentraciones de K^{+} extracelular induce cambios en la morfología del cono de crecimiento y retracción de neuritas en neuronas sembradas en placas pre-tratadas con matriz extracelular enriquecida con laminina, efecto precedido por un incremento en los niveles de calcio intracelular producto del ingreso desde el medio extracelular (Neely, 1993). Así también, se reportó la retracción de procesos neuronales en cultivos primarios de neuronas corticales de rata (E16) y la línea neuronal PC12 al ser expuestos a estímulos mecánicos, siendo esencial para este fenómeno el ingreso de calcio a través de canales iónicos mecanosensibles (Franze *y cols.*, 2009). Todos estos antecedentes apoyan los resultados encontrados en esta tesis, y sugieren que el incremento en los niveles de $[Ca^{+2}]_i$ inducido por la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc podría estar desencadenando cambios en la contracción del citoesqueleto de actina que conllevan al colapso del cono de crecimiento y retracción de los procesos neuronales. Particularmente, se sabe que el calcio regula la actividad de la miosina II, molécula que cumple un papel importante en la regulación de la retracción axonal (Gallo, 2004). Por ejemplo, se ha reportado que la quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK, "myosin light-chain kinase") es directamente activada por el complejo Ca^{+2}/Calmodulina, para fosforilar la cadena liviana de la miosina y regular la contractibilidad del citoesqueleto de actina, que media la retracción del cono de crecimiento (Gallo, 2004). El incremento en el calcio intracelular tras la adición de la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc es un resultado que permitirá ampliar la

caracterización de los eventos de señalización a nivel neuronal que median la retracción de los procesos neuronales dependiente de Thy-1. Sin embargo, es fundamental continuar la caracterización de este proceso, como por ejemplo, definir la procedencia del calcio, que podría ser desde el medio extracelular o desde reservorios intracelulares como el retículo endoplasmático. Y también evaluar los cambios del $[Ca^{+2}]_i$ al estimular células CAD con ambas proteínas de fusión, $\alpha v\beta 3$-Fc y síndecan-4-Fc, para relacionarlo con la aceleración de la retracción de neuritas observada en este trabajo.

3. Posibles mecanismos de acción de Síndecan-4

3.1. Síndecan-4 interacciona con Thy-1

Los fenómenos neuronales inducidos por la integrina $\alpha v\beta 3$ dependen de su interacción con Thy-1 neuronal, unión dependiente del dominio de unión a integrina (RLD) presente en la proteína neuronal (Hermosilla *y cols.*, 2008). Considerando que Thy-1 también posee un dominio putativo de unión a heparina en su secuencia primaria (Avalos *y cols.*, 2009), en este trabajo se estudió la posibilidad que Thy-1 interaccionara directamente con el proteoglicano. Mediante ensayos de molécula-única con espectroscopía de fuerza molecular, se determinó que síndecan-4 interacciona directamente con Thy-1 a través del dominio HBD, y se descartó la participación del dominio RLD en la interacción con el proteoglicano. La participación del dominio de unión a heparina se evaluó mediante experimentos entre sindecan-4-Fc y la proteína mutada en el HBD, Thy-1(AEAAA)-Fc. Esta mutación evitó parcialmente la interacción de Thy-1 con el proteoglicano, sugiriendo por una parte que la interacción puede estar siendo mediada adicionalmente por el "core" proteico de síndecan-4, unión que no involucraría el dominio de unión a heparina de Thy-1. La participación del "core" proteico en la interacción de síndecan-4 y sus ligandos ha sido reportada previamente, como por ejemplo en la unión entre síndecan-4 y laminina $\beta 3$ (Carulli *y cols.*, 2012). Los resultados obtenidos entre Thy-1(AEAAA)-Fc/síndecan-4-Fc también sugieren que Thy-1 podría tener un segundo HBD (no mutado en la proteína Thy-1(AEAAA)-Fc). En apoyo a esto último, mediante estudios bioinformáticos de alineamiento y comparación de secuencias, se determinó previamente en nuestro laboratorio que Thy-1 tendría un segundo HBD compuesto por aminoácidos no secuenciales ($K_{41}K_{42}R_{38}K_{78}$) y que se formaría por el plegamiento de la proteína (**Figura 40**). De todas formas, para evaluar la participación del "core" proteico de síndecan-4 en la

interacción con Thy-1, se deberán repetir los experimentos de molécula-única utilizando la proteína de Thy-1-Fc mutada en el HBD y síndecan-4-Fc pre-tratado con Hasa III. La interacción entre Thy-1 y síndecan-4 también se observó mediante ensayos de ELISA realizados con la proteína de fusión de Thy-1-Fc y extractos proteicos obtenidos de células transfectadas con síndecan-4-HA. Es importante mencionar que esta interacción directa no se había publicado previamente, aunque existen algunos antecedentes que la respaldan. Nuestro laboratorio, mediante ensayos de precipitación, observó que Thy-1-Fc interacciona con esferas cubiertas con heparina (Avalos *y cols.*, 2009), tipo de heparán sulfato soluble que presenta en su estructura altas cantidades de ácido idurónico y N- y O-residuos sulfatados (Sarrazin *y cols.*, 2011). Esta interacción también fue previamente descrita utilizando células de timocito que expresan Thy-1 en su superficie, en este estudio, la adición de heparina bloquea la adhesión de los timocitos a las células epiteliales dependiente de Thy-1 (Hueber *y cols.*, 1992). El HBD está formado mayoritariamente por aminoácidos básicos, específicamente arginina y lisina, por ejemplo el HBD de Thy-1 de ratón tiene la secuencia REKRK, el de humanos RETKK y en rata REKKK (Avalos *y cols.*, 2009). La interacción entre síndecan-4 y Thy-1 sería del tipo electrostática, mediada por los grupos sulfato y carboxílicos de las cadenas de heparán sulfato y los aminoácidos básicos del HBD, que están cargados negativa y positivamente, respectivamente a pH neutro (Fromm *y cols.*, 1995).

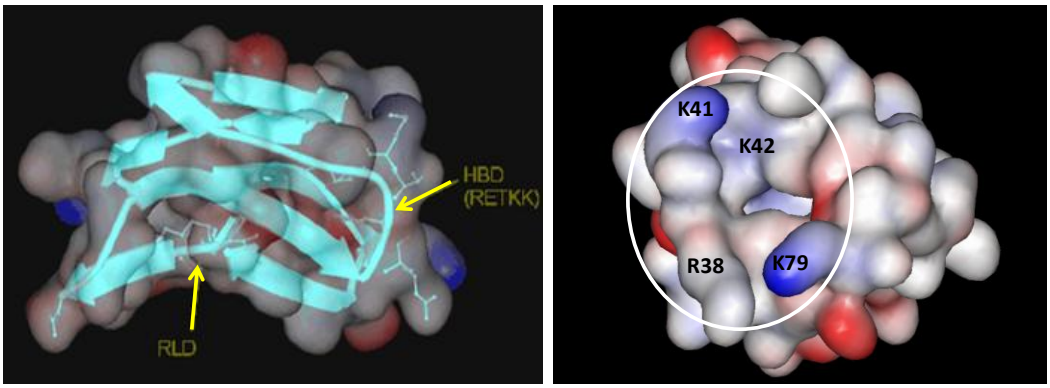


Figura 40. Modelo tridimensional de Thy-1 humana. Modelo generado por modelaje comparativo por homología de secuencias entre Thy-1 y un dominio de inmunoglobulina tipo-V. **(Izquierda)** Se muestra el dominio de unión a integrina (RLD) y el dominio de unión a heparina (HDB; RETKK) utilizando el modo de barritas para cada aminoácido de la secuencia, los que están orientados hacia el exterior de la molécula. La estructura se muestra en el modo de potencial electrostático superficial (en rojo las zonas de cargas negativas y en azul las áreas con carga positiva). Las flechas en calipso representan las hojas β de la estructura secundaria. **(Derecha)** Se destacan los aminoácidos que estarían formando el segundo dominio de unión a heparina ($K_{41}K_{42}R_{38}K_{78}$) de Thy-1, el cual se formaría por el plegamiento de la proteína.

3.2. Acción cooperativa entre integrinas y síndecan-4

La modulación de procesos celulares dependiente de la acción cooperativa entre los HSPG y las integrinas ha sido reportada previamente para otros sistemas. Por ejemplo, nuestro laboratorio reportó que la comunicación entre neuronas y astrocitos mediada por la interacción entre Thy-1/$\alpha v\beta 3$ también tiene efectos hacia el astrocito, específicamente promueve inicialmente la formación de adhesiones focales y fibras de estrés, mientras que tiempos mayores de estimulación resultan en la promoción de la migración astrocítica, procesos celulares donde es fundamental la participación de síndecan-4 (Avalos *y cols.*, 2009; Kong *y cols.*, 2013). También se ha descrito que la fosforilación de la fracción citoplasmática de síndecan-4 por la proteína quinasa no-receptora Src cumple un papel importante en el control del reciclaje de las integrinas, específicamente incrementa la endocitosis y degradación de $\alpha 5\beta 1$, y aumenta el tráfico de la integrina $\alpha v\beta 3$ hacia la superficie celular, favoreciendo una migración direccionada y persistente (Morgan *y cols.*, 2013). Además, se ha visto que tanto síndecan-4 como la integrina $\alpha 5\beta 1$, expresadas en la superficie de células de melanoma, son fundamentales para la adhesión al endotelio vía Thy-1 y para promover los procesos de metástasis (Fiore *y cols.*, 2014).

3.3. Síndecan-4 como una molécula "scaffold" de la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$

Xu y Esko describieron a los HSPGs como potenciales moléculas "scaffold", que debido a las características estructurales de las cadenas de HS, como son su largo y flexibilidad, promueven el acercamiento entre dos proteínas para favorecer su interacción, y regulan dónde y cuándo los eventos de señalización iniciarían (Xu y Esko, 2014). Uno de los sistemas donde síndecan-4 actúa como "scaffold", es en la interacción entre los factores de crecimiento de la familia de FGFs y el receptor tirosina quinasa de la membrana celular, FGFR, sistema donde se ha definido a síndecan-4 como co-receptor (Carey, 1997). Se ha descrito que a pesar que la unión FGF/FGFR es de alta afinidad, esta interacción y subsecuente eventos de señalización son amplificados en presencia de las cadenas de heparán sulfato (Sperinde y Nugent, 2000). Es más, se ha identificado la formación de un complejo ternario FGF/FGFR/HSPG, el cual disminuye la constante de disociación (k_{off}) entre FGF/FGFR (*i.e.* estabiliza la interacción), incrementa la afinidad ligando-receptor primario, y favorece la activación de FGFR bajo concentraciones muy bajas del ligando (Forsten-Williams *y cols.*, 2005; Nugent y Edelman, 1992). Estos antecedentes son concordantes con la función establecida para síndecan-4 en este trabajo, donde se observó que el proteoglicano potencia los fenómeno neuronales

mediados por la interacción entre Thy-1 neuronal y la integrina $\alpha v\beta 3$ astrocítica, sugiriendo que la participación de síndecan-4 tendría relación con favorecer la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$. En apoyo a esto, también se ha reportado que síndecan-4 neuronal cumple un papel importante como co-receptor de las proteínas Slit, moléculas que a través de su interacción con los receptores neuronales Robos generan una respuesta repulsiva de la migración neuronal y el crecimiento axonal. Específicamente se describió que las cadenas de heparán sulfato incrementan la afinidad Slit-Robo, y aumentan la eficiencia de la localización y señalización inducida por Slit (Hu, 2001; Johnson *y cols.*, 2004).

Adicionalmente, se ha descrito que las cadenas de heparán sulfato del proteoglicano ofrecen varios sitios de unión para el ligando, debido a su longitud y el estado multimerizado del proteoglicano en la membrana (Elfenbein y Simons, 2013), lo que es potenciado por la alta cantidad de moléculas de síndecan-4 presentes en la superficie celular respecto a la cantidad de moléculas del receptor primario. Por ejemplo, existen 10^6 moléculas de síndecan-4 por célula versus 10^4 moléculas del receptor FGFR (Yanagishita y Hascall, 1992). Esta información sugiere que síndecan-4 podría ofrecer varios sitios de unión para Thy-1, incrementando la concentración efectiva de la proteína neuronal en la membrana capaz de reconocer la integrina $\alpha v\beta 3$, favoreciendo de esta forma la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$ y los efectos neuronales resultantes. En apoyo a esto, se ha reportado que el receptor perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas, RAGE ("Receptor for Advanced Glycation Endproducts"), interacciona con cadenas de HS previo a la unión con su ligando cognado para ensamblar un complejo oligomerizado que reconoce a su ligando y señaliza (Xu *y cols.*, 2013). Específicamente, se ha descrito que el sitio de unión a las cadenas de HS se encuentran contiguo al sitio de dimerización, por lo que la interacción electrostática de RAGE con las cadenas de HS se acoplaría energéticamente a la interacción hidrofóbica en la interfaz proteína-proteína para promover la dimerización del receptor (Xu y Esko, 2014).

En nuestro sistema los efectos estudiados son a nivel neuronal rio abajo de Thy-1, por lo que tanto la integrina $\alpha v\beta 3$ como síndecan-4 actúan como ligandos del receptor neuronal Thy-1, función bastante novedosa para el proteoglicano. En este sentido, existe un estudio que demostró un papel de ligando para síndecan-4 en el contexto del sistema inmune. Específicamente se ha visto que síndecan-4, expresado en células T, funciona como ligando del receptor transmembrana del tipo inhibitorio tipo-I, DC-HIL, expresado en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC), interacción que resulta en la inhibición de la actividad de las células APC, inhibiendo de esta forma la activación de las

células T (Chung *y cols.*, 2013). Considerando este antecedente donde se demuestra que síndecan-4 ejerce una acción como ligando, y debido a que la participación de síndecan-4 en los efectos neuronales depende de la presencia de la integrina, se postuló que síndecan-4 podría estar cumpliendo un papel de co-ligando de Thy-1, siendo el ligando primario la integrina $\alpha v\beta 3$, favoreciendo la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$ como una proteína del tipo "scaffold".

4. Parámetros cinéticos y termodinámicos de las interacciones Thy-1/Síndecan-4 y Thy-1/$\alpha v\beta 3$

A través del estudio de molécula-única con las pinzas ópticas, se logró caracterizar los parámetros de unión para ambas interacciones bimoleculares, Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$. Las pinzas ópticas han sido utilizadas para caracterizar diferentes interacciones entre proteínas, como por ejemplo integrina αIIbβ3/fibrinógeno (Litvinov *y cols.*, 2011; Litvinov *y cols.*, 2005), P- y L-selectina/PSGL-1 (Rinko *y cols.*, 2004), y la unión integrina $\alpha v\beta 3$/osteopontina (Litvinov *y cols.*, 2003). En esta tesis, por una parte, determinamos que el tiempo de vida a fuerza cero (τ^0) es mayor para la interacción entre Thy-1/$\alpha v\beta 3$ (27,25 ± 7.70 s) que para la unión Thy-1/síndecan-4 (8,89 ± 0.99 s) (**Tabla IV**). Este parámetro describe el tiempo que dura la interacción entre ambas proteínas en ausencia de una fuerza externa, por lo que los resultados sugieren que la interacción de Thy-1 con la integrina es más estable que con el proteoglicano. El tiempo de vida se relaciona inversamente con la constante cinética de disociación ($k_{off} = \tau^{-1}$), por lo que se calculó una velocidad de disociación entre Thy-1/síndecan-4 de ~0,112 s^{-1}, y para la disociación entre Thy-1/$\alpha v\beta 3$ de ~0,036 s^{-1}. Estas diferencias en la velocidad de disociación podrían dar cuenta de los diferentes efectos neuronales inducidos tanto por síndecan-4 como por la integrina al interaccionar con Thy-1, específicamente el menor tiempo de vida (*i.e.* mayor velocidad de disociación) calculado para la unión Thy-1/síndecan-4 podría explicar por qué síndecan-4 no induce efectos a nivel neuronal en comparación a la acción de la integrina. Esto es concordante con las velocidades de disociación calculadas para otras interacciones mediadas por síndecan-4 donde sí se observa un efecto celular, como es el caso de la interacción FGF/síndecan-4, unión cuya k_{off} es de ~0,0113 s^{-1} (Nugent y Edelman, 1992).

La constante cinética de disociación (k_{off}), y en conjunto a la constante cinética de asociación (k_{on}), permite caracterizar la constante de disociación ($K_D=k_{off}/k_{on}$) que describe la afinidad entre las proteínas, específicamente el número de enlaces formados en el equilibrio (Liu *y cols.*, 2015). La estrategia experimental utilizada con las pinzas ópticas no permite calcular el valor de la constante de asociación, por lo tanto, si asumimos que el valor de la k_{on} es similar para ambas interacciones bimoleculares, nuestros resultados sugieren una mayor afinidad de Thy-1 por la integrina $\alpha v\beta 3$ que por síndecan-4. Estos resultados son concordantes con la afinidad descrita para los co-receptores, donde la afinidad co-receptor/ligando es siempre inferior a la afinidad receptor primario/ligando (Elfenbein y Simons, 2013), lo que apoya el postulado papel de ligando primario y co-ligando para la integrina y síndecan-4, respectivamente.

Mediante esta técnica de molécula-única, también se logró caracterizar el perfil energético del proceso de disociación, obteniendo los valores de la energía libre de activación a fuerza cero ($\Delta G^{\ddagger}$) para cada interacción. Este parámetro define la barrera energética que se debe superar para disociar la interacción proteína-proteína y está directamente relacionado con la constante cinética de disociación, es decir, mientras menor sea la barrera energética menor será el tiempo que demora la interacción en disociarse. En este sentido, la velocidad de disociación de la interacción Thy-1/síndecan-4 (k_{off} ~0,112 s^{-1}) es más rápida que la disociación Thy-1/$\alpha v\beta 3$ (k_{off} ~0,036 s^{-1}), y esperablemente la energía libre de activación de Thy-1/síndecan-4 (~3,27 k_BT) es menor a la obtenida para la interacción entre Thy-1 y la integrina $\alpha v\beta 3$ (~6,16 k_BT) (**Tabla IV**). Adicionalmente, se calculó la distancia al estado de transición, que corresponde a la distancia requerida para romper la unión entre las proteínas ($\Delta x^{\ddagger}$). Para la interacción entre Thy-1/$\alpha v\beta 3$ se obtuvo un valor de ~0,5 nm, valor similar al previamente reportado para la ruptura de interacciones entre integrinas y ligandos con dominios de unión a integrina tipo-RGD. Por ejemplo, se reportó para la unión fibronectina y $\alpha 5\beta 1$ un valor de ~0,42 nm (Li *y cols.*, 2003). Li y colaboradores calcularon una velocidad de disociación de ~0,012 s^{-1} para fibronectina/$\alpha 5\beta 1$ (Li *y cols*., 2003), valor en el mismo orden de magnitud al obtenido para Thy-1/$\alpha v\beta 3$ en este trabajo (~0,036 s^{-1}). Para la interacción entre Thy-1/síndecan-4 se encontró un valor de $\Delta x^{\ddagger}$ ~0,26 nm, valor comparable al obtenido mediante la microscopia de fuerza atómica para la disociación entre heparina y fibronectina (~0,31 nm; **Tabla IV**) (Mitchell *y cols.*, 2007). Adicionalmente, en ese mismo estudio se reportó un valor de k_{off} para heparina/fibronectina de 0,2 ± 0,1 s^{-1}, el cual se

asemeja al obtenido en este estudio para la interacción Thy-1/síndecan-4 (0,112 ± 0,01 s^{-1}). La interacción heparina/fibronectina es mediada por las cadenas de heparán sulfato y el dominio HBD, por lo tanto, los parámetros obtenidos para dicha interacción corroboran la participación de estos elementos en la interacción entre Thy-1 y síndecan-4. El valor de distancia al estado de transición calculado para Thy-1/síndecan-4 difiere al encontrado para Thy-1/$\alpha v\beta 3$, sugiriendo que diferentes tipos de enlaces median ambas interacciones bimoleculares. Como se indicó previamente, la interacción entre Thy-1 y el proteoglicano es del tipo electrostática y depende de la asociación entre aminoácidos básicos con los grupos sulfatados de las cadenas de HS (Fromm *y cols.*, 1995). Mientras que la interacción de Thy-1 con $\alpha v\beta 3$ es mediada por el tripéptido RLD, el cual se inserta en una hendidura superficial localizada entre las subunidades α y β de la integrina. Específicamente se ha reportado que la arginina interacciona mediante interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógenos con aminoácidos polares ubicados en la hendidura del módulo hélice β-hélice enrollada ("β-propeller") de la subunidad α, mientras que el ácido aspártico coordina con cationes de Mn^{+2} unidos al sitio de adhesión dependiente de ión metálico (MIDAS) ubicado en la subunidad β (Campbell y Humphries, 2011; Craig *y cols.*, 2004).

Tabla IV. Comparación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de disociación obtenidos para las interacciones Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/$\alpha v\beta 3$ respecto a valores publicados en la literatura.

Parámetros	Thy-1/ Síndecan-4	Thy-1/ $\alpha v\beta 3$	*Fibronectina/ Heparina	*Fibronectina/ $\alpha 5\beta 1$
Tiempo de vida (τ^0)	8,89 ± 0,99 s	27,25 ± 7,70 s	-	-
Constante cinética de disociación (k_{off}^0)	0,112 ± 0,012 s^{-1}	0,036 ± 0,010 s^{-1}	0,2 ± 0,1 s^{-1}	~0,012 s^{-1}
Energía libre de activación ($\Delta G^{\ddagger 0}$)	3,27 ± 0,44 K_BT	6,16 ± 0,55 K_BT	-	-
Distancia al estado de transición ($\Delta x^{\ddagger}$)	0,26 ± 0,05 nm	0,54 ± 0,16 nm	~0,31 nm	~0,42 nm

***Fibronectina/Heparina publicado por Mitchell y cols., 2007*
**Fibronectina/$\alpha 5\beta 1$ publicado por Li y cols., 2003*

5. Efecto de las fuerzas en las interacciones bimoleculares

La espectroscopía de fuerza molecular ha sido la principal estrategia experimental utilizada para estudiar cómo la fuerza regula las interacciones bimoleculares. Las técnicas comúnmente utilizadas son la microscopía de fuerza atómica, "biomembrane force probe", y las pinzas ópticas (Fiore *y cols.*, 2014; Li *y cols.*, 2003; Litvinov *y cols.*, 2003; Neuman y Nagy, 2008). Lo anterior es relevante, ya que un aspecto importante de las interacciones no-covalentes entre ligandos y receptores que median la comunicación célula-célula, es que estos enlaces se ven expuestos a la acción de fuerzas mecánicas, ya sea internas como externas. Las fuerzas internas son generadas por procesos celulares relacionadas a la contracción del citoesqueleto de actina-miosina, como la migración celular o contracción muscular; mientras que las fuerzas externas están dadas por el flujo de fluidos alrededor de las células o por la rigidez de la matriz extracelular (Liu *y cols.*, 2015; Rakshit y Sivasankar, 2014). Esta acción mecánica es importante ya que las fuerzas regulan las interacciones proteína-proteína, alterando la barrera energética del proceso de disociación y afectando la constante cinética de disociación, es decir modificando la velocidad a la que ocurre la disociación (*i.e.* modificando el tiempo que dura la unión), acción que por tanto afectará los subsecuentes efectos celulares generados por la interacción bimolecular(Bell, 1978; Dembo *y cols.*, 1988).

5.1. Fuerzas a las que se ven expuestas las interacciones Thy-1/αvβ3 y Thy-1/síndecan-4

Particularmente en nuestro sistema, la comunicación bidireccional neurona-astrocito mediada por la glicoproteína neuronal Thy-1 y las proteínas astrocíticas síndecan-4 y la integrina αvβ3, promueve la migración de los astrocitos (Avalos *y cols.*, 2009; Kong *y cols.*, 2013), e inhibición del crecimiento y retracción de los procesos neuronales (Herrera-Molina *y cols.*, 2012; Maldonado *y cols.*, 2017). Durante la migración celular, la polimerización de los filamentos de actina y el deslizamiento de la proteína motora miosina II sobre estos filamentos genera fuerzas contráctiles, que tiran del cuerpo celular para promover el movimiento hacia adelante y la retracción de la parte trasera de la célula (Pollard y Borisy, 2003). Similarmente, la retracción de las neuritas también ocurre debido al incremento en la contracción del citoesqueleto de actina (Govek *y cols.*, 2005; Kranenburg *y cols.*, 1997; Maldonado *y cols.*, 2017). Por lo tanto, esto indica que los procesos celulares dependientes de Thy-1 como la migración de astrocitos y retracción de

neuritas, generan fuerzas internas que son ejercidas a las interacciones proteína-proteína que mantiene la comunicación célula-célula, como lo son la interacción Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/ integrina $\alpha v\beta 3$. Sugiriendo por tanto, que estas interacciones normalmente estarán expuestas a la acción de fuerzas mecánicas. Es importante mencionar que las lesiones al SNC provocan un incremento en la rigidez de la matriz extracelular, una de las principales fuerzas mecánicas que actúan sobre las células (Lourenco y Graos, 2016; Urbanski *y cols.*, 2016; Wells, 2008), antecedente que apoya el postulado que las interacciones que median la comunicación neurona-astrocito estarían expuestas a la acción de las fuerzas luego de una lesión al SNC *in vivo*.

5.2. Las fuerzas aceleran la disociación de Thy-1/$\alpha v\beta 3$ y Thy-1/síndecan-4

En este sentido, basándose en cómo las interacciones bimoleculares responden a las fuerzas mecánicas, se pueden clasificar como "slip bond", donde la fuerza disminuye el tiempo de vida (acelera la disociación; Figura 41A); "catch bond", donde la fuerza prolonga el tiempo de vida (ralentiza la disociación; Figura 41B); o *ideal bond*, donde el tiempo de vida no se ve afectado por la fuerza (Dembo *y cols.*, 1988; Zhu, 2014).

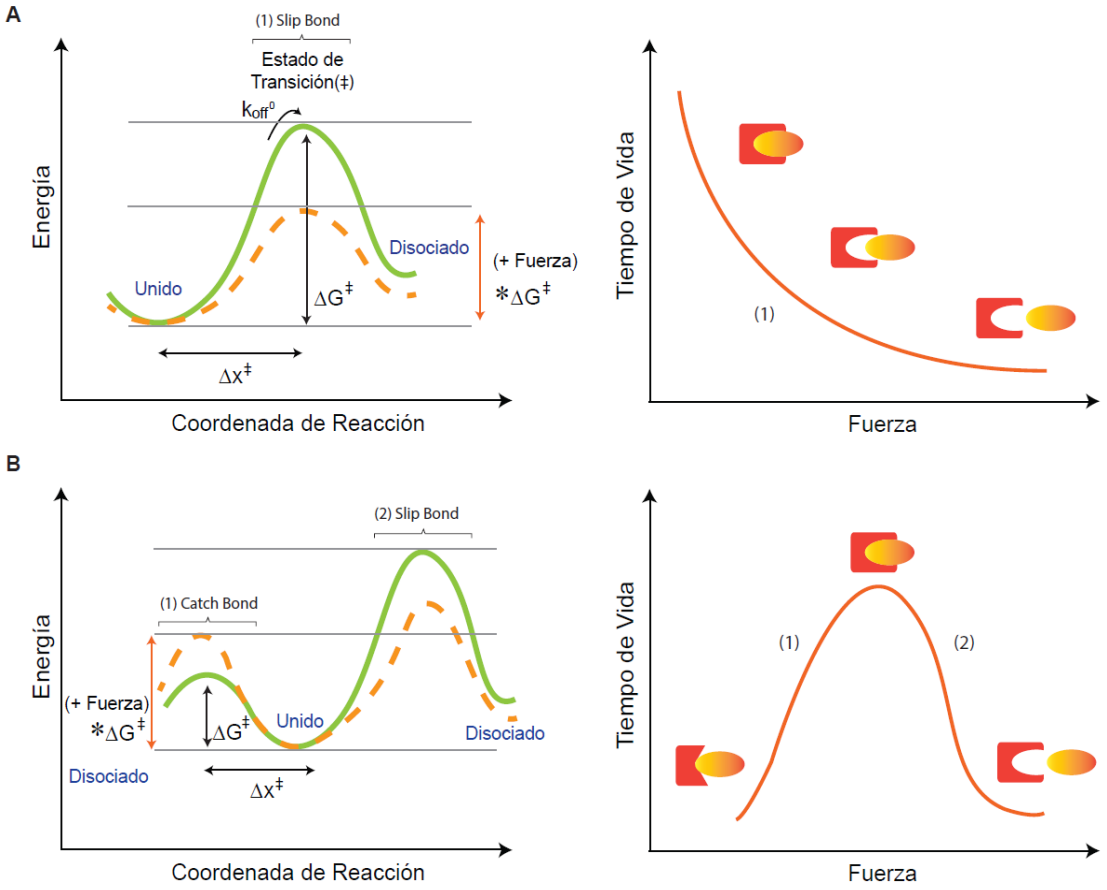


Figura 41. "Slip bond" versus "Catch bond". (Izquierda) Diagrama esquemático del perfil energético del proceso de disociación de interacciones bimoleculares en ausencia de fuerza (línea continua verde) y bajo la acción de fuerzas mecánicas (línea discontinua naranja), para uniones tipo **(A)** "Slip bond" y **(B)** "Catch bond". $\Delta G^{\ddagger}$ y $*\Delta G^{\ddagger}$ corresponden a la energía libre de activación en ausencia y presencia de fuerza, respectivamente. En el caso de "slip bond", la fuerza disminuye la energía libre de activación, haciendo más rápida la disociación; mientras que en el caso de "catch bond", la fuerza incrementa la energía libre de activación haciendo más lenta la disociación. $\Delta x^{\ddagger}$ corresponde a la distancia al estado de transición, y k_{off}^{0} a la constante cinética de disociación en ausencia de fuerzas**. (Derecha)** Gráfico representativo del tiempo de vida de una interacción bimolecular respecto a las fuerzas externas aplicadas, tanto para enlaces tipo **(A)** "Slip bond", donde la fuerza acelera el proceso de disociación y **(B)** "Catch bond", condición donde la fuerza inicialmente disminuye el tiempo de disociación, para luego comportarse como un enlace "slip bond".

En este estudio observamos que la fuerza acelera la disociación de ambas interacciones, sugiriendo que tanto la interacción Thy1/síndecan-4 como Thy-1/αvβ3 se comportan como enlaces del tipo "slip bond". Este comportamiento ha sido descrito previamente para las interacciones mediadas por las integrinas, como por ejemplo entre αIIbβ3 y fibrinógeno (Litvinov *y cols.*, 2011); sin embargo, la mayoría de las integrinas se comportan como "catch bond". Se ha visto que la fuerza (hasta 15 pN) prolonga el tiempo de vida de la unión entre αLβ2 y ICAM-1 (Chen *y cols.*, 2010). Así también, se ha

reportado que la interacción entre la integrina αvβ3 y fibronectina posee un régimen tipo "catch bond" entre 0 y 20 pN (Chen *y cols.*, 2017; Elosegui-Artola *y cols.*, 2016), indicando que la unión de la integrina αvβ3 a Thy-1 sería diferente a su interacción con fibronectina. Esta diferencia también fue reportada para la integrina α5β1. Por ejemplo, la interacción fibronectina/α5β1 muestra un comportamiento tipo "catch bond", donde el máximo de tiempo de vida se logra entre 10-30 pN (Kong *y cols.*, 2009); sin embargo, así como para la integrina αvβ3, se reportó que la interacción entre Thy-1 y α5β1 se comporta como un enlace tipo "slip bond" (Fiore *y cols*., 2014). Se ha descrito que en ausencia de la acción mecánica, la integrina α5β1 interacciona con la fibronectina mediante el dominio de unión a integrina RGD presente en el décimo modulo tipo III de la fibronectina (FNIII10) (Aota *y cols.*, 1994); sin embargo, al ejercer una fuerza sobre este enlace, la integrina adicionalmente se une a un sitio-sinérgico ubicado en FNIII9 de la fibronectina, unión que permite resistir a la acción mecánica y comportarse como "catch bond". En contraste a la fibronectina, Thy-1 interacciona con α5β1 y αvβ3 sólo a través del dominio de unión a integrina tipo-RGD (RLD) (Hermosilla *y cols*., 2008; Fiore *y cols*., 2014). La presencia de un solo sitio de unión podría dar cuenta del comportamiento tipo "slip bond" encontrado para ambas interacciones mediadas por Thy-1 (Thy-1/αvβ3 y Thy-1/α5β1).

Respecto al resultado obtenido para la interacción entre Thy-1 y síndecan-4, concordantemente al comportamiento observado, se publicó recientemente utilizando AFM que la interacción entre FGF y las cadenas de HS es del tipo "slip bond" a bajas tasas de carga (100 pN/s) (Sevim *y cols*., 2017). En contraste, existe un estudio que indica un comportamiento tipo "catch bond" para la interacción entre las cadenas de HS y la proteína sulfatasa de membrana Sulf1 (Harder *y cols.*, 2015). Esto se podría explicar debido a que esta interacción abarca una larga región de la proteína llamada dominio hidrofílico que incluye 319 aminoácidos (K_{417}-K_{735}) (Frese *y cols.*, 2009), versus los 5 aminoácidos (que forman el HBD de Thy-1) involucrados en la interacción entre Thy-1/síndecan-4 (Avalos *y cols.*, 2009).

En un estudio relacionando, se caracterizó la interacción entre Thy-1 y la integrina α5β1 en el contexto de la adhesión de células tumorales al endotelio vascular durante la metástasis (Fiore *y cols.*, 2014). En este estudio también se utilizó proteínas-Fc en un sistema libre de células, y se identificó un comportamiento tipo "slip bond" para la unión Thy-1/α5β1. Interesantemente, un comportamiento trifásico dependiente de la fuerza ("slip-catch-slip") fue observado cuando se estudió la interacción utilizando la integrina

$\alpha5\beta1$ unida a la membrana celular en lugar de la proteína $\alpha5\beta1$-Fc. Para explicar este nuevo comportamiento, los autores se basaron en nuestros previos reportes donde se describió la posible interacción entre Thy-1 y síndecan-4 (Avalos *y cols.*, 2009; Kong *y cols.*, 2013). Específicamente, propusieron que Thy-1 forma un complejo trimolecular con $\alpha5\beta1$ y síndecan-4, el cual sería responsable del fenómeno trifásico, denominado "dynamic catch". Aquí la presencia de síndecan-4 en la membrana celular, hace que las fuerzas incrementen abruptamente la rigidez del complejo, lo que conlleva a un comportamiento tipo "catch bond" (Fiore *y cols.*, 2014). El hecho que ambas interacciones bimoleculares, Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/integrina $\alpha v\beta3$, presenten un comportamiento tipo "slip bond" sugiere que la comunicación neurona-astrocito dependiente de Thy-1 en el SNC se debería ver afectada negativamente (*i.e.* las fuerzas disminuirían el tiempo de duración de las interacciones mediadas por Thy-1) en respuesta a una señal mecánica como la generada por el incremento en la rigidez de la matriz extracelular observada tras una lesión; sin embargo, los resultados publicados por Fiore y colaboradores (Fiore *y cols.*, 2014) sugieren que en nuestro sistema se podría estar formando un complejo Thy-1/$\alpha v\beta3$/síndecan-4 que también podría exhibir un comportamiento tipo "dynamic catch bond" en respuesta a las fuerzas, es decir, el incremento de las fuerzas podría estar incrementando el tiempo de vida de las interacciones mediadas por Thy-1 y por tanto favoreciendo la comunicación neurona-astrocito frente a un daño al SNC; no obstante, queda por determinar si este es el caso mediante experimentos donde las tres proteínas estén disponibles para interaccionar.

5.3. Fuerza más probable a la que se disocian las interacciones bimoleculares

A través de las pinzas ópticas, se puede caracterizar la distribución de las fuerzas de ruptura de las interacciones proteína-proteína. La fuerza de ruptura más probable o el "peak" de fuerza se define como "bond strength" y se calcula a partir de los histogramas de fuerza de ruptura (Evans y Ritchie, 1997). En este estudio se determinó que la fuerza de ruptura más probable para ambas interacciones bimoleculares es ~25 pN, sugiriendo que en dicho rango, ambas interacciones Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/$\alpha v\beta3$ responderán de manera similar a las fuerzas. Se ha descrito que para las proteínas de adhesión, el "bond strength" es característico para cada par ligando-receptor, y los valores van desde 20 a 150 pN (Weisel *y cols.*, 2003). Es importante mencionar que para las interacciones no-covalentes, este "peak" de fuerza depende de la velocidad a la que la fuerza es aplicada (tasa de carga de fuerza o "force loading rate") (Evans y Ritchie, 1997; Rico *y cols.*, 2007).

Por ejemplo, para la interacción entre biotina y estreptavidina, la cual ha sido descrita como la interacción no-covalente más fuerte en sistemas biológicos, se observó que el "bond strength" varía de 5 pN a 170 pN al incrementar la tasa de carga en seis órdenes de magnitud (Merkel *y cols.*, 1999). Por lo que esta interacción podría parecer fuerte o débil dependiendo de qué tan rápido la fuerza es aplicada. Esto indica que es fundamental considerar el "force loading rate" al momento de hacer una comparación de las diferentes interacciones. Normalmente, las velocidades de tiraje usadas en los experimentos de molécula-única están en el rango de 10^2-10^4 nm/s (Roca-Cusachs *y cols.*, 2012). En este estudio, se utilizó una velocidad de tiraje de 100 nm/s, y considerando la rigidez del sistema (constante de resorte: 0,1 pN/nm), el valor del "force loading rate" corresponde a 10 pN/s (constante de resorte x velocidad de tiraje, Materiales y Métodos) (Dudko *y cols.*, 2008). A modo de comparación, el "bond strength" calculado para la interacción αIIbβ3/fibrinógeno es de ~50 pN usando una velocidad de tiraje de 160 nm/s (Agnihotri *y cols.*, 2009), lo que sugiere una interacción más fuerte para nuestros pares bimoleculares. En otros estudios utilizando una tasa de carga de 12 pN/s, similar al usado en este trabajo, se determinó un "peak" de fuerza de ruptura mucho más bajo para la interacción actina/miosina (9,2 ± 4,4 pN) en comparación al de las interacciones Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/integrina αvβ3 (Nishizaka *y cols.*, 2000). Interesantemente, resultados obtenidos con AFM demostraron que la interacción entre la integrina αvβ3 y el péptido GRGDSP posee un "bond strength" de 42 ± 4 pN a 30.000 pN/s (Lehenkari y Horton, 1999). Considerando que la interacción Thy-1/αvβ3 también depende de un dominio de unión a integrina tipo-RGD, el resultado obtenido con un "force loading rate" rápido (30.000 pN/s) sugiere que aun cuando se incremente en tres órdenes de magnitud la tasa de carga, el "bond strength" calculado en esta tesis a 10 pN/s (*i.e.* ~25 pN) no cambiará más allá de dos veces el valor inicial. Los enlaces que son casi insensibles a los cambios en la tasa de carga se denominan enlaces persistentes, un ejemplo de éstos es la interacción entre la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y la integrina αLβ2 (Evans *y cols.*, 2010; Evans y Calderwood, 2007), por lo que la unión Thy-1/αvβ3 podría estar comportándose como un enlace persistente. Los experimentos realizados en este trabajo utilizaron un "force loading rate" de 10 pN/s que se encuentra dentro del rango fisiológico (Furuike *y cols.*, 2001; Li *y cols.*, 2003), sugiriendo que el "bond strength" estimado para las interacciones Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/αvβ3, son probablemente representativos de lo que esté ocurriendo en el SNC.

A pesar que el "bond strength" depende de la velocidad a la cual se aplica la fuerza, es importante mencionar que de acuerdo al modelo DHS, los datos de tiempo de vida obtenidos a diferentes "force loading rate" deben colapsar en una sola curva maestra que describe la dependencia del tiempo de vida respecto a la fuerza (Dudko *y cols.*, 2008). Por lo tanto, las curvas de tiempo de vida versus fuerza de ruptura obtenidas en este estudio, deberían mantenerse iguales al usar valores de tasas de carga mayores a 10 pN/s, en consecuencia, los parámetros cinéticos y del estado de transición calculados en este estudio tampoco deberían cambiar.

6. Estudio a nivel de molécula-única con proteínas no-purificadas

La espectroscopía de fuerza molecular es una estrategia experimental que ha sido utilizada para evaluar cómo las fuerzas regulan las interacciones bimoleculares, ya sea a partir de células intactas o en sistemas libres de células con proteínas purificadas (Litvinov *y cols.*, 2005; Sun *y cols.*, 2005; Zhang *y cols.*, 2004). Esta técnica es altamente sensible, y el uso de proteínas purificadas es deseable para reducir la posibilidad de detectar interacciones no-específicas. Sin embargo, la purificación de una proteína puede representar un factor limitante, tal como ocurrió en este trabajo con la proteína $\alpha v\beta 3$-Fc. En los intentos previos realizados para purificar la proteína de fusión, observamos que el producto final de la purificación no era funcional (Hermosilla *y cols.*, 2008). Para superar esta limitación, en este trabajo se diseñó una estrategia experimental y matemática para desarrollar los estudios a nivel de molécula-única con las pinzas ópticas utilizando la proteína $\alpha v\beta 3$-Fc no purificada. Para esto, el sobrenadante que contiene la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc fue incubado con esferas de poliestireno cubiertas con proteína G, para separar la integrina de las otras moléculas solubles presentes en el medio, como se realiza normalmente con el ensayo de "pull-down". Sorprendentemente, aun cuando la proteína G interacciona específicamente con el fragmento Fc (Kato *y cols.*, 1995), en los ensayos de pinzas ópticas detectamos fuerzas de ruptura asociadas a interacciones no-específicas entre Thy-1-Fc y las otras moléculas. Aún más, Thy-1-Fc interaccionó de manera no-específica con la superficie de las esferas. Interesantemente, la fuerza de ruptura más probable ("bond strength") cuantificada para estas interacciones no-específicas alcanzaron valores de ~10 pN, valor concordante con lo reportado previamente para interacciones no-específicas (Litvinov *y cols.*, 2005; Weisel *y cols.*, 2003). Este "peak" de

fuerza de ruptura difiere del obtenido para el sobrenadante que contiene la integrina αvβ3-Fc (~25 pN); sin embargo, en el rango de fuerzas inferiores, las fuerzas de ruptura asociadas a las interacciones no-específicas se superponen parcialmente a las encontradas para las interacciones específicas Thy-1-Fc/αvβ3-Fc. Por lo tanto, para superar este problema, se desarrolló un algoritmo matemático basado en la ley de probabilidad total para filtrar las fuerzas de ruptura no-específicas, para así obtener una estimación precisa de las fuerzas de ruptura asociadas particularmente a la interacción específica entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc. Para confirmar los resultados obtenidos con la proteína no-purificada αvβ3-Fc, y validar la aproximación matemática empleada, se procedió a purificar la integrina. Para esto, se implementó la estrategia de purificación previamente reportada para la proteína α5β1-Fc (Coe *y cols.*, 2001), que permitió obtener la proteína αvβ3-Fc pura y estable. Los parámetros de disociación obtenidos entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada son altamente comparables a aquellos calculados con la proteína no-purificada, demostrando que la estrategia experimental y matemática implementada en esta tesis permiten caracterizar cómo las interacciones proteína-proteína responden a fuerzas mecánicas y los parámetros de disociación que definen a estas interacciones, aun cuando una de las moléculas involucradas no esté disponible en un estado purificado.

Los estudios de interacción a nivel de molécula-única realizados entre Thy-1-Fc y la integrina αvβ3-Fc purificada demostraron que aun cuando ambas proteínas se encuentren en un estado purificado, los eventos de ruptura asociados a interacciones no-específicas son detectados de todas formas. Diversos estudios se han realizado con proteínas purificadas para caracterizar los parámetros de disociación de interacciones proteína-proteína a nivel de molécula-única utilizando pinzas ópticas, entre éstos se han caracterizado las interacciones entre integrina αIIbβ3/fibrinógeno (Litvinov *y cols.*, 2005; Litvinov *y cols.*, 2003), P- y L-selectina/PSGL-1 (Rinko *y cols.*, 2004), integrina αvβ3/osteopontina (Litvinov *y cols.*, 2003), anticuerpo monoclonal HPT-101/péptidos Tau (Stangner *y cols.*, 2013), αIIbβ3/péptidos cíclicos antagonistas de la integrina (Dutta *y cols.*, 2013). Interesantemente, en todos los casos mencionados las interacciones no-específicas fueron consideradas como insignificantes y no relevantes en el cálculo de los parámetros de disociación. En contraste, en este trabajo las interacciones no-específicas sí fueron consideradas relevantes al momento de caracterizar los parámetros de disociación que describen una interacción proteína-proteína, por lo que los parámetros

entre Thy-1-Fc y la integrina $\alpha v\beta 3$-Fc purificada fueron calculados luego de aplicar la metodología matemática diseñada para filtrar las fuerzas de ruptura no-específicas, con el objetivo de obtener parámetros de disociación más precisos, y comprender correctamente cómo esta unión responde a las fuerzas mecánicas. En este sentido, se aplicó la misma estrategia para calcular los parámetros entre Thy-1-Fc y síndecan-4-Fc. Los valores calculados fueron diferentes a los obtenidos sin filtrar las interacciones no-específicas, corroborando la necesidad de aplicar la metodología de corrección para obtener parámetros de disociación más exactos.

CONCLUSIONES

I. La acción combinada de las moléculas expresadas en la superficie de los astrocitos, el proteoglicano síndecan-4 y la integrina $\alpha v\beta 3$, induce una inhibición más eficaz de la extensión de las neuritas de la célula CAD en proceso de diferenciación morfológica, y promueve una retracción de procesos neuronales más rápida en el tiempo.

II. Tanto síndecan-4 como la integrina $\alpha v\beta 3$ interaccionan directamente con la glicoproteína neuronal Thy-1, a través de diferentes dominios ubicados en la molécula neuronal, sugiriendo que Thy-1 actuaría como receptor de ambos ligandos astrocíticos, modulando la comunicación neurona-astrocito y la respuesta neuronal.

III. El tiempo que dura la interacción entre Thy-1/síndecan-4 en ausencia de una fuerza externa es menor que el tiempo cuantificado para la interacción Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$, indicando que la interacción de Thy-1 con la integrina es más estable y posiblemente de mayor afinidad, que la unión con el proteoglicano.

IV. Las fuerzas aceleran exponencialmente la disociación de ambas interacciones bimoleculares, Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/integrina $\alpha v\beta 3$, indicando un comportamiento tipo *slip bond* para ambas uniones. Esto sugiere que la comunicación neurona-astrocito dependiente de Thy-1 en el SNC se debería ver afectada negativamente en respuesta a una señal mecánica como la generada por la rigidez de la matriz extracelular.

V. La metodología matemática diseñada para filtrar fuerzas de ruptura asociadas a eventos de unión no-específicos, permitirá caracterizar precisamente la respuesta mecánica de interacciones bimoleculares y los parámetros de disociación a nivel de molécula-única en investigaciones de diferentes áreas de la biología celular donde el proceso de purificación de proteínas sea un factor limitante.

VI. En la caracterización de una interacción proteína-proteína a nivel de molécula-única, los eventos de unión no-específicos son detectados aún cuando los estudios se realicen con proteínas purificadas, dando mayor relevancia a la implementación de la metodología matemática de corrección diseñada en este estudio, con el objetivo de obtener resultados más precisos sobre el comportamiento de interacciones bimoleculares en respuesta a fuerzas mecánicas y sus parámetros de disociación.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que síndecan-4 podría ser identificado como un componente de la superficie celular de los astrocitos que contribuye al ambiente no-permisivo de la regeneración axonal promovida por los astrocitos reactivos, cumpliendo un papel relevante bajo condiciones patológicas. Además, que su acción a nivel neuronal dependería de la co-expresión de la integrina $\alpha v\beta 3$ en los astrocitos, y de su interacción con Thy-1.

MODELO PROPUESTO

Considerando los siguientes puntos: 1) tanto síndecan-4 como la integrina $\alpha v\beta 3$ pueden interaccionar directamente con Thy-1; 2) síndecan-4 favorece los efectos neuronales mediados por la interacción integrina $\alpha v\beta 3$/Thy-1; 3) en su papel como co-receptor, los HSPGs disminuyen la constante de disociación y aumentan la afinidad entre ligando/receptor primario, amplificando la respuesta celular; y 4) las cadenas de HS ofrecen varios sitios de unión para sus ligandos, favoreciendo el estado multimerizado de éstos, se propuso para explicar la participación de síndecan-4 en los fenómenos neuronales mediante el siguiente modelo (**Figura 42**): "*Síndecan-4, en su papel como co-ligando, ofrecería varios sitios de unión para Thy-1, incrementando la concentración efectiva de la proteína neuronal en la membrana capaz de reconocer la integrina $\alpha v\beta 3$, favoreciendo de esta forma los parámetros de unión entre Thy-1/$\alpha v\beta 3$ y de esta forma los efectos neuronales resultantes rio abajo de Thy-1*".

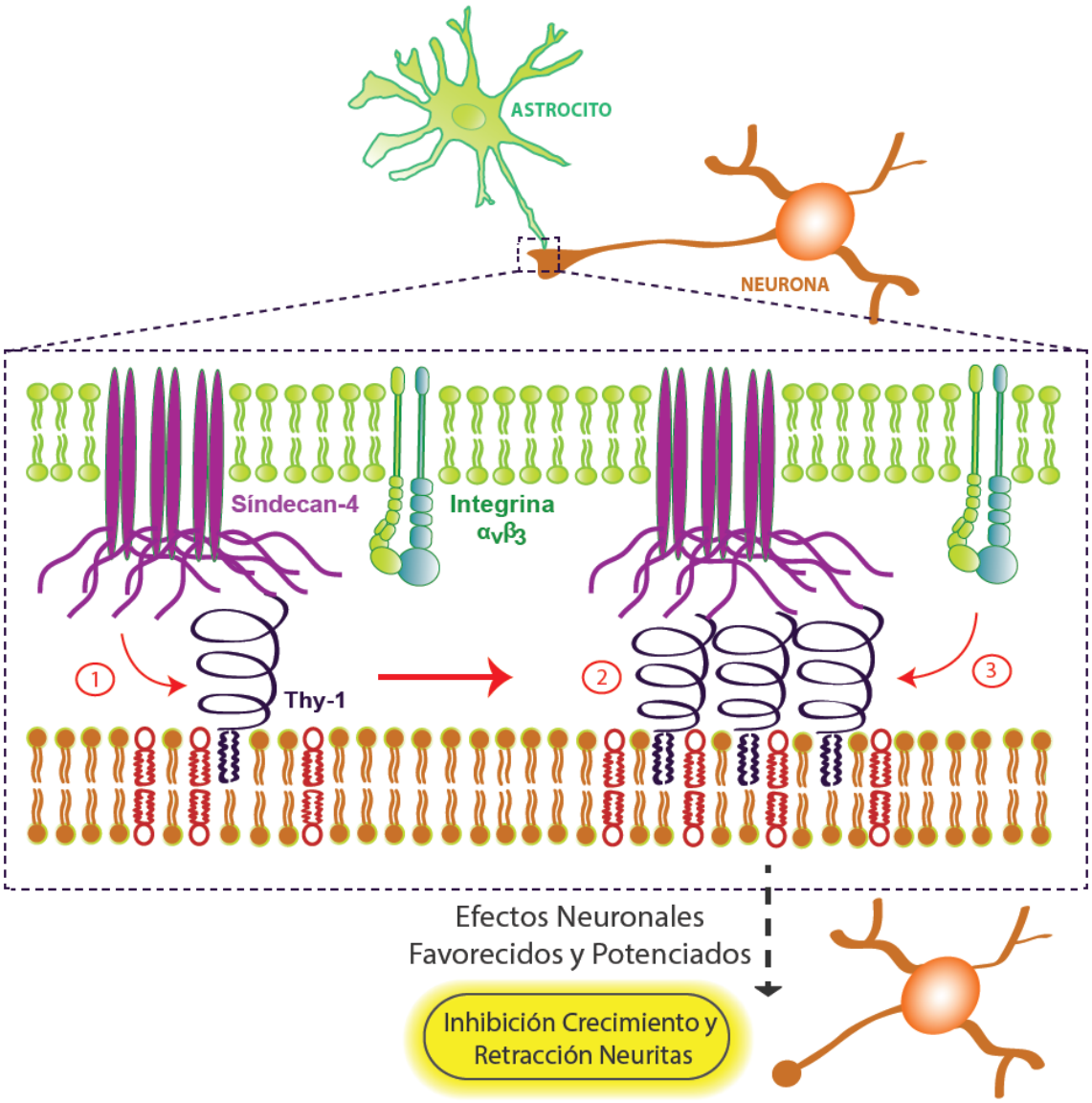


Figura 42. Modelo propuesto para explicar la participación de Síndecan-4 en los fenómenos neuronales inducidos por la interacción Thy-1/αvβ3. 1) Debido a su estado oligomerizado en la membrana celular y a su capacidad de interaccionar directamente con Thy-1, síndecan-4 ofrecería varios sitios de unión para la glicoproteína. **2)** Esto incrementaría la concentración efectiva de Thy-1 en la membrana neuronal capaz de reconocer la integrina αvβ3, **3)** favoreciendo los parámetros de unión entre Thy-1/αvβ3 y de esta forma los efectos neuronales rio abajo de Thy-1, como la inhibición del crecimiento de procesos neuronales y la retracción de las neuritas previamente formadas.

PROYECCIONES DEL ESTUDIO

Este estudio se basó en un modelo *in vitro*, utilizando como modelo neuronal la línea celular CAD, la cual posee marcadores específicas de las neuronas (Qi *y cols.*, 1997), como modelo de astrocitos la línea celular de astrocitos de rata DITNC1 y astrocitos primarios de rata bajo condiciones pro-inflamatorias, y también proteínas de fusión de las moléculas astrocíticas, síndecan-4-Fc y $\alpha v\beta 3$-Fc. Para corroborar la funcionalidad observada para síndecan-4 en la comunicación neurona-astrocito, y lograr relacionarla con lo que estaría ocurriendo en el SNC luego de una lesión, sería importante realizar los experimentos en ensayos que midan la regeneración axonal y dendrítica *in vivo*. Por ejemplo, ratones transgénicos que expresen constitutivamente Thy-1 fusionado a una proteína fluorescente (*e.g.* Thy-1-YFP) y que sean "knockout" para síndecan-4, se podrían exponer a procedimientos quirúrgicos que generen lesiones a nivel cortical o en la médula espinal, para luego evaluar los cambios en la morfología de los procesos neuronales lesionados a través de la microscopía de dos-fotones *in vivo*, para luego compararlos con ratones "wild type" para el proteoglicano, tal como fue reportado previamente (Paveliev *y cols.*, 2016).

En esta tesis se identificó que síndecan-4 potencia los efectos neuronales mediados por la interacción integrina $\alpha v\beta 3$/Thy-1, y se propuso que el posible mecanismo de acción del proteoglicano estaría dado por el favorecimiento de los parámetros de unión entre la integrina y Thy-1. Por lo tanto, sería importante verificar este postulado, por ejemplo, estudiando a través de las pinzas ópticas cómo los parámetros cinéticos de la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$ se ven afectados al adicionar al sistema la proteína de fusión de síndecan-4-Fc. Si la hipótesis es correcta, se esperaría como resultado que el tiempo de vida en ausencia de fuerza entre Thy-1/$\alpha v\beta 3$ aumentara en presencia del proteoglicano. Adicionalmente, a través de estos experimentos se podría evaluar si la presencia de síndecan-4-Fc provoca un cambio en el comportamiento tipo "slip bond" observado en la interacción Thy-1/$\alpha v\beta 3$, tal como lo reportó Fiore y colaboradores (Fiore *y cols.*, 2014), los cuales determinaron que en presencia de síndecan-4, la interacción Thy-1/$\alpha 5\beta 1$ se comporta como un "dynamic catch bond", caracterizado por un comportamiento trifásico ("slip-catch-slip"), donde fuerza menores a 10 pN disminuyen el tiempo de vida, fuerzas entre 10 y 30 pN incrementan el tiempo de vida de la interacción, y fuerzas mayores a 30 pN vuelven a disminuir el tiempo de vida. Además, a través de las pinzas ópticas también

sería importante evaluar si síndecan-4 es capaz de interaccionar con la integrina $\alpha v\beta 3$, lo anterior con el objetivo de aportar antecedentes que avalen la posibilidad que Thy-1 esté formando un complejo ternario con la integrina $\alpha v\beta 3$ y síndecan-4, tal como se ha descrito para otros sistemas como FGF/FGFR/sindcan-4 (Schlessinger *y cols.*, 2000), Slit/Robo/síndecan-4 (Johnson *y cols.*, 2004), o Thy-1/$\alpha 5\beta 1$/síndecan-4 (Fiore *y cols.*, 2014). Por último, sería interesante verificar las respuestas de las interacciones Thy-1/síndecan-4 y Thy-1/$\alpha v\beta 3$ a las fuerzas mecánicas en un sistema celular que se relacione más a lo que estaría ocurriendo *in vivo*. Para esto, se podría utilizar como transductor de fuerza la microscopía de fuerza atómica, técnica que permite obtener los parámetros cinéticos y termodinámicos de una interacción proteína-proteína a nivel de molécula-única, utilizando células únicas y aisladas. Esto nos permitiría obtener información respecto al comportamiento de estas interacciones con las proteínas embebidas en la membrana celular y enlazadas al citoesqueleto celular.

REFERENCIAS

Agnihotri, A., Soman, P., y Siedlecki, C.A. (2009). AFM measurements of interactions between the platelet integrin receptor GPIIbIIIa and fibrinogen. Colloids Surf B Biointerfaces *71*, 138-147.

Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A., y Couchman, J.R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. Int J Biochem Cell Biol *39*, 505-528.

Alvarez, A., Lagos-Cabre, R., Kong, M., Cardenas, A., Burgos-Bravo, F., Schneider, P., Quest, A.F., y Leyton, L. (2016). Integrin-mediated transactivation of P2X7R via hemichannel-dependent ATP release stimulates astrocyte migration. Biochim Biophys Acta *1863*, 2175-2188.

Allen, B.L., Filla, M.S., y Rapraeger, A.C. (2001). Role of heparan sulfate as a tissue-specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. J Cell Biol *155*, 845-858.

Aota, S., Nomizu, M., y Yamada, K.M. (1994). The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. J Biol Chem *269*, 24756-24761.

Apolloni, S., Amadio, S., Montilli, C., Volonte, C., y D'Ambrosi, N. (2013). Ablation of P2X7 receptor exacerbates gliosis and motoneuron death in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet *22*, 4102-4116.

Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Moon, L.D., y Fawcett, J.W. (2001). Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. Prog Brain Res *132*, 611-619.

Ashkin, A. (1997). Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 4853-4860.

Atwal, J.K., Pinkston-Gosse, J., Syken, J., Stawicki, S., Wu, Y., Shatz, C., y Tessier-Lavigne, M. (2008). PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. Science *322*, 967-970.

Avalos, A.M., Arthur, W.T., Schneider, P., Quest, A.F., Burridge, K., y Leyton, L. (2004). Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes. J Biol Chem *279*, 39139-39145.

Avalos, A.M., Labra, C.V., Quest, A.F., y Leyton, L. (2002). Signaling triggered by Thy-1 interaction with beta 3 integrin on astrocytes is an essential step towards unraveling neuronal Thy-1 function. Biol Res *35*, 231-238.

Avalos, A.M., Valdivia, A.D., Munoz, N., Herrera-Molina, R., Tapia, J.C., Lavandero, S., Chiong, M., Burridge, K., Schneider, P., Quest, A.F.*, y cols.* (2009). Neuronal Thy-1 induces astrocyte adhesion by engaging syndecan-4 in a cooperative interaction with alphavbeta3 integrin that activates PKCalpha and RhoA. J Cell Sci *122*, 3462-3471.

Ballut, L., Sapay, N., Chautard, E., Imberty, A., y Ricard-Blum, S. (2013). Mapping of heparin/heparan sulfate binding sites on alphavbeta3 integrin by molecular docking. J Mol Recognit *26*, 76-85.

Bandtlow, C.E., Schmidt, M.F., Hassinger, T.D., Schwab, M.E., y Kater, S.B. (1993). Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. Science *259*, 80-83.
Bandtlow, C.E., y Zimmermann, D.R. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. Physiol Rev *80*, 1267-1290.
Barclay, A.N. (1979). Localization of the Thy-1 antigen in the cerebellar cortex of rat brain by immunofluorescence during postnatal development. J Neurochem *32*, 1249-1257.
Barker, T.H., y Hagood, J.S. (2009). Getting a grip on Thy-1 signaling. Biochim Biophys Acta *1793*, 921-923.
Bass, M.D., y Humphries, M.J. (2002). Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. Biochem J *368*, 1-15.
Beech, J.N., Morris, R.J., y Raisman, G. (1983). Density of Thy-1 on axonal membrane of different rat nerves. J Neurochem *41*, 411-417.
Beg, A.A., Sommer, J.E., Martin, J.H., y Scheiffele, P. (2007). alpha2-Chimaerin is an essential EphA4 effector in the assembly of neuronal locomotor circuits. Neuron *55*, 768-778.
Bell, G.I. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. Science *200*, 618-627.
Bois, F.Y. (2013). Bayesian inference. Methods Mol Biol *930*, 597-636.
Bovolenta, P., y Fernaud-Espinosa, I. (2000). Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. Prog Neurobiol *61*, 113-132.
Bovolenta, P., Fernaud-Espinosa, I., Mendez-Otero, R., y Nieto-Sampedro, M. (1997). Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. Eur J Neurosci *9*, 977-989.
Bovolenta, P., Wandosell, F., y Nieto-Sampedro, M. (1993). Characterization of a neurite outgrowth inhibitor expressed after CNS injury. Eur J Neurosci *5*, 454-465.
Bradbury, E.J., Moon, L.D., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., y McMahon, S.B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. Nature *416*, 636-640.
Buffo, A., Rolando, C., y Ceruti, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. Biochem Pharmacol *79*, 77-89.
Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., y Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron *23*, 297-308.
Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., y Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. J Neurosci *22*, 183-192.
Bustamante, C.J., Kaiser, C.M., Maillard, R.A., Goldman, D.H., y Wilson, C.A. (2014). Mechanisms of cellular proteostasis: insights from single-molecule approaches. Annu Rev Biophys *43*, 119-140.

Campbell, I.D., y Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*.
Cardenas, A., Kong, M., Alvarez, A., Maldonado, H., y Leyton, L. (2014). Signaling pathways involved in neuron-astrocyte adhesion and migration. Curr Mol Med *14*, 275-290.
Carey, D.J. (1997). Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. Biochem J *327 (Pt 1)*, 1-16.
Carulli, S., Beck, K., Dayan, G., Boulesteix, S., Lortat-Jacob, H., y Rousselle, P. (2012). Cell surface proteoglycans syndecan-1 and -4 bind overlapping but distinct sites in laminin alpha3 LG45 protein domain. J Biol Chem *287*, 12204-12216.
Clement, A.M., Nadanaka, S., Masayama, K., Mandl, C., Sugahara, K., y Faissner, A. (1998). The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. J Biol Chem *273*, 28444-28453.
Coe, A.P., Askari, J.A., Kline, A.D., Robinson, M.K., Kirby, H., Stephens, P.E., y Humphries, M.J. (2001). Generation of a minimal alpha5beta1 integrin-Fc fragment. J Biol Chem *276*, 35854-35866.
Coles, C.H., Shen, Y., Tenney, A.P., Siebold, C., Sutton, G.C., Lu, W., Gallagher, J.T., Jones, E.Y., Flanagan, J.G., y Aricescu, A.R. (2011). Proteoglycan-specific molecular switch for RPTPsigma clustering and neuronal extension. Science *332*, 484-488.
Coulthard, M.G., Morgan, M., Woodruff, T.M., Arumugam, T.V., Taylor, S.M., Carpenter, T.C., Lackmann, M., y Boyd, A.W. (2012). Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. Am J Pathol *181*, 1493-1503.
Craig, D., Gao, M., Schulten, K., y Vogel, V. (2004). Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. Structure *12*, 2049-2058.
Crick, F.H. (1952). Is alpha-keratin a coiled coil? Nature *170*, 882-883.
Chen, C.H., Wang, S.M., Yang, S.H., y Jeng, C.J. (2005). Role of Thy-1 in in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons. J Cell Biochem *94*, 684-694.
Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F., y Schwab, M.E. (2000). Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. Nature *403*, 434-439.
Chen, W., Lou, J., y Zhu, C. (2010). Forcing switch from short- to intermediate- and long-lived states of the alphaA domain generates LFA-1/ICAM-1 catch bonds. J Biol Chem *285*, 35967-35978.
Chen, Y., Lee, H., Tong, H., Schwartz, M., y Zhu, C. (2017). Force regulated conformational change of integrin alphaVbeta3. Matrix Biol *60-61*, 70-85.
Chung, J.S., Tomihari, M., Tamura, K., Kojima, T., Cruz, P.D., Jr., y Ariizumi, K. (2013). The DC-HIL ligand syndecan-4 is a negative regulator of T-cell allo-reactivity responsible for graft-versus-host disease. Immunology *138*, 173-182.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., y Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci *8*, 752-758.

David, S., y Aguayo, A.J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. Science *214*, 931-933.

Davies, S.J., Fitch, M.T., Memberg, S.P., Hall, A.K., Raisman, G., y Silver, J. (1997). Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. Nature *390*, 680-683.

Dembo, M., Torney, D.C., Saxman, K., y Hammer, D. (1988). The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. Proc R Soc Lond B Biol Sci *234*, 55-83.

Dews, I.C., y Mackenzie, K.R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 20782-20787.

Dickendesher, T.L., Baldwin, K.T., Mironova, Y.A., Koriyama, Y., Raiker, S.J., Askew, K.L., Wood, A., Geoffroy, C.G., Zheng, B., Liepmann, C.D.*, y cols.* (2012). NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. Nat Neurosci *15*, 703-712.

Domeniconi, M., Zampieri, N., Spencer, T., Hilaire, M., Mellado, W., Chao, M.V., y Filbin, M.T. (2005). MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. Neuron *46*, 849-855.

Dou, C.L., y Levine, J.M. (1994). Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. J Neurosci *14*, 7616-7628.

Dreyer, E.B., Leifer, D., Heng, J.E., McConnell, J.E., Gorla, M., Levin, L.A., Barnstable, C.J., y Lipton, S.A. (1995). An astrocytic binding site for neuronal Thy-1 and its effect on neurite outgrowth. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 11195-11199.

Dudko, O.K., Hummer, G., y Szabo, A. (2008). Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 15755-15760.

Dutta, S., Horita, D.A., Hantgan, R.R., y Guthold, M. (2013). PROBING alphaIIbbeta3: LIGAND INTERACTIONS BY DYNAMIC FORCE SPECTROSCOPY AND SURFACE PLASMON RESONANCE. Nano Life *3*, 13400051-134000511.

Edgerton, V.R., Tillakaratne, N.J., Bigbee, A.J., de Leon, R.D., y Roy, R.R. (2004). Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. Annu Rev Neurosci *27*, 145-167.

Elfenbein, A., y Simons, M. (2013). Syndecan-4 signaling at a glance. J Cell Sci *126*, 3799-3804.

Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalska, A., Perez-Gonzalez, C., Castro, N., Zhu, C., Trepat, X., y Roca-Cusachs, P. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. Nat Cell Biol *18*, 540-548.

Ellison, J.A., Barone, F.C., y Feuerstein, G.Z. (1999). Matrix remodeling after stroke. De novo expression of matrix proteins and integrin receptors. Ann N Y Acad Sci *890*, 204-222.
Ellison, J.A., Velier, J.J., Spera, P., Jonak, Z.L., Wang, X., Barone, F.C., y Feuerstein, G.Z. (1998). Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. Stroke *29*, 1698-1706; discussion 1707.
Esko, J.D., y Selleck, S.B. (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. Annu Rev Biochem *71*, 435-471.
Evans, E., Kinoshita, K., Simon, S., y Leung, A. (2010). Long-lived, high-strength states of ICAM-1 bonds to beta2 integrin, I: lifetimes of bonds to recombinant alphaLbeta2 under force. Biophys J *98*, 1458-1466.
Evans, E., y Ritchie, K. (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds. Biophys J *72*, 1541-1555.
Evans, E.A., y Calderwood, D.A. (2007). Forces and bond dynamics in cell adhesion. Science *316*, 1148-1153.
Faissner, A., Clement, A., Lochter, A., Streit, A., Mandl, C., y Schachner, M. (1994). Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. J Cell Biol *126*, 783-799.
Fidler, P.S., Schuette, K., Asher, R.A., Dobbertin, A., Thornton, S.R., Calle-Patino, Y., Muir, E., Levine, J.M., Geller, H.M., Rogers, J.H.*, y cols.* (1999). Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. J Neurosci *19*, 8778-8788.
Filbin, M.T. (2003). Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. Nat Rev Neurosci *4*, 703-713.
Fiore, V.F., Ju, L., Chen, Y., Zhu, C., y Barker, T.H. (2014). Dynamic catch of a Thy-1-alpha5beta1+syndecan-4 trimolecular complex. Nat Commun *5*, 4886.
Fisher, D., Xing, B., Dill, J., Li, H., Hoang, H.H., Zhao, Z., Yang, X.L., Bachoo, R., Cannon, S., Longo, F.M.*, y cols.* (2011). Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. J Neurosci *31*, 14051-14066.
Forsten-Williams, K., Chua, C.C., y Nugent, M.A. (2005). The kinetics of FGF-2 binding to heparan sulfate proteoglycans and MAP kinase signaling. J Theor Biol *233*, 483-499.
Fournier, A.E., GrandPre, T., y Strittmatter, S.M. (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. Nature *409*, 341-346.
Franze, K., Gerdelmann, J., Weick, M., Betz, T., Pawlizak, S., Lakadamyali, M., Bayer, J., Rillich, K., Gogler, M., Lu, Y.B.*, y cols.* (2009). Neurite branch retraction is caused by a threshold-dependent mechanical impact. Biophys J *97*, 1883-1890.
Frese, M.A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W.C., y Dierks, T. (2009). Characterization of the human sulfatase Sulf1 and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain. J Biol Chem *284*, 28033-28044.
Friedlander, D.R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U., y Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds

to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. J Cell Biol *125*, 669-680.
Fromm, J.R., Hileman, R.E., Caldwell, E.E., Weiler, J.M., y Linhardt, R.J. (1995). Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. Arch Biochem Biophys *323*, 279-287.
Furuike, S., Ito, T., y Yamazaki, M. (2001). Mechanical unfolding of single filamin A (ABP-280) molecules detected by atomic force microscopy. FEBS Lett *498*, 72-75.
Gallo, G. (2004). Myosin II activity is required for severing-induced axon retraction in vitro. Exp Neurol *189*, 112-121.
Gallo, G. (2006). RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction. J Cell Sci *119*, 3413-3423.
Giger, R.J., Hollis, E.R., 2nd, y Tuszynski, M.H. (2010). Guidance molecules in axon regeneration. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a001867.
Gilbert, R.J., McKeon, R.J., Darr, A., Calabro, A., Hascall, V.C., y Bellamkonda, R.V. (2005). CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension. Mol Cell Neurosci *29*, 545-558.
Gladson, C.L., y Cheresh, D.A. (1991). Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. J Clin Invest *88*, 1924-1932.
Goddard, D.R., Berry, M., Kirvell, S.L., y Butt, A.M. (2002). Fibroblast growth factor-2 induces astroglial and microglial reactivity in vivo. J Anat *200*, 57-67.
Govek, E.E., Newey, S.E., y Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev *19*, 1-49.
Graziadei, P.P., Karlan, M.S., Graziadei, G.A., y Bernstein, J.J. (1980). Neurogenesis of sensory neurons in the primate olfactory system after section of the fila olfactoria. Brain Res *186*, 289-300.
Greene, L.A., y Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A *73*, 2424-2428.
Grumet, M., Friedlander, D.R., y Sakurai, T. (1996). Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. Perspect Dev Neurobiol *3*, 319-330.
Haeryfar, S.M., y Hoskin, D.W. (2004). Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. J Immunol *173*, 3581-3588.
Hagino, S., Iseki, K., Mori, T., Zhang, Y., Hikake, T., Yokoya, S., Takeuchi, M., Hasimoto, H., Kikuchi, S., y Wanaka, A. (2003). Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. Glia *42*, 130-138.
Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.H., y Haydon, P.G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. J Neurosci *27*, 6473-6477.
Hama, H., Hara, C., Yamaguchi, K., y Miyawaki, A. (2004). PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. Neuron *41*, 405-415.

Harder, A., Moller, A.K., Milz, F., Neuhaus, P., Walhorn, V., Dierks, T., y Anselmetti, D. (2015). Catch bond interaction between cell-surface sulfatase Sulf1 and glycosaminoglycans. Biophys J *108*, 1709-1717.
Henriquez, M., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Alvarez, A., Kong, M., Munoz, N., Eisner, V., Jaimovich, E., Schneider, P., Quest, A.F.*, y cols.* (2011). ATP release due to Thy-1-integrin binding induces P2X7-mediated calcium entry required for focal adhesion formation. J Cell Sci *124*, 1581-1588.
Hermosilla, T., Munoz, D., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Munoz, N., Nham, S.U., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A.F., y Leyton, L. (2008). Direct Thy-1/alphaVbeta3 integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication. Biochim Biophys Acta *1783*, 1111-1120.
Herrera-Molina, R., Frischknecht, R., Maldonado, H., Seidenbecher, C.I., Gundelfinger, E.D., Hetz, C., Aylwin Mde, L., Schneider, P., Quest, A.F., y Leyton, L. (2012). Astrocytic alphaVbeta3 integrin inhibits neurite outgrowth and promotes retraction of neuronal processes by clustering Thy-1. PLoS One *7*, e34295.
Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Kong, M., Alvarez, A., Cardenas, A., Quest, A.F., y Leyton, L. (2013). Thy-1-interacting molecules and cellular signaling in cis and trans. Int Rev Cell Mol Biol *305*, 163-216.
Homans, S.W., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Anand, R., y Williams, A.F. (1988). Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. Nature *333*, 269-272.
Horn, K.P., Busch, S.A., Hawthorne, A.L., van Rooijen, N., y Silver, J. (2008). Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. J Neurosci *28*, 9330-9341.
Horner, P.J., Thallmair, M., y Gage, F.H. (2002). Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. J Neurocytol *31*, 469-480.
Horowitz, A., Tkachenko, E., y Simons, M. (2002). Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. J Cell Biol *157*, 715-725.
Hsieh, S.H., Ferraro, G.B., y Fournier, A.E. (2006). Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. J Neurosci *26*, 1006-1015.
Hsueh, Y.P., y Sheng, M. (1999). Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. J Neurosci *19*, 7415-7425.
Hu, H. (2001). Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. Nat Neurosci *4*, 695-701.
Hueber, A.O., Pierres, M., y He, H.T. (1992). Sulfated glycans directly interact with mouse Thy-1 and negatively regulate Thy-1-mediated adhesion of thymocytes to thymic epithelial cells. J Immunol *148*, 3692-3699.
Iseki, K., Hagino, S., Mori, T., Zhang, Y., Yokoya, S., Takaki, H., Tase, C., Murakawa, M., y Wanaka, A. (2002). Increased syndecan expression by pleiotrophin and FGF receptor-expressing astrocytes in injured brain tissue. Glia *39*, 1-9.

Johnson, K.G., Ghose, A., Epstein, E., Lincecum, J., O'Connor, M.B., y Van Vactor, D. (2004). Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. Curr Biol *14*, 499-504.

Jones, L.L., Sajed, D., y Tuszynski, M.H. (2003). Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. J Neurosci *23*, 9276-9288.

Kainulainen, V., Wang, H., Schick, C., y Bernfield, M. (1998). Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. J Biol Chem *273*, 11563-11569.

Kanamori, M., Vanden Berg, S.R., Bergers, G., Berger, M.S., y Pieper, R.O. (2004). Integrin beta3 overexpression suppresses tumor growth in a human model of gliomagenesis: implications for the role of beta3 overexpression in glioblastoma multiforme. Cancer Res *64*, 2751-2758.

Kato, K., Lian, L.Y., Barsukov, I.L., Derrick, J.P., Kim, H., Tanaka, R., Yoshino, A., Shiraishi, M., Shimada, I., Arata, Y.*, y cols.* (1995). Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. Structure *3*, 79-85.

Kawano, H., Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Yoshioka, N., Li, H.P., Kawamura, K., Li, Y., y Raisman, G. (2012). Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. Cell Tissue Res *349*, 169-180.

Kinnunen, A., Niemi, M., Kinnunen, T., Kaksonen, M., Nolo, R., y Rauvala, H. (1999). Heparan sulphate and HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) in the development of the thalamocortical pathway of rat brain. Eur J Neurosci *11*, 491-502.

Koh, C.G. (2006). Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. Neurosignals *15*, 228-237.

Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., Higgs, R., Liu, F., Malkani, S., Bales, K.R.*, y cols.* (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. Nat Med *10*, 719-726.

Kokenyesi, R., y Bernfield, M. (1994). Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. J Biol Chem *269*, 12304-12309.

Kong, F., Garcia, A.J., Mould, A.P., Humphries, M.J., y Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. J Cell Biol *185*, 1275-1284.

Kong, M., Munoz, N., Valdivia, A., Alvarez, A., Herrera-Molina, R., Cardenas, A., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A.F., y Leyton, L. (2013). Thy-1-mediated cell-cell contact induces astrocyte migration through the engagement of alphaVbeta3 integrin and syndecan-4. Biochim Biophys Acta *1833*, 1409-1420.

Koprivica, V., Cho, K.S., Park, J.B., Yiu, G., Atwal, J., Gore, B., Kim, J.A., Lin, E., Tessier-Lavigne, M., Chen, D.F.*, y cols.* (2005). EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. Science *310*, 106-110.

Kranenburg, O., Poland, M., Gebbink, M., Oomen, L., y Moolenaar, W.H. (1997). Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. J Cell Sci *110 (Pt 19)*, 2417-2427.
Lautermilch, N.J., y Spitzer, N.C. (2000). Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. J Neurosci *20*, 315-325.
Lagos-Cabré, R., Alvarez, A., Kong, M., Burgos-Bravo, F., Cárdenas, A., Rojas, E., Herrera-Molina, R., Rojas, F., Schneider, P., Herrera-Marschitz, M., Quest, A.F., Zundert, B.V., Leyton, L. (2017). αvβ3 Integrin is a controller of astrocyte reactivity. Manuscrito en revisión J Neuroinflam.
Lehenkari, P.P., y Horton, M.A. (1999). Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy. Biochem Biophys Res Commun *259*, 645-650.
Levine, J.M. (1994). Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. J Neurosci *14*, 4716-4730.
Levy-Adam, F., Feld, S., Suss-Toby, E., Vlodavsky, I., y Ilan, N. (2008). Heparanase facilitates cell adhesion and spreading by clustering of cell surface heparan sulfate proteoglycans. PLoS One *3*, e2319.
Leyton, L., Schneider, P., Labra, C.V., Ruegg, C., Hetz, C.A., Quest, A.F., y Bron, C. (2001). Thy-1 binds to integrin beta(3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. Curr Biol *11*, 1028-1038.
Li, F., Redick, S.D., Erickson, H.P., y Moy, V.T. (2003). Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. Biophys J *84*, 1252-1262.
Li, Y., Hou, L.X., Aktiv, A., y Dahlstrom, A. (2007). Studies of the central nervous system-derived CAD cell line, a suitable model for intraneuronal transport studies? J Neurosci Res *85*, 2601-2609.
Li, Y., y Raisman, G. (1995). Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. Exp Neurol *134*, 102-111.
Litvinov, R.I., Barsegov, V., Schissler, A.J., Fisher, A.R., Bennett, J.S., Weisel, J.W., y Shuman, H. (2011). Dissociation of bimolecular alphaIIbbeta3-fibrinogen complex under a constant tensile force. Biophys J *100*, 165-173.
Litvinov, R.I., Bennett, J.S., Weisel, J.W., y Shuman, H. (2005). Multi-step fibrinogen binding to the integrin (alpha)IIb(beta)3 detected using force spectroscopy. Biophys J *89*, 2824-2834.
Litvinov, R.I., Vilaire, G., Shuman, H., Bennett, J.S., y Weisel, J.W. (2003). Quantitative analysis of platelet alpha v beta 3 binding to osteopontin using laser tweezers. J Biol Chem *278*, 51285-51290.
Liu, B., Chen, W., y Zhu, C. (2015). Molecular force spectroscopy on cells. Annu Rev Phys Chem *66*, 427-451.
Liu, B.P., Cafferty, W.B., Budel, S.O., y Strittmatter, S.M. (2006). Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *361*, 1593-1610.
Lopes, C.C., Dietrich, C.P., y Nader, H.B. (2006). Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. Braz J Med Biol Res *39*, 157-167.

Lorber, B. (2006). Role of NG2 in development and regeneration. J Neurosci *26*, 7127-7128.
Lourenco, T., y Graos, M. (2016). Modulation of Oligodendrocyte Differentiation by Mechanotransduction. Front Cell Neurosci *10*, 277.
Maeda, N., y Noda, M. (1996). 6B4 proteoglycan/phosphacan is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons. Development *122*, 647-658.
Mahanthappa, N.K., y Patterson, P.H. (1992). Thy-1 involvement in neurite outgrowth: perturbation by antibodies, phospholipase C, and mutation. Dev Biol *150*, 47-59.
Maldonado, H., Calderon, C., Burgos-Bravo, F., Kobler, O., Zuschratter, W., Ramirez, O., Hartel, S., Schneider, P., Quest, A.F., Herrera-Molina, R.*, y cols.* (2017). Astrocyte-to-neuron communication through integrin-engaged Thy-1/CBP/Csk/Src complex triggers neurite retraction via the RhoA/ROCK pathway. Biochim Biophys Acta *1864*, 243-254.
Margolis, R.K., Rauch, U., Maurel, P., y Margolis, R.U. (1996). Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. Perspect Dev Neurobiol *3*, 273-290.
McGraw, J., Hiebert, G.W., y Steeves, J.D. (2001). Modulating astrogliosis after neurotrauma. J Neurosci Res *63*, 109-115.
McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J., y Braun, P.E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. Neuron *13*, 805-811.
Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., y Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. Nature *397*, 50-53.
Milev, P., Friedlander, D.R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R.K., Grumet, M., y Margolis, R.U. (1994). Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. J Cell Biol *127*, 1703-1715.
Milner, R., y Campbell, I.L. (2006). Increased expression of the beta4 and alpha5 integrin subunits in cerebral blood vessels of transgenic mice chronically producing the pro-inflammatory cytokines IL-6 or IFN-alpha in the central nervous system. Mol Cell Neurosci *33*, 429-440.
Mitchell, G., Lamontagne, C.A., Lebel, R., Grandbois, M., y Malouin, F. (2007). Single-molecule dynamic force spectroscopy of the fibronectin-heparin interaction. Biochem Biophys Res Commun *364*, 595-600.
Moffitt, J.R., Chemla, Y.R., Smith, S.B., y Bustamante, C. (2008). Recent advances in optical tweezers. Annu Rev Biochem *77*, 205-228.
Moks, T., Abrahmsen, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjoquist, J., y Uhlen, M. (1986). Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. Eur J Biochem *156*, 637-643.
Montani, L., Gerrits, B., Gehrig, P., Kempf, A., Dimou, L., Wollscheid, B., y Schwab, M.E. (2009). Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-

GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system. J Biol Chem *284*, 10793-10807.
Moon, L.D., Asher, R.A., Rhodes, K.E., y Fawcett, J.W. (2001). Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. Nat Neurosci *4*, 465-466.
Morgan, M.R., Hamidi, H., Bass, M.D., Warwood, S., Ballestrem, C., y Humphries, M.J. (2013). Syndecan-4 phosphorylation is a control point for integrin recycling. Dev Cell *24*, 472-485.
Morgenstern, D.A., Asher, R.A., y Fawcett, J.W. (2002). Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. Prog Brain Res *137*, 313-332.
Morris, R. (1985). Thy-1 in developing nervous tissue. Dev Neurosci *7*, 133-160.
Morris, R.J., Tiveron, M.C., y Xue, G.P. (1992). The relation of the expression and function of the neuronal glycoprotein Thy-1 to axonal growth. Biochem Soc Trans *20*, 401-405.
Neely, M.D. (1993). Role of substrate and calcium in neurite retraction of leech neurons following depolarization. J Neurosci *13*, 1292-1301.
Neuman, K.C., y Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. Nat Methods *5*, 491-505.
Nishiyama, A., Lin, X.H., Giese, N., Heldin, C.H., y Stallcup, W.B. (1996). Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. J Neurosci Res *43*, 315-330.
Nishizaka, T., Seo, R., Tadakuma, H., Kinosita, K., Jr., y Ishiwata, S. (2000). Characterization of single actomyosin rigor bonds: load dependence of lifetime and mechanical properties. Biophys J *79*, 962-974.
Nugent, M.A., y Edelman, E.R. (1992). Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperactivity. Biochemistry *31*, 8876-8883.
Oh, E.S., Woods, A., y Couchman, J.R. (1997). Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. J Biol Chem *272*, 11805-11811.
Okuyama, E., Suzuki, A., Murata, M., Ando, Y., Kato, I., Takagi, Y., Takagi, A., Murate, T., Saito, H., y Kojima, T. (2013). Molecular mechanisms of syndecan-4 upregulation by TNF-alpha in the endothelium-like EAhy926 cells. J Biochem *154*, 41-50.
Ornitz, D.M., Yayon, A., Flanagan, J.G., Svahn, C.M., Levi, E., y Leder, P. (1992). Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. Mol Cell Biol *12*, 240-247.
Paveliev, M., Fenrich, K.K., Kislin, M., Kuja-Panula, J., Kulesskiy, E., Varjosalo, M., Kajander, T., Mugantseva, E., Ahonen-Bishopp, A., Khiroug, L., *y cols.* (2016). HB-GAM (pleiotrophin) reverses inhibition of neural regeneration by the CNS extracellular matrix. Sci Rep *6*, 33916.
Pearlman, A.L., y Sheppard, A.M. (1996). Extracellular matrix in early cortical development. Prog Brain Res *108*, 117-134.

Pekny, M., y Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia *50*, 427-434.
Pollard, T.D., y Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell *112*, 453-465.
Properzi, F., y Fawcett, J.W. (2004). Proteoglycans and brain repair. News Physiol Sci *19*, 33-38.
Properzi, F., Lin, R., Kwok, J., Naidu, M., van Kuppevelt, T.H., Ten Dam, G.B., Camargo, L.M., Raha-Chowdhury, R., Furukawa, Y., Mikami, T.*, y cols.* (2008). Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation. Eur J Neurosci *27*, 593-604.
Qi, Y., Wang, J.K., McMillian, M., y Chikaraishi, D.M. (1997). Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. J Neurosci *17*, 1217-1225.
Radany, E.H., Brenner, M., Besnard, F., Bigornia, V., Bishop, J.M., y Deschepper, C.F. (1992). Directed establishment of rat brain cell lines with the phenotypic characteristics of type 1 astrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 6467-6471.
Rakshit, S., y Sivasankar, S. (2014). Biomechanics of cell adhesion: how force regulates the lifetime of adhesive bonds at the single molecule level. Phys Chem Chem Phys *16*, 2211-2223.
Reif, A.E., y Allen, J.M. (1964). The Akr Thymic Antigen and Its Distribution in Leukemias and Nervous Tissues. J Exp Med *120*, 413-433.
Rico, F., Roca-Cusachs, P., Sunyer, R., Farre, R., y Navajas, D. (2007). Cell dynamic adhesion and elastic properties probed with cylindrical atomic force microscopy cantilever tips. J Mol Recognit *20*, 459-466.
Ridgway, J.B., Presta, L.G., y Carter, P. (1996). 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng *9*, 617-621.
Rinko, L.J., Lawrence, M.B., y Guilford, W.H. (2004). The molecular mechanics of P- and L-selectin lectin domains binding to PSGL-1. Biophys J *86*, 544-554.
Robert, P., Benoliel, A.M., Pierres, A., y Bongrand, P. (2007). What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies? J Mol Recognit *20*, 432-447.
Roca-Cusachs, P., Iskratsch, T., y Sheetz, M.P. (2012). Finding the weakest link: exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. J Cell Sci *125*, 3025-3038.
Rojas, F., Cortes, N., Abarzua, S., Dyrda, A., y van Zundert, B. (2014). Astrocytes expressing mutant SOD1 and TDP43 trigger motoneuron death that is mediated via sodium channels and nitroxidative stress. Front Cell Neurosci *8*, 24.
Rojas, F., Gonzalez, D., Cortes, N., Ampuero, E., Hernandez, D.E., Fritz, E., Abarzua, S., Martinez, A., Elorza, A.A., Alvarez, A.*, y cols.* (2015). Reactive oxygen species trigger motoneuron death in non-cell-autonomous models of ALS through activation of c-Abl signaling. Front Cell Neurosci *9*, 203.
Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P.*, y cols.* (1996).

Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. Neuron *16*, 675-686.
Saalbach, A., Haustein, U.F., y Anderegg, U. (2000). A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. J Invest Dermatol *115*, 882-888.
Santos-Silva, A., Fairless, R., Frame, M.C., Montague, P., Smith, G.M., Toft, A., Riddell, J.S., y Barnett, S.C. (2007). FGF/heparin differentially regulates Schwann cell and olfactory ensheathing cell interactions with astrocytes: a role in astrocytosis. J Neurosci *27*, 7154-7167.
Sarrazin, S., Lamanna, W.C., y Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*.
Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J., y Mohammadi, M. (2000). Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. Mol Cell *6*, 743-750.
Schneider, P. (2000). Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. Methods Enzymol *322*, 325-345.
Schwab, M.E., y Bartholdi, D. (1996). Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. Physiol Rev *76*, 319-370.
Schwab, M.E., y Thoenen, H. (1985). Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. J Neurosci *5*, 2415-2423.
Seki, M., Nawa, H., Morioka, T., Fukuchi, T., Oite, T., Abe, H., y Takei, N. (2002). Establishment of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for Thy-1; quantitative assessment of neuronal degeneration. Neurosci Lett *329*, 185-188.
Shea, T.B., Cressman, C.M., Spencer, M.J., Beermann, M.L., y Nixon, R.A. (1995). Enhancement of neurite outgrowth following calpain inhibition is mediated by protein kinase C. J Neurochem *65*, 517-527.
Shen, Y., Tenney, A.P., Busch, S.A., Horn, K.P., Cuascut, F.X., Liu, K., He, Z., Silver, J., y Flanagan, J.G. (2009). PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. Science *326*, 592-596.
Siddique, R., y Thakor, N. (2014). Investigation of nerve injury through microfluidic devices. J R Soc Interface *11*, 20130676.
Silver, J., y Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. Nat Rev Neurosci *5*, 146-156.
Smith, S.B., Cui, Y., y Bustamante, C. (2003). Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum. Methods Enzymol *361*, 134-162.
Snow, D.M., Atkinson, P.B., Hassinger, T.D., Letourneau, P.C., y Kater, S.B. (1994). Chondroitin sulfate proteoglycan elevates cytoplasmic calcium in DRG neurons. Dev Biol *166*, 87-100.
Snow, D.M., y Letourneau, P.C. (1992). Neurite outgrowth on a step gradient of chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG). J Neurobiol *23*, 322-336.
Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci *32*, 638-647.

Sofroniew, M.V., y Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol *119*, 7-35.
Sperinde, G.V., y Nugent, M.A. (2000). Mechanisms of fibroblast growth factor 2 intracellular processing: a kinetic analysis of the role of heparan sulfate proteoglycans. Biochemistry *39*, 3788-3796.
Stangner, T., Wagner, C., Singer, D., Angioletti-Uberti, S., Gutsche, C., Dzubiella, J., Hoffmann, R., y Kremer, F. (2013). Determining the specificity of monoclonal antibody HPT-101 to tau-peptides with optical tweezers. ACS Nano *7*, 11388-11396.
Sun, Z., Martinez-Lemus, L.A., Trache, A., Trzeciakowski, J.P., Davis, G.E., Pohl, U., y Meininger, G.A. (2005). Mechanical properties of the interaction between fibronectin and alpha5beta1-integrin on vascular smooth muscle cells studied using atomic force microscopy. Am J Physiol Heart Circ Physiol *289*, H2526-2535.
Suri, C., Fung, B.P., Tischler, A.S., y Chikaraishi, D.M. (1993). Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice. J Neurosci *13*, 1280-1291.
Swanson, R.A., Ying, W., y Kauppinen, T.M. (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. Curr Mol Med *4*, 193-205.
Szatmari, T., Otvos, R., Hjerpe, A., y Dobra, K. (2015). Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication. Dis Markers *2015*, 796052.
Takada, Y., Ye, X., y Simon, S. (2007). The integrins. Genome Biol *8*, 215.
Tiveron, M.C., Barboni, E., Pliego Rivero, F.B., Gormley, A.M., Seeley, P.J., Grosveld, F., y Morris, R. (1992). Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. Nature *355*, 745-748.
Urbanski, M.M., Kingsbury, L., Moussouros, D., Kassim, I., Mehjabeen, S., Paknejad, N., y Melendez-Vasquez, C.V. (2016). Myelinating glia differentiation is regulated by extracellular matrix elasticity. Sci Rep *6*, 33751.
Van Vactor, D., Wall, D.P., y Johnson, K.G. (2006). Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity. Curr Opin Neurobiol *16*, 40-51.
van Zundert, B., Izaurieta, P., Fritz, E., y Alvarez, F.J. (2012). Early pathogenesis in the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. J Cell Biochem *113*, 3301-3312.
Vartak-Sharma, N., y Ghorpade, A. (2012). Astrocyte elevated gene-1 regulates astrocyte responses to neural injury: implications for reactive astrogliosis and neurodegeneration. J Neuroinflammation *9*, 195.
Wang, J.T., Medress, Z.A., y Barres, B.A. (2012). Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. J Cell Biol *196*, 7-18.
Weinbaum, S., Tarbell, J.M., y Damiano, E.R. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. Annu Rev Biomed Eng *9*, 121-167.
Weisel, J.W., Shuman, H., y Litvinov, R.I. (2003). Protein-protein unbinding induced by force: single-molecule studies. Curr Opin Struct Biol *13*, 227-235.
Wells, R.G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. Hepatology *47*, 1394-1400.

Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K.H., Bothwell, M., y Poo, M.M. (2002). A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. Nat Neurosci *5*, 1302-1308.
Xie, F., y Zheng, B. (2008). White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. Exp Neurol *209*, 302-312.
Xu, D., y Esko, J.D. (2014). Demystifying heparan sulfate-protein interactions. Annu Rev Biochem *83*, 129-157.
Xu, D., Young, J.H., Krahn, J.M., Song, D., Corbett, K.D., Chazin, W.J., Pedersen, L.C., y Esko, J.D. (2013). Stable RAGE-heparan sulfate complexes are essential for signal transduction. ACS Chem Biol *8*, 1611-1620.
Xue, G.P., Calvert, R.A., y Morris, R.J. (1990). Expression of the neuronal surface glycoprotein Thy-1 is under post-transcriptional control, and is spatially regulated, in the developing olfactory system. Development *109*, 851-864.
Yamada, R.X., Sasaki, T., Ichikawa, J., Koyama, R., Matsuki, N., y Ikegaya, Y. (2008). Long-range axonal calcium sweep induces axon retraction. J Neurosci *28*, 4613-4618.
Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., y Suzuki, S. (1968). Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J Biol Chem *243*, 1523-1535.
Yamaguchi, Y. (2001). Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis. Semin Cell Dev Biol *12*, 99-106.
Yanagishita, M., y Hascall, V.C. (1992). Cell surface heparan sulfate proteoglycans. J Biol Chem *267*, 9451-9454.
Yang, T., Massa, S.M., y Longo, F.M. (2006). LAR protein tyrosine phosphatase receptor associates with TrkB and modulates neurotrophic signaling pathways. J Neurobiol *66*, 1420-1436.
Yiu, G., y He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. Nat Rev Neurosci *7*, 617-627.
Yuan, C., Chen, A., Kolb, P., y Moy, V.T. (2000). Energy landscape of streptavidin-biotin complexes measured by atomic force microscopy. Biochemistry *39*, 10219-10223.
Zhang, X., Craig, S.E., Kirby, H., Humphries, M.J., y Moy, V.T. (2004). Molecular basis for the dynamic strength of the integrin alpha4beta1/VCAM-1 interaction. Biophys J *87*, 3470-3478.
Zhu, C. (2014). Mechanochemitry: a molecular biomechanics view of mechanosensing. Ann Biomed Eng *42*, 388-404.