



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“PAPEL DE LA GLICOPROTEÍNA NEURONAL
THY-1 EN LA MIGRACIÓN Y PROLIFERACIÓN
DE ASTROCITOS”**

NICOLÁS RODRIGO MUÑOZ CUEVAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: Dra. LISETTE LEYTON CAMPOS

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“PAPEL DE LA GLICOPROTEÍNA NEURONAL
THY-1 EN LA MIGRACIÓN Y PROLIFERACIÓN
DE ASTROCITOS”**

NICOLÁS RODRIGO MUÑOZ CUEVAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: Dra. LISETTE LEYTON C.
PROFESOR CONSEJERO: Dr. JOSÉ LUÍS ARIAS B.
PROFESOR CONSEJERO: Dr. RICARDO OLIVARES P.M.

SANTIAGO, CHILE
2007

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente Tesis fue parcialmente financiada a través de:

- **Financiamiento otorgado a la Dra. Lisette Leyton:**

1. FIRCA 1R03TW006024.
2. FONDECYT 1040390.
3. FONDECYT 1070699

- **Financiamiento otorgado al Dr. Andrew Quest:**

1. FONDAP 15010006.

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, perteneciente al Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC).

DEDICATORIA

A mi Familia

A mis profesores

A mis compañeros y amigos

A mi hija

A mi patria y su futuro.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, Pamela Cuevas Espinosa y Jorge Muñoz Bravo quienes han sido fundamentales, al entregarme la mejor educación y muchas herramientas valiosas con las cuales afrontar la vida. Gracias por todo su amor, cariño, compañía y ayuda, y por siempre alentarme a hacer todo lo mejor posible. También agradecer a parte de mi familia como abuela Wilma, a mis tíos, Claudio, Patricio, Alejandro y Ricardo.

Agradezco también el apoyo incondicional de Dominique, la madre de mi hija, cuyo incentivo y optimismo constante siempre me ayudó a seguir adelante durante la realización de esta Tesis. Dominique, gracias por valorar todo mi esfuerzo y dedicación, por celebrar todos mis logros, por solidarizar conmigo cuando las cosas no andaban muy bien y por comprender que esta meta que me propuse siempre me iba exigir mucho tiempo y dedicación. También agradezco el amor y alegría que siempre me ha brindado mi hija Camila, un angelito que recién está descubriendo el mundo y quien me ha hecho valorar aún más las cosas simples y lindas de la vida y ser cada día un mejor padre.

Quiero agradecer a mis Directores de Tesis, Dra. Lisette Leyton y Dr. Andrew Quest por haberme dado la oportunidad de realizar mi Tesis en su Laboratorio y por toda la ayuda, apoyo, enseñanzas y oportunidades que me han entregado durante estos años.

También quiero agradecer la ayuda, compañerismo y apoyo de Daniel, quien me ayudo de gran manera en las primeras etapas de mi estadía en el laboratorio. Quisiera agradecer a todos y cada uno de mi compañeros, algunos que ya no están y otros que aun siguen hasta hoy como Vicente, Julio, Diego, Álvaro, Jorge, Manuel, Cristián, Freddy, Mauricio, Rodrigo, Lorena Lobos, Lorena Aguilar, Joan, Ana María, Tamara, Gonzalo, Alejandra, Patricia, Claudia, Sergio, Don Enrique, Lillian, Sra. Rosa, Hery y Natalia. Gracias a todos ellos por enseñarme lo que es trabajar en equipo, como ser una mejor persona y un mejor profesional.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
Informe de Aprobación	2
Fuentes de Financiamiento	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Índice de Contenidos	6
Índice de Ayudas Ilustrativas	9
Resumen	11
Summary	13
1. Introducción	15
2. Revisión Bibliográfica	18
2.1 La molécula de Thy-1.	18
2.2 Funciones de Thy-1.	20
2.3 Gliosis reactiva o Astrogliosis.	22
2.4 Receptor de Thy-1 en los astrocitos.	24
2.5 Integrinas y adhesión celular.	25
2.6 Migración celular.	27
2.6.1 Polarización celular.	28
2.6.2 Extensión de filopodios y formación de lamelipodios.	28
2.6.3 Formación de nuevas adhesiones.	29
2.6.4 Contracción celular.	29
2.6.5 Desensamblaje y desprendimiento de la cola.	30
2.7 Papel de las Rho GTPasas en la migración celular.	31
2.8 Función de la vía Erk en la proliferación celular.	33
2.9 Resultados obtenidos por nuestro laboratorio	34
3. Hipótesis	36
4. Objetivos específicos	36
5. Materiales y Métodos	37

	Página
5.1 Células y medios de cultivos.	37
5.2 Reactivos y materiales.	38
5.3 Equipamiento.	39
5.4 Anticuerpos.	39
5.5 Formación del complejo proteína de fusión con Proteína-A.	40
5.6 Ensayo de migración por herida.	40
5.7 Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta.	42
5.8 Cuantificación de las adhesiones focales.	43
5.9 Ensayo de viabilidad celular	43
5.10 Medición del ciclo proliferativo de astrocitos mediante citometría de flujo.	44
5.11 Ensayo de proliferación de astrocitos por azul de tripán.	45
5.12 Extracción de muestras para Western blot.	46
5.13 SDS-PAGE y Western blot.	47
5.14 Análisis densitométrico.	48
5.15 Análisis estadístico.	48
6. Resultados	49
6.1 Objetivo específico 1: Demostrar que la interacción de Thy-1 con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ estimula la migración de astrocitos.	49
6.1.1 Efecto de distintas concentraciones del complejo Thy-1-Fc/Proteína-A en la formación de adhesiones focales y fibras de estrés.	49
6.1.2 Ensayo de migración por herida.	52
6.1.3 Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta en el borde de la herida.	56

	Página	
6.2	Objetivo específico 2: Demostrar si la interacción de Thy-1 con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ estimula la proliferación de astrocitos.	59
6.2.1	Ensayo de viabilidad MTS (Promega).	59
6.2.2	Ensayo de proliferación de astrocitos por azul de tripán.	60
6.2.3	Análisis del ciclo proliferativo de astrocitos mediante citometría de flujo.	61
6.3	Objetivo específico 3: Estudiar si la enzima PI3-K está implicada en la migración de los astrocitos inducida por Thy-1.	63
6.3.1	Ensayo de migración por herida en presencia de inhibidores farmacológicos de la enzima PI3-K.	64
6.3.2	Activación de PI3-K analizada por Western blot.	65
6.4	Objetivo específico 4: Demostrar si la enzima Erk está implicada en la proliferación de los astrocitos inducida por Thy-1.	66
7.	Discusión	67
7.1	Estandarización del método de estimulación con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A.	67
7.2	Thy-1 induce migración de astrocitos.	69
7.3	La enzima PI3-K esta implicada en el proceso de migración celular inducido por Thy-1- Fc/Proteína-A.	71
7.4	Thy-1 no induce proliferación de astrocitos.	76
8.	Conclusiones	79
9.	Bibliografía	80

ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

Figuras		Página
• Figura 1:	Tipos de células gliales en el Sistema Nervioso.	15
• Figura 2:	Modelo de Thy-1.	20
• Figura 3:	Estructura e isoformas de las Integrinas.	26
• Figura 4:	Vías de señalización celular gatilladas en respuesta a la activación de las Integrinas por su ligando.	26
• Figura 5:	Etapas de la migración celular.	27
• Figura 6:	Ciclo de activación de las GTPasas de la familia Rho.	32
• Figura 7:	Ensayo de estimulación de astrocitos en presencia de inhibidores farmacológicos de la enzima PI3-K.	41
• Figura 8:	Esquema de estimulación de astrocitos para la obtención de extracto celular.	46
• Figura 9:	Señalización intracelular a través de Integrinas y FAK y su rol en la migración celular.	75
 Fotografías y Gráficos		
• Fotografía 1:	Inmunofluorescencia indirecta de astrocitos estimulados con distintas concentraciones del complejo Thy-1-Fc/ Proteína-A.	51
• Fotografía 2:	Ensayo de migración por herida a las 24 hrs de estimulación.	54
• Fotografía 3:	Visualización 3D de astrocitos en el borde de las heridas.	57

• Fotografía 4:	Zoom digital aplicado a la fotografía 3A.	58
• Gráfico 1:	Cuantificación del número de adhesiones focales por astrocito estimulados con distintas concentraciones del complejo Thy-1-Fc/ Proteína-A.	52
• Gráfico 2:	Cuantificación del ensayo de migración por herida.	55
• Gráfico 3:	Ensayo de viabilidad por MTS.	59
• Gráfico 4:	Ensayo de exclusión por azul de tripán.	60
• Gráfico 5:	Análisis del ciclo proliferativo de astrocitos mediante citometría de flujo.	62
• Gráfico 6:	Cuantificación de migración de astrocitos estimulados con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A, en presencia de inhibidores farmacológicos de la PI3-K.	64
• Gráfico 7:	Ensayo de fosforilación de Akt en astrocitos estimulados con o sin el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A.	65
• Gráfico 8:	Señales de tipo transitorio y sostenido de las Integrinas.	73

Tablas

• Tabla 1:	Porcentaje de astrocitos en las distintas fases del ciclo proliferativo.	63
-------------------	--	-----------

RESUMEN

Los astrocitos son el tipo celular más abundante de la glia en el Sistema Nervioso Central y cuando son expuestos a factores sanguíneos durante un daño cerebral, éstos se vuelven “reactivos”, cambiando su forma estrellada a una de tipo fibroblasto. Los astrocitos “reactivos” también proliferan y migran al sitio dañado para formar la cicatriz glial, constituyendo uno de los mayores impedimentos para que ocurra la regeneración neuronal. Se piensa que estos cambios morfológicos que sufren los astrocitos *in vivo*, podrían tener una relación con los gatillados *in vitro* por Thy-1, una glicoproteína neuronal muy abundante, que se une a la Integrina $\alpha_v\beta_3$ en la membrana de astrocitos provocando cambios dramáticos en la forma de estas células. Con estos antecedentes se planteó la hipótesis de que la estimulación sostenida de la Integrina $\alpha_v\beta_3$ por Thy-1 provoca la migración y/o proliferación de astrocitos, activando vías de transducción de señales que involucran a las proteínas quinasa PI3-K y Erk, respectivamente.

Para poner a prueba esta hipótesis, se utilizaron ensayos *in vitro* de cicatrización de herida, la cual consiste en la remoción de una porción de células desde una monocapa de astrocitos en cultivo de la línea celular de rata DI-TNC1 con punta de pipeta y el subsecuente monitoreo de la migración de éstos al área libre de células después de la estimulación con el complejo soluble de Thy-1-Fc/Proteína-A. Adicionalmente, se realizaron en paralelo, análisis de Inmunofluorescencia indirecta a diferentes tiempos para la visualización de estructuras de avance como filopodios y lamelipodios en los astrocitos del borde de la herida estimulados con el complejo soluble de Thy-1-Fc/Proteína-A.

Para demostrar la participación de la enzima PI3-K, los ensayos de cicatrización de herida se realizaron en presencia de inhibidores específicos de esta quinasa como son LY294002 y Wortmanina y mediante técnica de Inmunoblot

se determinaron los niveles de fosforilación de un sustrato de esta enzima, la proteína Akt, en los astrocitos estimulados con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A.

Para determinar si el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A inducía cambios en la proliferación y viabilidad de los astrocitos, se utilizaron técnicas de MTS y de exclusión de azul de tripán, así como también se analizó el ciclo proliferativo de éstas células por citometría de flujo.

Los resultados demuestran que Thy-1: 1) Induce la migración de los astrocitos DI-TNC1 al sitio de la herida; 2) Induce una mayor formación de estructuras de avance y migración como filopodios y lamelipodios, en los astrocitos del borde de la herida; 3) No induce proliferación ni aumento de la viabilidad de los astrocitos como tampoco cambios significativos en el ciclo proliferativo de éstas células; y 4) La quinasa PI3-K está implicada en la migración de los astrocitos estimulados por Thy-1.

En conjunto, estos datos sugieren que la interacción de Thy-1 con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ en la membrana de los astrocitos estimula cambios morfológicos llevando a estas células a una mayor adhesión celular para luego inducir su migración. Cabe destacar que la secuencia de eventos observados *in vitro* en este trabajo es similar a lo que ocurre en el proceso de astrogliosis, en el cual luego de un daño cerebral, los astrocitos se tornan reactivos, migran al sitio dañado y producen la cicatrización de la herida.

SUMMARY

Astrocytes, the most numerous glial cells in the central nervous system convert to fibroblast-like morphology when exposed to blood borne factors upon brain injury. These so called “reactive astrocytes” also proliferate and migrate to the site of damage to form the glial scar, which constitutes a major impediment to neuronal regeneration. Such morphological changes observed in astrocytes *in vivo* may be related to those triggered *in vitro* by Thy-1, an abundant neuronal glycoprotein that binds to $\alpha_v\beta_3$ Integrin in astrocytes inducing dramatic changes in cell shape. Thus, in this study we hypothesized that sustained Thy-1 engagement of $\alpha_v\beta_3$ Integrin stimulates astrocyte migration and/or proliferation, activating signaling pathways that involve both PI3-K and Erk kinases, respectively.

To test this hypothesis, we used an *in vitro* wound healing assay, where a DI-TNC1 astrocyte monolayer was scratched with a pipette tip and migration into the cell-free zone was monitored after treating the cells with soluble Thy-1-Fc/Protein-A complexes. In parallel, astrocytes at the cell border were monitored by indirect immunofluorescence at different time points in order to see typical migratory structures, such as lamellipodia and filopodia after the stimulation with Thy-1-Fc/Protein-A complexes. Wound healing assays were also performed in the presence of specific PI3-K inhibitors, such as LY294002 and Wortmanin to demonstrate the participation of this enzyme. Additionally, the phosphorylation of a PI3-K substrate, Akt, was analyzed by immunoblots to confirm whether activation of PI3-K was required for astrocyte migration. Moreover, astrocyte viability, proliferation and cell cycle were also tested using MTS, trypan blue exclusion assays and cell cytometry, respectively.

Results obtained indicated that: 1) Thy-1 induced the migration of DI-TNC1 astrocytes; 2) Typical migratory structures, such as filopodia and lamellipodia, were

formed at the cell border; 3) According to the results obtained with the viability, proliferation and cell cycle assays, Thy-1 had no effect on cell proliferation; and 4) PI3-K was implicated in Thy-1 induced astrocyte migration.

The data indicate that binding of Thy-1 to $\alpha_v\beta_3$ Integrin initially stimulates cell adhesion and changes in cell shape of astrocytes and subsequently cell migration in a sequence similar to that described for glial scar formation.

1. INTRODUCCIÓN

Las células gliales del sistema nervioso de vertebrados se pueden dividir en dos grandes grupos: microglía y macroglía. La microglía corresponde a los fagocitos del cerebro. La macroglía incluye: oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos (Figura 1).

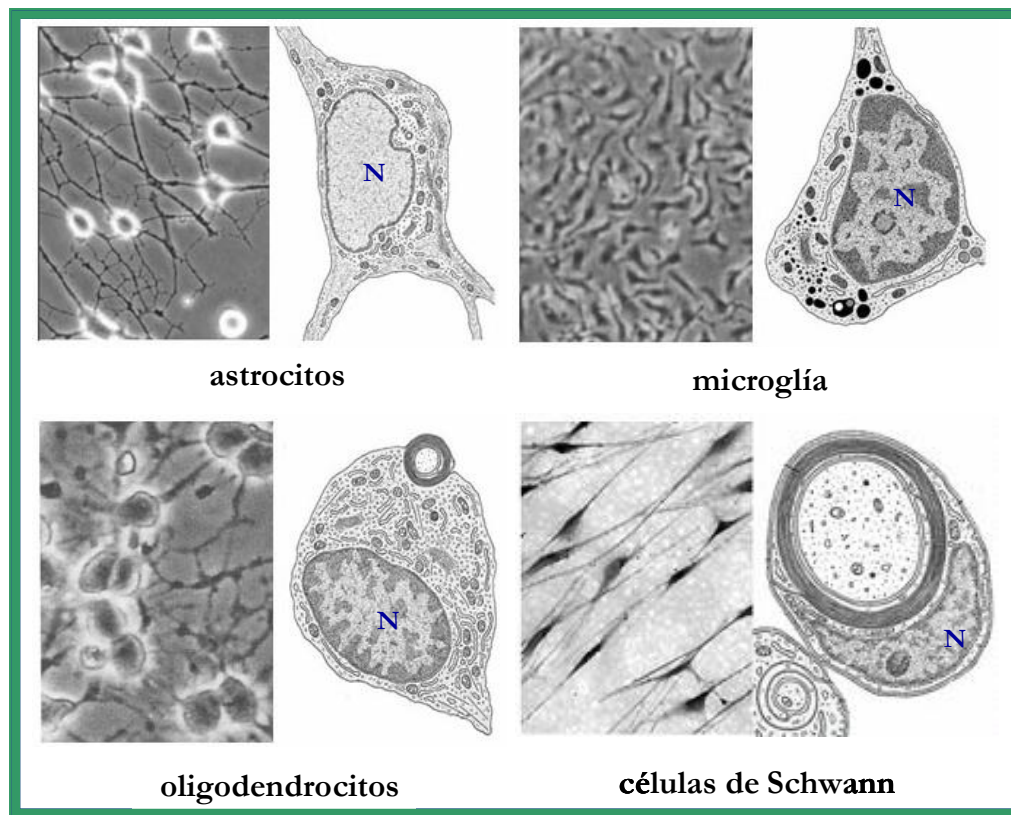


Figura 1: Tipos de células gliales en el Sistema Nervioso. Los astrocitos, microglía y oligodendrocitos conforman la glía del sistema nervioso central y las células de Schwann, la del sistema nervioso periférico. Para cada tipo celular se muestra una foto de contraste de fases (izquierda) y un dibujo de la organización ultraestructural (derecha). N: núcleo. Imagen compuesta de fotografías encontradas en la página web IUPS Physiome project-Image Map (http://www.bioeng.auckland.ac.nz/physiome/images/images_map.php).

Los oligodendrocitos están a cargo de la formación de la vaina de mielina, la cual forma una barrera alrededor de las fibras nerviosas, permitiendo la transmisión eléctrica eficiente en el cerebro. En el sistema nervioso periférico, las

principales células gliales son las células de Schwann, algunas de las cuales forman una vaina de mielina en los nervios periféricos. Aquellas células de Schwann que no forman una vaina de mielina se asemejan a los astrocitos y tendrían funciones de soporte metabólico y mecánico (Jessen, 2004).

Los astrocitos son el tipo celular más numeroso de las células gliales en el sistema nervioso central (SNC) y participan en múltiples funciones. Hasta hace algún tiempo, se pensaba que los astrocitos sólo brindaban soporte estructural, nutrientes y protección a las células neuronales, pero en la actualidad se les asigna un papel más activo en el cerebro, como la inhibición del crecimiento de neuritas y la regeneración neuronal. Los astrocitos presentan una forma de excitabilidad y comunicación basada en variaciones del Ca^{2+} intracelular que pueden ser gatilladas por neurotransmisores liberados desde terminales sinápticos activos (Porter y McCarthy, 1996; Pasti *et al*, 1997). Este aumento de Ca^{2+} produce a su vez la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato desde los astrocitos (Parpura *et al*, 1994), por lo cual éstos pueden modular neuronas vecinas y así regular la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Perea y Araque, 2002; Fellin y Carmignoto, 2004). Éstas y otras evidencias más recientes indican que, existe una señalización bi-direccional entre neuronas y astrocitos, confirmándose que estos últimos son componentes más dinámicos de lo que se pensó inicialmente (Hansson y Ronnback, 2003; Volterra y Meldolsi, 2005; Leyton *et al.*, 2001 y Avalos *et al.*, 2002, 2004).

Cuando los astrocitos son expuestos a factores sanguíneos durante un daño cerebral, éstos se adhieren, expanden, migran, dividen y cambian de una forma estrellada a una tipo fibroblasto, en un proceso conocido como gliosis reactiva o astrogliosis. Este proceso se requiere para la formación de la cicatriz glial, la cual es necesaria para la protección del cerebro de lesiones secundarias (Ridet *et al.*, 1997).

El proceso de astrogliosis ha sido considerado durante largo tiempo el mayor impedimento de la regeneración neuronal en el SNC, debido a que los astrocitos dejan de apoyar la diferenciación neuronal y secretan factores que impiden el crecimiento de axones frente a un daño cerebral. Esta falta de regeneración de neuronas en el tejido adulto dañado se debe también a la presencia de un gran número de proteínas inhibitorias presentes en los oligodendrocitos y neuronas que bloquean el crecimiento de axones. Ejemplo de esto son las glicoproteínas asociadas a mielina (MAG) (Mukhopadhyay, *et al.*, 1994; McKeiracher, 1994), semaforinas 4D (Moreau-Fauvarque, 2003), EphrinB3 (Benson, 2003), Nogo (Chen *et al.*, 2000; GrandPre *et al.*, 2000) y Omgp (Kottis *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002), producidas por los oligodendrocitos y la glicoproteína neuronal Thy-1 (Tiveron *et al.*, 1992).

Thy-1 es una glicoproteína que se encuentra asociada a la cara externa de la membrana de las neuronas a través de una modificación lipídica denominada tallo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Tiveron *et al.*, 1994). Se ha demostrado que un receptor de Thy-1 en los astrocitos es la Integrina $\alpha_v\beta_3$ (Leyton *et al.*, 2001). La interacción de Thy-1 con esta Integrina aumenta la fosforilación en tirosina de diversas proteínas en los astrocitos. Este aumento de fosforilación, sumado a la activación de proteínas G pequeñas de la familia Rho induce cambios morfológicos en las células llevándolas a una mayor adhesión y expansión sobre su sustrato (Avalos *et al.*, 2004).

Este estudio pretende entender si estos cambios morfológicos inducidos por Thy-1 preceden a la inducción de migración y proliferación de astrocitos, eventos importantes y necesarios para la astrogliosis y formación de la cicatriz glial.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La molécula de Thy-1.

Thy-1 pertenece a la súper familia de inmunoglobulinas (Figura 2). Se ha demostrado que estas proteínas participan en diversos procesos durante el desarrollo del cerebro, como por ejemplo, migración neuronal, extensión de los axones, reconocimiento de los blancos y formación de las sinapsis, como también en la mantención y función de los circuitos neuronales en el adulto (Rougon y Hobert, 2003). Otros miembros de esta familia, como L1 y N-CAM, presentan una expresión regulada durante el desarrollo y pueden promover el crecimiento axonal (Kiryushko *et al*, 2004).

Thy-1 es una glicoproteína pequeña de 25 a 37 kDa constituida por 110 aminoácidos y que se localiza en microdominios de membrana tipo balsas lipídicas (Fujimoto, 1996). Thy-1 fue caracterizada en 1964 como uno de los principales antígenos de superficie de los linfocitos T de ratón y como una de las proteínas más abundantes en el cerebro adulto de rata (Reif y Allen, 1964), constituyendo entre un 2,5% a un 7,5% del contenido proteico total de la superficie neuronal (Beech *et al*, 1983). Aunque se han descrito homólogos de Thy-1 en varios organismos, tales como calamar, rana, pollo, perro, ratón, rata y humano (Haeryfar y Hoskin, 2004), su distribución en el sistema inmune varía según la especie y el estado de diferenciación de las células. Por ejemplo en ratón, Thy-1 presenta una alta expresión tanto en timocitos como en células T periféricas maduras (Killeen, 1997); en rata se expresa en timocitos inmaduros (Crawford y Barton, 1986) y en humanos prácticamente no se expresa en células T, y sólo se encuentra en una pequeña población de timocitos corticales (McKenzie y Fabre, 1981). En contraste, Thy-1 presenta patrones de expresión común en el sistema nervioso de varias especies, lo que sugiere que tiene una función altamente conservada en este sistema, especialmente en mamíferos (Mahanthappa y Patterson, 1992).

A diferencia de lo observado en neuronas, Thy-1 se expresa en bajos niveles en otros tipos celulares. Está presente en fibroblastos, mioblastos, células epidermales y keratinocitos de ratón y todas la especies antes mencionadas (Reif y Allen, 1964). En humanos, Thy-1 se expresa en células endoteliales activadas, células musculares lisas, una subpoblación de células de la médula ósea (CD34⁺) y células hematopoyéticas derivadas de la sangre del cordón umbilical y de hígado fetal (Dalchau *et al.*, 1989).

La expresión de Thy-1 en el cerebro comienza después del nacimiento y se regula durante el desarrollo (Morris, 1985). Los niveles de Thy-1 en el cerebro de rata neonata (Barclay, 1979), al igual que en el cerebro humano en desarrollo, son bajos en comparación con el cerebro adulto (Seeger *et al.*, 1982). En cerebro de ratón se demostró que los niveles de Thy-1 aumentan dramáticamente (aproximadamente 100 veces), durante las primeras semanas de desarrollo postnatal (Reif y Allen, 1964). Esto fue confirmado posteriormente en rata, perro y pollo (Morris, 1985). La expresión tardía de Thy-1 en los axones, sugiere que Thy-1 participaría en la estabilización de las redes neuronales, inhibiendo el crecimiento axonal (Chen *et al.*, 2005).

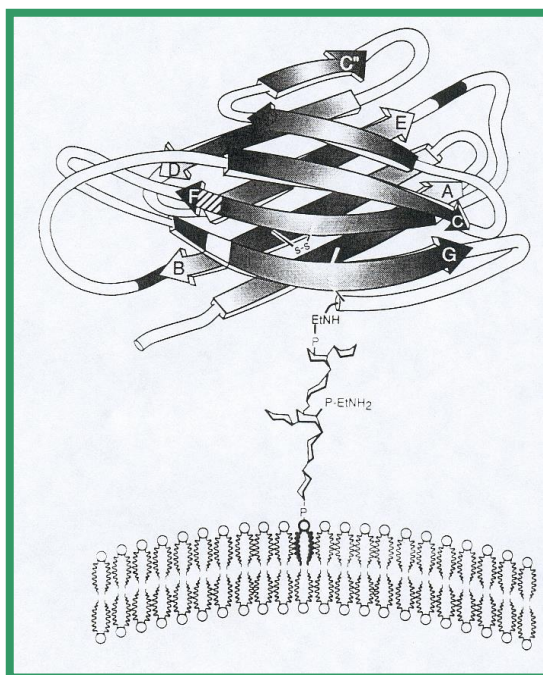


Figura 2: Modelo de Thy-1. Está basado en la región variable de las inmunoglobulinas y la estructura determinada para el grupo Glicosilfosfatidilinositol de Thy-1. Las flechas indican las hebras de hojas plisadas beta presentes en la estructura de Thy-1. Los residuos de asparagina a los cuales se unen cadenas de carbohidratos (en ratón y rata) se indican como una banda oscura a continuación de las hojas B y E, y como una banda blanca en la hoja G. Grandes cadenas de azúcar cubren la parte izquierda, delantera y trasera de la molécula. El residuo 89 (indicado con líneas diagonales en la hoja F) es arginina o glutamina en ratón y le confiere el determinante antigénico alélico a la molécula (Thy-1.1/1.2). La mayoría de los residuos que se encuentran uniendo las distintas hojas tienen pocas restricciones estructurales y aquellos que se proyectan hacia la cara izquierda de la molécula presentan una variabilidad considerable entre las especies de vertebrados. En cambio, los residuos que se proyectan hacia la cara derecha y superior de la molécula son bastante conservados. (Adaptado de Morris, 1992).

2.2 Funciones de Thy-1.

En las últimas décadas se han estudiado varias funciones de Thy-1 tanto inmunológicas como no inmunológicas. En ratón por ejemplo, Thy-1 promueve la adhesión de los timocitos a células epiteliales del timo (He *et al*, 1991), unión que puede ser bloqueada con glicanos sulfatados ya que Thy-1 puede interactuar directamente con éstos (Hueber *et al*, 1992). Por otro lado, Thy-1 regula la apoptosis de timocitos de ratón (Hueber *et al*, 1994), media la adhesión de clones de linfocitos T citotóxicos a células L (Johnson *et al*, 1993) y la adhesión entre

astrocitos y linfomas transfectados con Thy-1 (Dreyer *et al*, 1995). Se ha demostrado que la Integrina $\alpha_V\beta_3$ presente en la superficie de astrocitos, es la molécula que interactúa directamente con Thy-1 (Leyton *et al.*, 2001). Estudios recientes, demuestran que Thy-1 humano también media la adhesión entre células endoteliales activadas y neutrófilos/monocitos a través de la interacción con la Integrina $\alpha_M\beta_2$. Esta interacción cumple una función en la adhesión y transmigración de estas células a través del endotelio, hecho importante en el proceso de inflamación (Wetzel *et al*, 2004). Las células endoteliales activadas expresan grandes cantidades de Thy-1, que interactúa con la Integrina $\alpha_V\beta_3$ presente en células de melanoma, mediando la progresión y metástasis en este tipo de cáncer (Saalbach *et al*, 2002 y 2005).

Adicionalmente, se ha demostrado la interacción directa entre Thy-1 y la Integrina $\alpha_X\beta_2$, lo que podría jugar un papel en la homeostasis de las células T a través de la regulación de su proliferación y producción de citoquinas (Choi *et al*, 2005). Otras evidencias indican que Thy-1 puede promover la activación de las células T (Gunter *et al*, 1984; Leyton *et al*, 1999), y que la señalización por Thy-1 promueve la generación de linfocitos T citotóxicos *in vitro*, aunque no es capaz de inducir la función citolítica (Haeryfar, 2003).

También se le ha otorgado una función en la inhibición del crecimiento de neuritas en neuronas inducidas a diferenciar (Tiveron *et al.*, 1992). La interacción entre Thy-1 de neuronas adultas con astrocitos maduros inhibe la extensión de neuritas, lo que no ocurre cuando Thy-1 interactúa con otros tipos de células gliales, como por ejemplo las células de Schwann, que incluso mantienen y promueven el crecimiento axonal *in vitro* (Tiveron *et al.*, 1992). Evidencias señalan que al bloquear Thy-1 se elimina la inhibición que esta proteína normalmente ejerce sobre el crecimiento de las neuritas. Por ejemplo, al tratar células cromafines y PC12 con anticuerpos específicos anti-Thy-1 se genera un aumento del crecimiento de las neuritas. Si células cromafines son tratadas con

Fosfolipasa C específica para Fosfatidilinositol (PI-PLC, enzima que remueve el dominio proteico extracelular de Thy-1 de la superficie celular), se induce el crecimiento de las neuritas y, además, células PC12 deficientes en Thy-1 emiten y extienden neuritas a una frecuencia muy alta (Mahanthappa y Patterson, 1992). La línea neuronal NG115/401L, la cual normalmente no expresa Thy-1 en su superficie, extiende sus neuritas aún cuando está creciendo sobre astrocitos maduros. Sin embargo, ésto no ocurre al transfectar el cDNA de Thy-1 en estas células (Tiveron *et al.*, 1992), apoyando la función inhibitoria del crecimiento de neuritas sugerida para Thy-1. Estos antecedentes sugieren que Thy-1 tiene un papel importante en la inhibición del crecimiento de neuritas.

La generación de ratones “knock-out” para Thy-1, no aportó mayores evidencias a su función pues éstos presentan un fenotipo normal, sin alteraciones reproductivas, neuroanatómicas y de comportamiento general (Nosten-Bertrand *et al.*, 1996). Sin embargo, estos ratones manifiestan anomalías a nivel de la respuesta LTP (Long Term Potentiation), siendo ésta fuertemente inhibida en el giro dentado del hipocampo, aunque el aprendizaje espacial no se ve afectado (Nosten-Bertrand *et al.*, 1996). También presentan cierto grado de déficit cognitivo selectivo que les impide utilizar señales transmitidas socialmente para elegir correctamente su alimento (Mayeux-Portas *et al.*, 2000). Los ratones “knockout” también presentan alteraciones en la respuesta inmune cutánea y en el desarrollo normal de la retina (Beissert *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1999)

2.3 Gliosis reactiva o Astrogliosis.

La capacidad del Sistema Nervioso (SN) para reparar axones dañados se conoce como “regeneración neuronal” y es un proceso que se inicia con la sobrevivencia de las neuronas dañadas, la elongación del axón lesionado hasta su blanco inicial, la mielinización de este nuevo axón y el establecimiento de la sinapsis perdida (Horner y Gage, 2000). La efectividad del proceso depende de la

localización de la zona lesionada y se describen diferencias sustanciales entre el SNC y el Sistema Nervioso Periférico (SNP).

Las lesiones en el SNP presentan un tipo de degeneración conocida como “Walleriana” (Fawcett y Keynes, 1990). La degeneración Walleriana se inicia con la ruptura de los axones y de la mielina, pero esta última, a diferencia de lo que ocurre en el SNC, es rápidamente removida por macrófagos y las células de Schwann que invaden la zona. Las células de Schwann activadas se encargan de reducir la expresión de distintas proteínas inhibitorias presentes en la mielina y de aumentar la expresión de p75 un receptor de baja afinidad para el factor de crecimiento neuronal (Hall, 2001). Luego estas células se diferencian y proliferan formando verdaderos cordones distales a los axones lesionados, generando vías y sustrato para los axones en regeneración (Dezawa, 2002). En la parte proximal a la lesión se induce la activación de una serie de genes relacionados con sobrevivencia como son c-Fos y c-Jun (Soares *et al.*, 2001). Paralelamente, se induce la formación de 1 ó 2 conos de crecimiento que comienzan a crecer por las rutas formadas por las células de Schwann. Entonces, en la lesión del SNP no existe la formación de una cicatriz glial como en el SNC, sino la formación de una especie de ruta nodriza para los axones en reparación. Las células de Schwann que rodean a estos axones secretan una serie de factores neurotróficos que favorecen el crecimiento de estas fibras (Dezawa *et al.*, 2001).

A diferencia del SNP, el SNC se caracteriza por su escasa capacidad regenerativa, fundamentalmente asociada a la falta de factores neurotróficos, a presencia de moléculas inhibitorias (mayoritariamente presentes en la mielina), la falla en la activación de genes necesarios para sobrevivencia y regeneración y a la formación de la cicatriz glial (Abankwa y Kury, 2004).

Inicialmente, las neuronas lesionadas del SNC, responden intentando reparar los axones lesionados pero prontamente se produce el colapso de los

conos de crecimiento, con la muerte o atrofia de las neuronas. Sin embargo, estas mismas neuronas en un ambiente del SNP (basados en injertos de células Schwann), son capaces de regenerar sus axones en gran medida (Richardson *et al.*, 1980). Esto significa que las neuronas del SNC no carecen de la propiedad de regenerar sus axones, sino que su entorno enriquecido en moléculas inhibitorias y la falta de factores neurotróficos se conjugan en su contra impidiendo la reparación de los axones dañados. En efecto, proteínas inhibitorias como Nogo, Mag y Omgp encontradas en la mielina son producidas por los oligodendrocitos (Domeniconi y Filbin, 2005).

Sin embargo, el principal impedimento de la regeneración neuronal en el SNC es la cicatriz glial, estructura que forma una verdadera barrera física impidiendo el paso de los axones en regeneración (Davies *et al.*, 1999). Frente a un daño cerebral, los astrocitos "reactivos" migran a la zona de la herida para formar esta cicatriz. Su reactividad se refleja también en cambios de expresión de proteínas, como se ha observado para la Integrina $\alpha_v\beta_3$ cuya expresión es inducida por astrocitos activados a consecuencia de la oclusión de una arteria cerebral (Ellison *et al.*, 1998). Otro ejemplo similar existe para paladina, una proteína asociada al citoesqueleto, cuya expresión en astrocitos se ve aumentada a consecuencia de una herida cerebral (Boukhelifa *et al.*, 2003).

2.4 Receptor de Thy-1 en los astrocitos.

Se ha postulado la existencia de un ligando para Thy-1 en varios tipos celulares, tales como células epiteliales (Hueber *et al.*, 1992), fibroblastos de ratón (Johnson *et al.*, 1993) y astrocitos (Dreyer *et al.*, 1995). Las propiedades de interacción de Thy-1 con los astrocitos maduros sugirieron que la unión de Thy-1 a un ligando putativo en estas célula gatillaba señales que inhibían el crecimiento de neuritas en células neuronales (Tiveron *et al.*, 1992 y 1994). Por lo tanto, la búsqueda de un ligando para Thy-1 en astrocitos fue importante como punto de

partida para dilucidar la función de Thy-1 en el SNC.

Comparando las secuencias de Thy-1 humano, ratón y rata se observó que éstas poseían una secuencia de tipo RLD (Arg-Leu-Asp), dentro de un grupo altamente conservado de aminoácidos (Leyton *et al*, 2001). Esta secuencia resultó ser análoga al péptido RGD de reconocimiento de las Integrinas. Dado que el péptido RLD se había descrito como un sitio de unión para las Integrinas $\alpha_V\beta_3$ y $\alpha_M\beta_2$ (Rouslahti, 1996), se postuló que Thy-1 podría ser un ligando heterofílico para miembros de la familia de las Integrinas, especialmente la Integrina $\alpha_V\beta_3$ (Leyton *et al*, 2001), la cual se encuentra presente en la superficie de los astrocitos (Tawil *et al*, 1994), a diferencia de la Integrina $\alpha_M\beta_2$, que se expresa sólo en leucocitos (Gille y Swerlick, 1996).

2.5 Integrinas y señalización intracelular.

Las Integrinas son glicoproteínas transmembrana que están constituidas por dos subunidades denominadas α y β las cuales están unidas no covalentemente entre sí. Hasta la fecha se han descrito 24 Integrinas diferentes en mamíferos, conformadas por distintas combinaciones de 18 cadenas α y 8 cadenas β (Figura 3) (Hynes, 2002). Esta diversidad es mayor aún debido a la existencia de una serie de productos de “splicing” alternativos tanto en las cadenas α como en las β (De Melker y Sonnenberg, 1999).

Las Integrinas permiten la interacción entre proteínas de otras células y el citoesqueleto, así como también entre proteínas de la matriz extracelular (MEC) y el citoesqueleto. Estas interacciones favorecen la adhesión celular producto de la activación de una cascada de señales intracelulares con la consecuente formación de las adhesiones focales, reorganización del citoesqueleto, polimerización de los filamentos de actina y la formación de las fibras de estrés, lo que finalmente lleva a

la alteración del comportamiento celular y la inducción de la migración y proliferación celular (Figura 4), (Burrige y Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

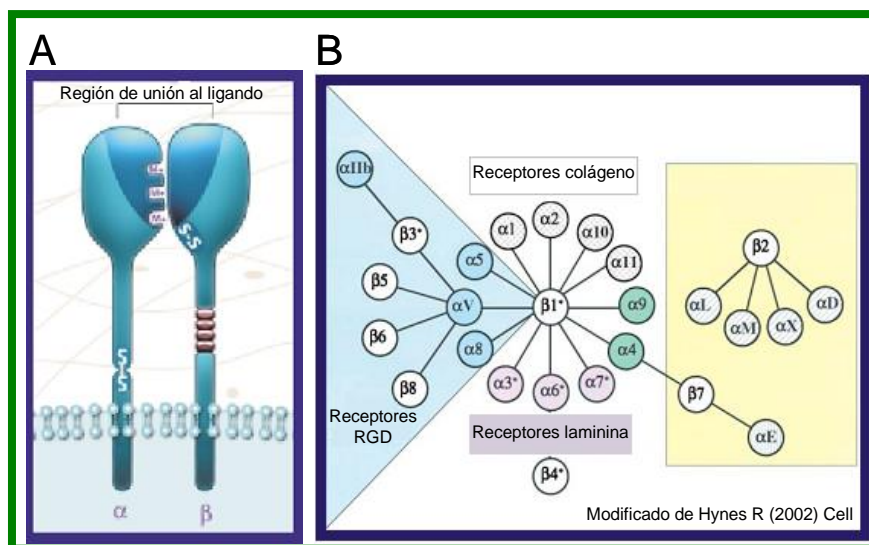


Figura 3: Estructura e isoformas de las Integrinas: Las Integrinas están formadas por heterodímeros que poseen cadenas α y β . Juntas forman el sitio de unión al ligando (A). En B se muestran los heterodímeros existentes y los diferentes receptores que pueden unir estos dímeros.

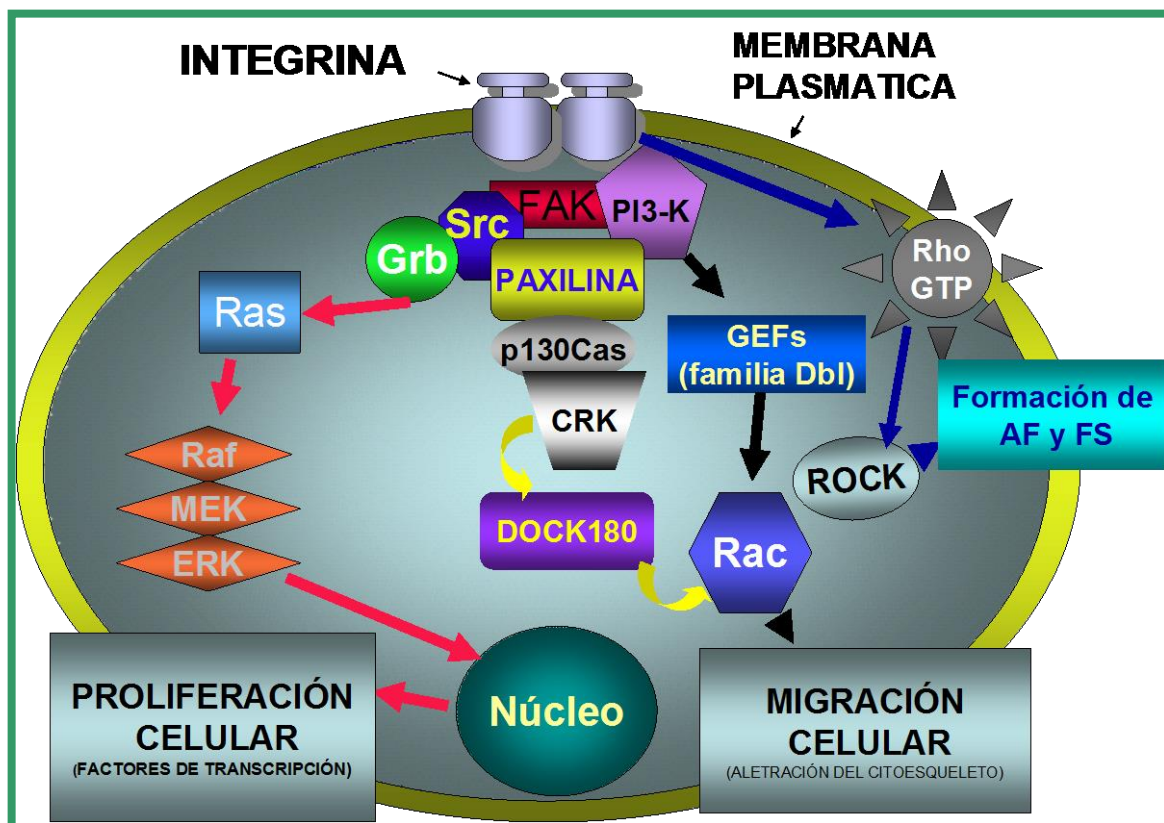


Figura 4: Vías de señalización celular gatilladas en respuesta a la activación de las Integrinas por su ligando. Se ha demostrado que cuando las Integrinas se unen a sus ligandos se activa la vía de las MAP quinasas (Ras/Raf/MEK/Erk) con el consecuente aumento de la proliferación celular. Otra enzima importante activada en respuesta a la activación de Integrinas es la PI3-K. Productos de esta quinasa son capaces de activar la proteína G pequeña (Rac) con el consecuente aumento en la migración celular. Por otro lado se ha demostrado que el complejo formado o FAK/paxilina/p130^{Cas}/Crk también activa Rac a través del GEF DOCK180. La unión de ligando a los receptores integrina también activa la proteína Rho, ésta a su efector ROCK induciendo la formación de adhesiones focales y fibras de estrés. Estas distintas cascadas que emanan de integrinas agregadas por sus ligandos ocurren con una temporalidad y localización diferente.

2.6 Migración celular.

La migración celular es un proceso altamente dinámico, fundamental en la embriogénesis así como también en la reparación y regeneración de tejidos. Este proceso, está altamente regulado a nivel molecular y ,operacionalmente, se puede dividir en cinco grandes pasos: 1) Polarización celular, 2) Extensión de filopodios y formación de lamelipodios, 3) Formación de nuevas adhesiones, 4) Contracción celular y 5) Desensamblaje y despegue de la cola (Figura 5).

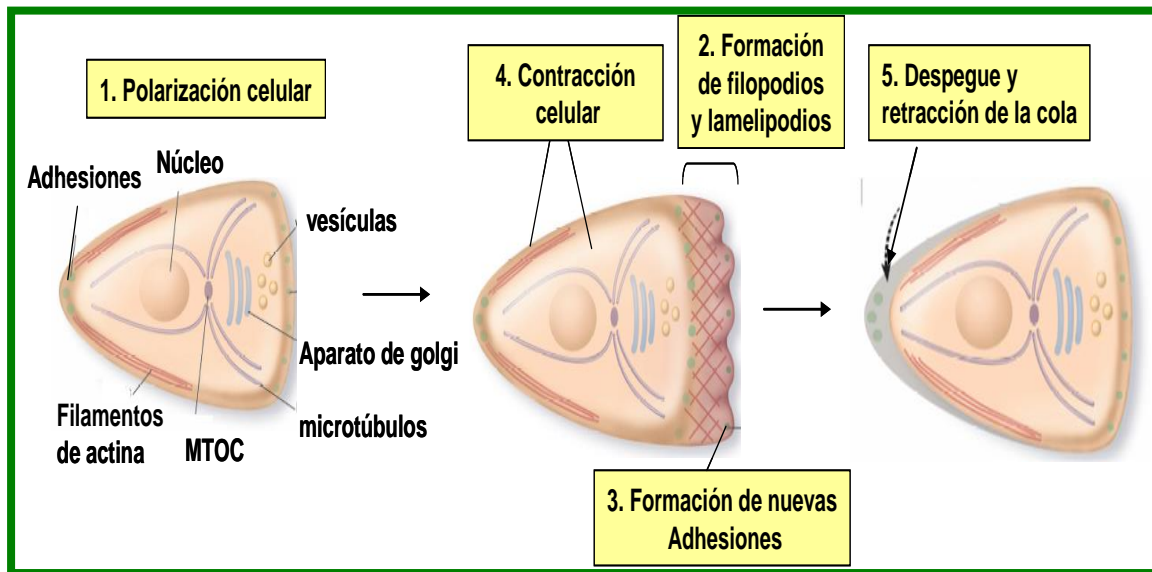


Figura 5: Etapas de la migración celular: Las células se polarizan (1) extendiendo filopodios y lamelipodios (2) en el frente de avance de éstas. Las extensiones son estabilizadas a través de la formación de nuevas adhesiones (3) a la matriz extracelular. La contracción es mediada por la actinmiosina, la cual mueve el cuerpo celular hacia adelante. Finalmente, se produce el despegue de la parte posterior de la célula de su sustrato y posteriormente se produce su retracción. MTOC corresponde al Centro organizador de microtúbulos que se ubica entre el núcleo y el frente de avance de la célula en migración (Adaptado de Etienne-Manneville y Hall, 2002).

2.6.1 Polarización celular

La migración celular es normalmente dirigida y controlada por señales extracelulares. En cultivos celulares, muchas células adoptan una morfología polarizada, en la cual se logra distinguir un frente de avance y una cola. Durante el proceso de migración celular el citoesqueleto de microtúbulos está altamente polarizado y se caracteriza por la acumulación de vesículas y microtúbulos en el frente de avance de la célula. A su vez, se ve un aumento en el crecimiento de los microtúbulos también en el frente de la célula y, finalmente, una reorientación del Centro organizador de Microtúbulos (MTOC) y el Aparato de Golgi, los cuales se localizan entre el núcleo y el frente de avance de la célula (Etienne-Manneville y Hall, 2002).

2.6.2 Extensión de filopodios y formación de Lamelipodios.

Los filopodios son pequeñas extensiones de la célula en el frente de avance de ésta. La disposición de los filamentos de actina en los filopodios es en forma de haces paralelos y la fimbrina es la proteína responsable de mantener la forma de estas extensiones. Los filopodios son estructuras que sirven de sensor para explorar el ambiente local donde la célula se encuentra.

Una vez establecido el frente de avance de una célula, ésta extiende regularmente protuberancias laminares delgadas conocidas como lamelipodios, los que poseen una capa densa de filamentos de actina estructurados en forma de red. Los lamelipodios se comportan como una unidad estructural, si se pierde su adhesión al sustrato normalmente se retraen rápidamente hacia atrás y se enrollan de nuevo sobre la célula como un “rizo” (ruffle) (Alberts *et al.*, 2002).

2.6.3 Formación de nuevas adhesiones.

Los lamelipodios establecen una estrecha unión entre la célula y la MEC a través de los complejos focales, los que a su vez establecen un enlace estructural con el citoesqueleto de actina. Una vez formados, éstos “maduran” y forman estructuras más grandes y complejas llamadas adhesiones focales. Las adhesiones focales sirven de puntos de tracción para el movimiento celular y para poder transmitir la fuerza de propulsión. Estas estructuras contienen proteínas como talina, vinculina y α -actinina, moléculas adaptadoras como paxilina, tensina y p130^{Cas}, tirosina quinasas no receptoras como FAK (Quinasa de Adhesiones Focales) y quinasas de la familia Src y en su conjunto representan sitios intracelulares donde hay altos niveles de fosforilación en residuos de tirosina.

Dentro de las proteínas que son más fosforiladas en residuos de tirosina están FAK, paxilina y p130^{Cas}. El principal sitio de fosforilación de FAK es la tirosina 397, esta fosforilación es de tipo sostenida en células adherentes y se ha reportado que esta fosforilación de FAK es capaz de unir y activar a c-Src y PI3-K (Schaller *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996). Esta cascada de eventos moleculares es esencial puesto que la actividad de PI3-K y sus productos lipídicos han sido ampliamente implicados en el control de polaridad y migración celular (Stephens *et al.*, 2002). La producción de fosfatidilinositol trisfosfato [PI (3,4,5) P3] por parte de esta enzima lleva a la activación de Factores Intercambiadores de nucleótidos de Guanina (GEFs) como son DOCK180, VAV2, TIAM-1 y PIX, los cuales permiten la activación de la proteína G pequeña Rac en muchos tipos celulares. (Cheresh *et al.*, 1999; Yoshii *et al.*, 1999; Marignani y Carpenter, 2001; Hamelers *et al.*, 2005) (Figuras 4 y 6).

2.6.4 Contracción Celular.

La contracción celular es dependiente de la actina asociada a miosina (Mitchison y Cramer, 1996). En muchos casos se cree que la fuerza para la locomoción celular se genera cerca del extremo anterior de la célula y que el núcleo y el citoplasma son arrastrados pasivamente en este movimiento (Alberts *et al.*, 2002).

El aumento en la contractibilidad se produce por el agrupamiento de los filamentos de actina que generan las fibras de estrés (Burrige *et al.*, 1997). Las adhesiones focales cumplen una función estructural importante al conectar los extremos de las fibras de estrés con la MEC a través de las Integrinas. Apparentemente, esta conexión proporciona la tracción que se requiere para la migración (Huttenlocher *et al.*, 1995), lo que explica la importancia de las adhesiones focales para los procesos de motilidad y expansión celular (Burrige y Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Rho a través de su efector Rho quinasa (ROCK),

induce la fosforilación de la cadena liviana de miosina (MLC), para posteriormente inducir contractibilidad celular. Estos antecedentes no explican completamente los efectos de Rho sobre el citoesqueleto de actina y existen otros blancos de Rho que también cumplen una función importante en la formación de las fibras de estrés (Ridley, 1999). La importancia de cada blanco de Rho probablemente difiere dependiendo de las condiciones y del tipo celular (Ridley, 2001b).

2.6.5 Desensamblaje y desprendimiento de la cola.

Este es considerado el último paso de la migración celular. Los mecanismos regulatorios del desprendimiento de la cola dependen tanto del tipo celular como de qué tan fuerte es la adhesión celular a la MEC (Ridley, 2001b). Este proceso se lleva cabo, principalmente, a través de diferentes proteasas, las cuales degradan algunas de las proteínas que forman parte de las adhesiones focales.

2.7 Papel de las Rho GTPasas en la migración celular.

Todos y cada uno de los pasos implicados en la migración celular dependen de la activación de proteínas G pequeñas de la familia Rho. Existen alrededor de 20 familias de proteínas Rho GTPasas que se han identificado en humanos y, de éstas, las que más se han estudiado son Rho A/B, Rac 1/2 y Cdc42 (Ridley, 2001a). Las Rho GTPasas juegan un papel primordial en la migración y proliferación celular, debido a que están implicadas en los cambios que sufren los microfilamentos y microtúbulos en el interior de la célula, los cuales están determinados por la polimerización y despolimerización de actina y tubulina, respectivamente.

Las proteínas Rho ciclan entre un estado activo unido a GTP y uno inactivo unido a GDP. Estas proteínas pueden intercambiar el nucleótido GDP por GTP,

mediante factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), y pueden inactivarse al hidrolizar GTP mediante su actividad intrínseca de GTPasa, la cual es facilitada por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) (Ridley, 2001a y b). Además, los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), secuestran el tallo prenilado de las proteínas Rho, inactivándolas e impidiendo su anclaje a la membrana. Las proteínas Rho activadas (Rho-GTP), son capaces de unir de manera específica a distintos efectores, y así activar vías de señalización importantes en procesos de migración, polarización y proliferación, entre otros (Figura 6) (Burrige, 2005).

Las Rho GTPasas, son activadas en respuesta a señales extracelulares que incluyen citoquinas, factores de crecimiento y proteínas de MEC. Experimentos de videomicroscopía muestran que cuando Rac es inhibida, la célula no puede migrar (Albert *et al.*, 2002). Una vez activadas, cada una de las Rho GTPasas tiene un determinado rol en el proceso de migración celular. Por ejemplo, la proteína Cdc42, está implicada en la formación de filopodios y en el proceso de polarización celular al coordinar la polimerización de los filamentos de actina en su extremo (+) a través de una variada cascada de reacciones. Por otro lado, Rac es la principal proteína G pequeña encargada de la formación de los lamelipodios en la célula que está migrando.

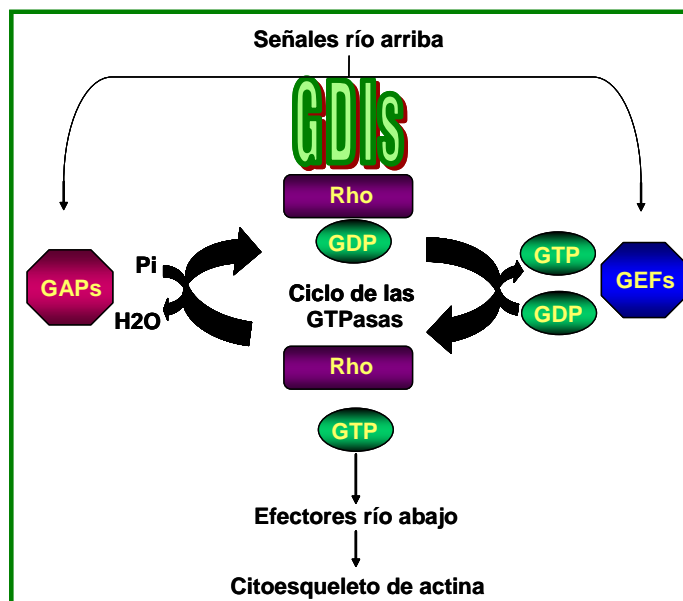


Figura 6. Ciclo de activación de las GTPasas de la familia Rho. Las Rho GTPasas ciclan entre su forma activa (unida a GTP) y su forma inactiva (unida a GDP). En su forma activa interactúan con diversas proteínas blanco (efectores). Este ciclo está altamente regulado por tres tipos de proteínas: i) los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), ii) las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs) y iii) los inhibidores del intercambio de nucleótidos de guanina (GDIs). Ver texto para mayor detalle (Adaptado de Etienne-Manneville y Hall, 2002).

Primero, Rac estimula la nucleación de actina globular activando el complejo Arp2/3, el que inicia la formación de nuevos filamentos de actina (secundarios), a partir de filamentos de actina ya existentes (primarios), en un ángulo de 70 grados, formando una red de filamentos que constituyen el frente de avance de la célula en migración (Ridley *et al.*, 1992 y Pollard *et al.*, 2000). En el proceso de contracción celular, la principal proteína G pequeña implicada es RhoA, la que actúa mediante su efector ROCK afectando la fosforilación de la cadena liviana de miosina (MLC), e inhibiendo la MLC fosfatasa. La fosforilación de MLC también está regulada por MLC quinasa, que es activada por calcio y estimulada por quinasas reguladas por señales extracelulares (Erk, de *Extracellular Signal Regulated Kinases*), o también denominadas como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, de *Mitogen Activated Protein Kinases*). También Rho ha sido implicada en la formación de adhesiones focales y fibras de estrés en el frente de avance de la célula y en el proceso de desensamblaje y despegue de

la célula, a través de la acción de una enzima llamada Calpaína, una proteasa que degrada componentes de las adhesiones focales en la parte posterior de la célula en avance.

2.8 Función de la vía Erk en la proliferación celular.

Al activarse las Integrinas, FAK se autofosforila en Tyr397 generando un sitio de unión para las quinasas Src y Fyn. Estas quinasas son capaces de fosforilar a FAK en otras tirosinas formando nuevos sitios de unión para proteínas adaptadoras como Grb2. Sos es capaz de unirse a Grb2 y a través de su actividad de GEF para la proteína G pequeña Ras es capaz de activar Ras y la vía Raf/MEK/Erk implicada en proliferación celular (Schlaepfer *et al.*, 1994). La activación de esta vía de señalización permite la fosforilación de otras proteínas quinasas, componentes del citoesqueleto y una variada gama de factores de transcripción. A menudo, sólo minutos después de que la célula ha sido estimulada por un factor de crecimiento, se activa la transcripción de un conjunto de genes tempranos, como ciclinas, que participarán en el control del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2002). Alguno de los factores de transcripción activados por la ruta Erk son los de la familia AP-1, estos consisten en homo y heterodímeros de proteínas que pertenecen a las subfamilias Jun (c Jun, Jun B y Jun D) y Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 y Fra-2) (Angel y Karin, 1991). Erk fosforila las subunidades de AP-1, promoviendo la estabilidad del dímero y facilitando su unión a secuencias específicas en los promotores de genes implicados en la proliferación. Respecto a esto, Fos ha sido descrito como un sensor de la activación de Erk y la respuesta celular gatillada es proporcional a la activación de Erk.

2.9 Resultados previos en el laboratorio.

Se ha demostrado que la Integrina $\alpha_v\beta_3$ presente en la membrana de los astrocitos interactúa directamente con Thy-1 para inducir un cambio en la

morfología de los astrocitos (Leyton *et al.*, 2001; Hermosilla *et al.*, 2007). Al estimular astrocitos con la proteína de fusión Thy-1-Fc unida a Proteína-A-Sefarosa se produce la agregación y activación de las Integrinas en astrocitos, el ensamblaje de adhesiones focales y la formación de fibras de estrés, así como también, una mayor adhesión de la célula y la extensión de ésta sobre su substrato (spreading). Dicha interacción gatilla cambios moleculares, tales como un mayor grado de fosforilación en tirosinas de las proteínas implicadas en la formación de adhesiones focales, p130^{Cas} y FAK. También se reclutan proteínas como paxilina, vinculina y FAK a los sitios donde se forman las adhesiones focales (Leyton *et al.*, 2001). Estos cambios se observan también cuando se realiza la estimulación con la línea celular CAD derivada de neuronas catecolaminérgicas que expresan altos niveles de Thy-1 en su superficie y es inhibida por la incubación previa de las células con anticuerpos anti- Integrina α_V , anti-Integrina β_3 o anti-Thy-1, indicando la participación de la Integrina $\alpha_V\beta_3$ y Thy-1 en la comunicación entre neuronas y astrocitos (Hermosilla *et al.*, 2007).

Adicionalmente, utilizando la técnica de “Resonancia plasmática superficial” (SPR) se ha demostrado la interacción directa entre las proteínas recombinantes $\alpha_V\beta_3$ -Fc y Thy-1(RLD)-Fc, lo que no ocurre con la proteína mutante Thy-1 (RLE)-Fc. Esta última tampoco induce la formación de adhesiones focales y fibras de estrés, destacando la importancia del tripéptido RLD en las respuestas inducidas por Thy-1 en astrocitos (Leyton *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que la proteína G pequeña RhoA y su efector ROCK se activan a consecuencia de la interacción Thy-1 con la Integrina en astrocitos, induciendo cambios en el citoesqueleto de actina y una mayor adhesión celular (Avalos *et al.*, 2002 y 2004).

3. HIPÓTESIS

La interacción entre la glicoproteína Thy-1 de la membrana neuronal con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ del astrosito, gatilla cambios morfológicos en estos últimos que llevaría a estas células a la migración y/o proliferación vía activación de PI3-quinasa y Erk, respectivamente.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1. Demostrar si la interacción de Thy-1 con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ estimula la migración de los astrocitos.

4.2. Demostrar si la interacción de Thy-1 con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ estimula la proliferación de los astrocitos.

4.3. Determinar si la enzima PI3-K está implicada en la migración de los astrocitos inducida por Thy-1.

4.1. Demostrar si la enzima Erk está implicada en la proliferación de los astrocitos inducida por Thy-1.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Células y medios de cultivo.

En esta tesis se utilizó la línea celular DI-TNC1 de astrocitos de rata, que presenta varias características típicas de los astrocitos neonatos, como por ejemplo, la expresión de moléculas de adhesión (Rahemtulla *et al*, 1994). Esta línea celular se obtuvo mediante transfección de astrocitos primarios de diencéfalo de rata con un constructo de DNA que contiene la región temprana oncogénica del virus 40 de simio (SV40), bajo el control transcripcional del promotor humano de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Esta línea celular se encuentra disponible en la colección americana de líneas celulares (ATCC) con el número CRL-2005 (Rahemtulla *et al*, 1994).

Los astrocitos DI-TNC1 se mantuvieron en medio RPMI completo, compuesto por medio RPMI 1640, 5% de suero fetal de bovino (SFB), 0,1 mM 2-β-mercaptoetanol y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 µg/ml). Las células se mantuvieron a 37° C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

Para el pasaje de las células, éstas se lavaron dos veces en la placa con tampón fosfato salino (PBS) y luego se les agregó tripsina /EDTA 0,25% (500 µl/placa de 10 cm), incubándolas posteriormente a 37° C durante aproximadamente 5 min. Luego se agregó medio fresco, se resuspendieron las células con pipeta de vidrio estéril y se diluyeron con medio fresco de acuerdo a la cantidad requerida para cada experimento. Las células se contaron utilizando el reactivo azul de Tripán en una cámara de Neubauer.

5.2 Reactivos y materiales.

Se clasificaron de acuerdo a la marca, con su respectivo número de catálogo.

- AGFA: Revelador radiográfico (G-150), fijador (G-334).
- Bio-rad: Estándar preteñido de proteínas de bajo (161-0305) y alto (161-0373) peso molecular, solución acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 40% (161-0156).
- Calbiochem: Antipaína (178220), benzamidina (199001), leupeptina (108975), mowiol (475904), PMSF (52332).
- Chemicon International: Sistema de detección quimioluminiscente ECL (2600).
- Falcon: Placas de cultivo de 10 cm, tubos de 15 y 50 mL y placas de cultivo de 24 y 96 pocillos.
- Fluka: Azul de bromofenol (18030), azul de Coomasie (27816), cloruro de calcio (21101), cloruro de magnesio (63072), cloruro de potasio (60129), EDTA (3609), EGTA (3780), glicerol 87% (49782), hidróxido de potasio (60369), hidróxido de sodio (71691), isobutanol (58450), SDS (71729).
- GIBCO: 2-β-mercaptoetanol para cultivo celular (21985-023), medio RPMI 1640 (23400-021), PBS 10X para cultivo celular (70013-073), penicilina-estreptomicina (15140-1229), tripsina-EDTA (25200-056).
- Hyclone: Suero fetal de bovino caracterizado (16777-014).
- Kodak: Películas autoradiográficas BioMax MR (1314219).
- Merck: Metanol para análisis (1.06009.2500), Temed (1.10732.0100), Tritón X-100 (1.08603.1000).
- Perkin-Elmer: Nitrocelulosa Protran (NBA085C).
- Promega: CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (G5421).
- Riedel de Haen: Azul de Tripán (32700).
- Scharlau: Cloruro de sodio (SO0227); Na₂HPO₄ (SO0337).
- Sigma: Azida de sodio (S8032), BSA (A2153), bicarbonato de sodio (S7795), dimetilsulfóxido para cultivo celular (D2438), DABCO (D2522),

faloidina conjugada a rodamina (P1951), gelatina (G7765), glicina (G7126), ortovanadato de sodio (O6508), paraformaldehido (P6148), PIPES (P1851), rojo Ponceau (P3504), Tris-HCl (T3253), Tween 20 (P1379).

- TCL: Metanol y etanol, grado técnico.
- US Biological: Dimetilsulfóxido (D8050).
- Winkler: Persulfato de amonio (BM-0250), 2- β -mercaptoetanol (BM-1200), isopropanol para análisis (BM-0210).

5.3 Equipamiento.

Incubador de CO₂ para cultivo celular (SHEL LAB Modelo TC2323), cámara de flujo laminar para cultivo celular (FACTO MET), micro-centrífuga (SANYO modelo Micro Centaur MSB010.CX2), centrifugas (SANYO Modelo Centaur 2 MSB020.CX1.5) y Eppendorf (Modelo 5415R), lector de ELISA (Bio-Rad modelo 3550), medidor de pH (Hanna Iris modelo HI8417) y microscopio invertido (Fisher modelo XDS-1B). Los ensayos de Inmunofluorescencia indirecta se visualizaron utilizando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM-410 Axiovert-100 de la UACI-ICBM o el microscopio confocal Carl Zeiss LSM-Pascal 5 del CEMC perteneciente a FONDAP. Los ensayos de medición del ciclo proliferativo celular se realizaron utilizando el citómetro FACSCanto BD perteneciente al CEMC de FONDAP. Los ensayos de migración se visualizaron usando el microscopio Axiovert-135 (Zeiss) de la UACI-ICBM.

5.4 Anticuerpos.

Primarios: Anticuerpos monoclonales anti-paxilina (610620, Transduction Laboratories). Anticuerpos policlonales anti-Akt (9271, Cell Signaling), anti-p-Akt Ser 473 (9272, Cell Signaling) y anti - β -actina (Sigma A5060).

Secundarios: Anti-IgG de conejo-HRPO (170-6515), Biorad; anti-IgG de ratón-FITC (115-095-062) y anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 488 (A-11029), Molecular Probes.

5.5 Formación del complejo proteína de fusión con Proteína-A.

Para estimular los astrocitos se preparó una mezcla del complejo Thy-1-Fc o Trail-R2-Fc (Control), unido a Proteína-A soluble. Las concentraciones stock de las proteínas de fusión y de Proteína-A son de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y están almacenados a una T° de -20°C . Las proteínas de fusión y la Proteína-A se mezclaron en una proporción de 10:1, respectivamente. La mezcla se incubó por 30 min a 4°C , con agitación cada 10 min. Posteriormente, para probar la concentración óptima se ensayó distintas concentraciones de la mezcla mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, en la que se observó cuál era la que inducía una mayor formación de adhesiones focales. Las concentraciones del complejo Thy-1-Fc/Proteína-A que se utilizaron en estos ensayos fueron de 2 $\mu\text{g}/0,2\ \mu\text{g}$; 4 $\mu\text{g}/0,4\ \mu\text{g}$; 8 $\mu\text{g}/0,8\ \mu\text{g}$ y 12 $\mu\text{g}/1,2\ \mu\text{g}$, respectivamente. La concentración del complejo utilizado fue calculada proporcionalmente al área de cada placa de cultivo utilizada.

5.6 Ensayo de migración por herida.

Se sembraron alrededor de 100.000 astrocitos de rata DI-TNC1 por pocillo en placas de 24 pocillos con 500 μl de medio RPMI completo y se incubaron por 24 hrs. Cuando los astrocitos llegaban a una confluencia de 80% (200.000 células/ pocillo) se hizo la herida en cada pocillo con la punta de una pipeta amarilla no biselada apoyándose con una regla previamente desinfectada para que la herida fuera recta. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS, suavemente para que las células no se despegaran y la herida quedara intacta. Posterior a los lavados, se retiró el PBS y se agregó 500 μl de medio RPMI sin suero. Se sacaron

alrededor de 5 fotografías de cada herida para registrar el tiempo 0 de los distintos pocillos en el microscopio Axiovert 135 con objetivo 5X. Los astrocitos luego fueron estimulados con los complejos Thy-1-Fc/Proteína-A (4 μ g / 0,4 μ g) en 500 μ l de medio RPMI sin suero. Como controles negativos se utilizaron Trail-R2-Fc/Proteína-A (4 μ g / 0,4 μ g) en 500 μ l de medio RPMI sin suero, RPMI sin suero (500 μ l por pocillo), mientras que RPMI con 3% suero se usó como control positivo (500 μ l por pocillo). Luego de la estimulación, se sacaron fotografías a las heridas a distintos tiempos como por ejemplo 16, 19, y 24 hrs, El área promedio de cada herida se estimó usando el programa Image J/Plugins/Area calculator, tomando 5 fotografías por pocillo.

En los ensayos en que se utilizaron inhibidores específicos de la enzima PI3-K, éstos se agregaron junto con el medio RPMI sin suero a concentraciones de 3 ó 5 μ M de LY294002 y 2 ó 4 nM de Wortmanina (Figura 7). Estos inhibidores se agregaron después de hacer la herida y de lavar cada pocillo 2 veces con PBS, por lo que su efecto fue por alrededor de 30 min antes de hacer las distintas estimulaciones. Los inhibidores se mantuvieron todo el tiempo en que las células fueron estimuladas y fotografiadas. Alternativamente, para estudiar la formación de estructuras de avance de las células, éstas fueron sembradas en cubreobjetos y, luego de realizar las heridas, fueron fijadas a los 15, 30 y 60 min post estimulación y tratadas para Inmunofluorescencia indirecta como se indica más adelante.

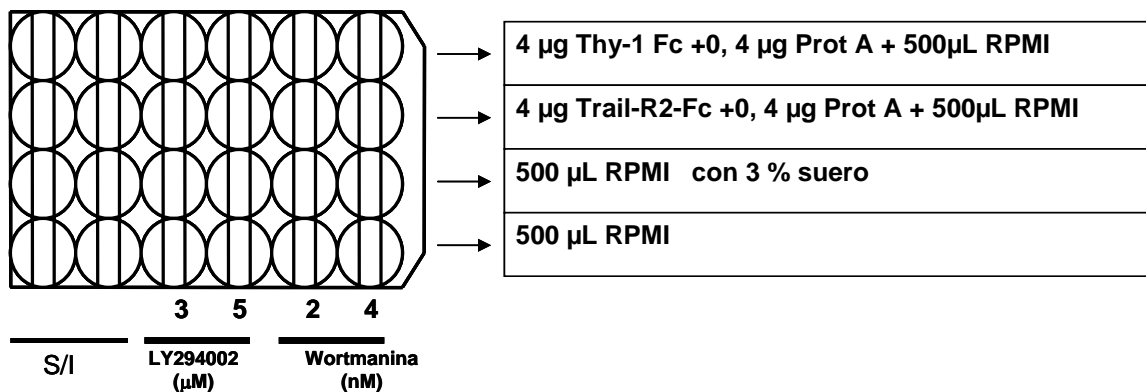


Figura 7: Ensayo de estimulación de astrocitos en presencia de inhibidores de la enzima PI3-K. Se muestra un esquema de una placa de 24 pocillos donde en las columnas se detallan las distintas concentraciones de los inhibidores utilizados y los pocillos controles (Sin Inhibidores, S/I). En las filas se detallan los distintos estímulos ensayados.

5.7 Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta.

Después de la estimulación de los astrocitos, se removi6 el medio con estimuladores y se realiz6 2 lavados suaves con PBS. Las c6lulas se fijaron durante 20 min con una soluci6n de paraformaldehido al 4%, KOH 0,04 M, y soluci6n tamp6n PIPES 100 mM, EGTA 2 mM y MgCl₂ 2 mM, pH 6,8. Posteriormente, se lavaron tres veces con una soluci6n tamp6n Tris-HCl 150 mM pH 7,5 para remover los restos de paraformaldehido y dos veces con PBS. Las c6lulas se permeabilizaron durante 10 min con una soluci6n de Trit6n X-100 0,1% en PBS. Luego se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon durante 30 min con alb6mina de suero de bovino (BSA) 2% en PBS. Los cubreobjetos se incubaron invertidos sobre gotas conteniendo el anticuerpo anti-paxilina (1/200, en soluci6n de bloqueo) durante 1 hr a 37° C en atm6sfera h6meda. Las c6lulas se lavaron cuatro veces con PBS (5 min cada lavado) y luego se incubaron durante 1 hr con anticuerpos secundarios acoplados a FITC o Alexa Fluor 488 (1/200), en soluci6n de bloqueo, junto con faloidina conjugada a rodamina (1/1.000), 6sta 6ltima para detectar actina polimerizada. Las c6lulas se lavaron nuevamente con PBS (de la misma manera que para el anticuerpo primario) y luego una vez con agua nanopura para eliminar el exceso de sales. Finalmente, se montaron los cubreobjetos en portaobjetos con 6 μl de una soluci6n de Mowiol-DABCO (Mowiol

10%, glicerol 25%, DABCO 25 mg/ml, en Tris-HCl 100 mM pH 8,5). Las proteínas marcadas se visualizaron mediante microscopía confocal y para su representación en tres dimensiones se grabaron imágenes de secciones ópticas seriadas en eje z y se reconstituyeron las imágenes usando el software Imaris (Bitplane, Zuerich, Suiza).

5.8 Cuantificación de las adhesiones focales.

El número de adhesiones focales por célula se cuantificó con el programa ImageJ de dominio público en el NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se utilizó la función “analizar partículas” y el número de adhesiones focales se estimó seleccionando estructuras dentro de un rango determinado de píxeles que estuviesen por sobre un valor umbral determinado para discriminar entre el fondo y las adhesiones focales.

5.9 Ensayo de viabilidad celular.

Se utilizó un ensayo no radioactivo Cell Titer[®] Aqueous (Promega) que consiste en un método colorimétrico para determinar el número de células viables con actividad metabólica. Este ensayo consiste en dos soluciones MTS y PMS, la primera de las cuales es bio-reducida por las mitocondrias de la célula a un compuesto llamado formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo. El formazán es un indicador colorimétrico de color rojo y la intensidad de éste puede ser medida en un lector de microplaca a una absorbancia de 490 nm. La cuantificación de la producción de formazán es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo y, por lo tanto, a mayor producción de formazán mayor cantidad de células viables lo que indica el nivel de proliferación determinado a la respectiva condición experimental.

Para realizar este ensayo se sembraron alrededor de 3.000 astrocitos DI-TNC1 por pocillo en placas de 96 pocillos en 100 μ l de medio RPMI sin suero los cuales se dejaron incubando por 24 hrs a 37° C. Luego se removió el medio, se lavó con PBS una vez y se agregó nuevamente RPMI sin suero. Los astrocitos se estimularon con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A (1 μ g / 0,1 μ g) en 100 μ l de medio RPMI sin suero. Como controles negativos se utilizaron Trail-R2-Fc/Proteína-A (1 μ g / 0,1 μ g) en 100 μ l de medio RPMI sin suero y RPMI sin suero (100 μ l por pocillo), mientras que como control positivo se utilizó medio RPMI 3% suero (100 μ l por pocillo) durante 16, 24 y 48 hrs. Inmediatamente después de terminada la estimulación, se agregó 20 μ l de una mezcla 20:1 de MTS:PMS a cada pocillo, luego se incubó la placa en una estufa de cultivo a 37° C, 70% de humedad y una concentración de 5% de CO₂ durante 2 a 4 hrs. La reacción se visualizó en un lector de microplaca a una absorbancia de 490 nm. Dado que las células estimuladas con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A están adheridas a una superficie con un área determinada, la estimación de la cantidad de estímulo a utilizar se calculó de acuerdo al área de la placa.

5.10 Medición del ciclo proliferativo de astrocitos mediante citometría de flujo.

Se sembraron alrededor de 50.000 astrocitos DI-TNC1 por pocillo en placas de 24 pocillos con 500 μ l de medio RPMI solo y se incubaron por 24 hrs. Luego, la estimulación de los astrocitos se realizó con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A (4 μ g / 0,4 μ g) en 500 μ l de medio RPMI sin suero y como controles negativos se utilizaron Trail-R2-Fc/Proteína-A (4 μ g / 0,4 μ g) en 500 μ l de medio RPMI sin suero y RPMI sin suero (500 μ l por pocillo) mientras que como control positivo se utilizó medio RPMI con 3% suero (500 μ l por pocillo). El tiempo de estimulación fue de 24 hrs. Luego de la estimulación, se lavó 3 veces cada pocillo con PBS (500 μ l por pocillo), para luego agregar 120 μ l de Tripsina/EDTA 0,25% por pocillo y las

células se mantuvieron durante 5 min en incubadora a 37° C y, finalmente, para neutralizar la acción de la tripsina se agregó 500 µl de medio RPMI completo. Las células se traspasaron a tubos eppendorf de 1,5 ml y se centrifugaron a 3.000 rpm por 7 min. Terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y las células precipitadas fueron permeabilizadas durante 10 min a -20° C, utilizando 190 µl de metanol para análisis previamente frío enfriado (-20° C). Luego los tubos se centrifugaron a 3.000 rpm por 7 min a 4° C, terminada la centrifugación los sobrenadantes fueron eliminados y el precipitado celular fue resuspendido en PBS de citómetro junto con RNAasa (100 µg/ml) utilizando una jeringa de insulina. Finalmente, las células se traspasaron a tubos de citómetro donde se les agregó un compuesto capaz de intercalarse en la hebra de ADN denominado yoduro de propidio (10 µg/ml). El yoduro de propidio posee un peak de excitación de 550 nm y un peak de emisión a 620 nm, el cual puede ser detectado en un Citómetro de flujo FACSCanto BD. La fluorescencia detectada nos entrega una estimación de la cantidad de ADN de las células. Se utilizó el programa computacional WinMDI para realizar los distintos análisis.

5.11 Ensayo de proliferación de astrocitos por azul de tripán.

Se sembraron alrededor de 3.000 astrocitos DI-TNC1 por pocillo en placas de 96 pocillos junto con 100 µl de medio RPMI sin suero y se dejó incubando por 24 hrs para que las células se adhieran a la placa. Al día siguiente se estimularon las células con los complejos Thy-1-Fc/Proteína-A (1 µg / 0,1 µg) en 100 µl de medio RPMI sin suero y como controles negativos se utilizaron Trail-R2-Fc/Proteína-A (1 µg / 0,1 µg) en 100 µl de medio RPMI sin suero y RPMI sin suero (100 µl por pocillo) mientras que como control positivo se utilizó y RPMI con 3% suero (100 µl por pocillo). Luego de la estimulación las células se soltaron incubándolas con 50 µl de tripsina /EDTA 0.25% por pocillo durante 3 min a 37° C. Para neutralizar la tripsina se agregó 150 µl de medio RPMI completo. Las células se traspasaron a tubos eppendorf de 1,5 ml los cuales se centrifugaron a

1000 rpm por 5 min. Posteriormente se eliminó 190 μl del sobrenadante, dejando el precipitado celular en 10 μl de medio, al cual se le agregó 10 μl de azul de tripán y se mezcló para homogeneizar. De esta mezcla se sacaron 10 μl y se pusieron en la cámara de Neubauer para contar el número de células vivas totales por pocillo mediante microscopia de luz con un aumento de 10X.

5.12 Extracción de muestras para Western blot.

Se sembraron alrededor de 100.000 astrocitos DI-TNC1 por pocillo en placas de 24 pocillos junto a 500 μl de medio RPMI completo durante 24 hrs. Pasado este tiempo se reemplazó el medio por uno sin suero. Los astrocitos se estimularon con los complejos Thy-1-Fc/Proteína-A (4 μg / 0,4 μg) en 500 μl de medio RPMI sin suero luego de una deprivación de 30 min. Como controles negativos se utilizaron Trail-R2-Fc/Proteína-A (4 μg / 0,4 μg) en 500 μl de medio RPMI sin suero y RPMI sin suero (500 μl por pocillo), mientras que como control positivo se utilizó RPMI 3% suero (500 μl por pocillo). Los tiempos de estimulación fueron de 1 hr, 45, 30, 20, 10 min y tiempo 0 (Figura 8).

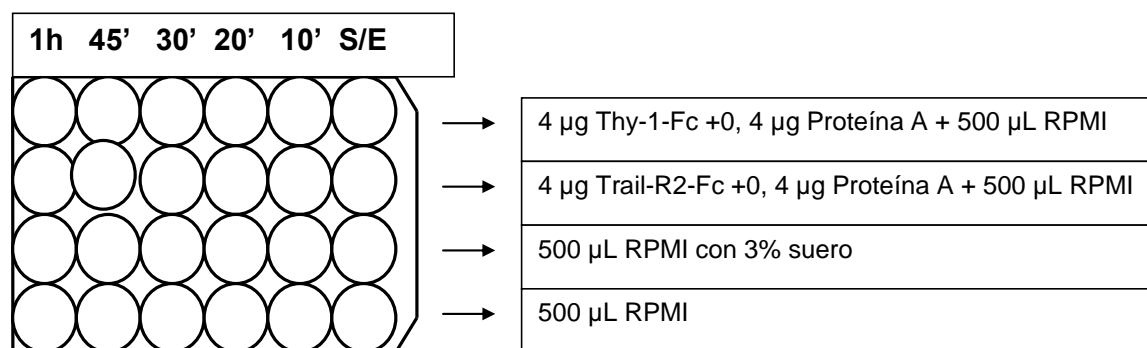


Figura 8: Esquema de estimulación de astrocitos para la obtención de extracto celular. Se muestra un esquema de una placa de 24 pocillos donde en las columnas se detallan los distintos tiempos de estimulación utilizados. En las filas se detallan los distintos estímulos ensayados.

Pasado el tiempo de estimulación con la placa sobre hielo se retiró el medio y se lavó con PBS frío (500 μ l por pocillo). Para preparar el extracto se agregó 50 μ L por pocillo de tampón de lisis Laemmli (SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl (pH 6,8) 62,5 mM, DTT 100 mM y azul de bromofenol 0,01%) para SDS-PAGE conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas y con la misma punta las células se homogenizaron en la solución, la cual se recuperó en un tubo eppendorf. Los inhibidores de proteasas y de fosfatasas que contiene el tampón de lisis son: Benzamidina (10 μ g/ml) Antipaína (2 μ g/ml), Leupeptina (1 μ g/ml), PMSF (1 mM), Na_3VO_4 (1 mM) y Caliculina-A (50 μ g/ml). Luego de obtener el extracto, este se hierve por 5 min y se analizaron por Western blot.

5.13 SDS-PAGE y Western blot.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en minigeles denaturantes de poliacrilamida al 12% durante aproximadamente 2 hrs a 100 V, utilizando el tampón de corrida Tris 25 mM pH 8,3; glicina 0,23 M, SDS al 0,1%. Después de la separación, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 75 min a 110 Volts y 4^o C en tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 0,23 M y metanol al 20%). Posteriormente las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 0,1% en ácido acético 0,5%, para verificar la transferencia de las proteínas a la membrana. A continuación, se lavaron las membranas con PBS y se bloquearon durante 1 hr a T^o ambiente con gelatina al 5%, en una solución de PBS-Tween 20 al 0,01%. Las membranas se incubaron toda la noche a 4^o C o durante 1 hr a T^o ambiente con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en gelatina 5%/PBS-Tween 0,01%: anti-p-Akt de conejo (1:1.000) y anti-Akt de conejo (1:1.000). Posteriormente, las membranas se lavaron 5 veces con una solución de PBS-Tween 0,01% por 5 min cada vez y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a HRPO (1:2.500 en PBS-Tween 0,01%) durante 1 hr a T^o ambiente. Las membranas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 0,01%, durante 5 min cada

vez, y una vez con PBS durante 5 min. La presencia de HRPO se detectó utilizando un sistema quimioluminiscente EZ-ECL, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, la señal se capturó en una película radiográfica.

5.14 Análisis densitométrico.

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los Western blot se realizó utilizando el programa de digitalización de geles UN-SCAN-IT (Silk Scientific Corporation). Los niveles de proteínas observados por condición ensayada se estandarizaron por la cantidad de actina de la misma muestra y respecto a la condición control (sin estímulo).

5.15 Análisis estadístico

Se muestran los valores promedios de al menos tres experimentos independientes. Para comparar una condición experimental con su control, se utilizó el análisis no-paramétrico de Mann-Whitney y para realizar comparaciones múltiples entre los distintos grupos experimentales se utilizó el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis. Se utilizó el programa computacional GB-STAT School pak, desarrollado por Dynamic Microsystem.Inc (1997) para los distintos análisis estadísticos. Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Objetivo específico 1: **Demostrar que la interacción de Thy-1 con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ estimula la migración de astrocitos.**

Por razones técnicas, el modo de estimulación usado (Leyton *et al.*, 2001, Avalos *et al.*, 2004), no fue útil para los ensayos requeridos en esta tesis. Por lo tanto, la primera parte de este objetivo consistió en estandarizar una forma de estimulación utilizando complejos solubles de Thy-1-Fc/Proteína-A y no unido a esferas de sefarosa como se solía hacer. Se buscó entonces la concentración del complejo Thy-1-Fc/Proteína-A que estimula una mayor formación de adhesiones focales en astrocitos DI-TNC1. Para esto, se probaron 4 concentraciones y se observó la formación de estas estructuras mediante un ensayo de Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo primario dirigido contra una proteína que forma parte de estos complejos denominada paxilina (Fotografía 1).

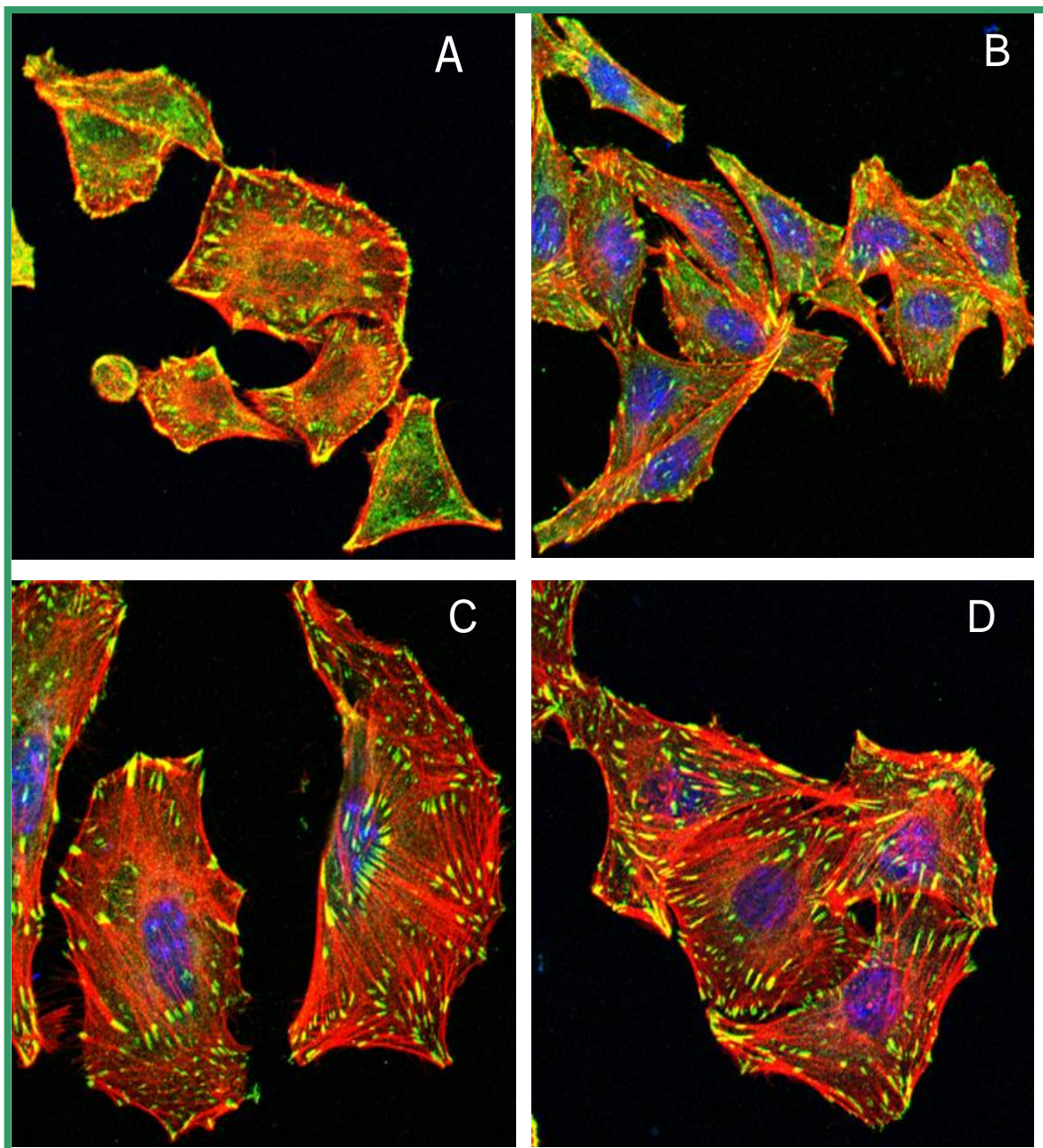
La segunda parte fue estudiar si el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A, estimula la migración de estos astrocitos (Fotografía 2), mediante el ensayo de herida en la monocapa de astrocitos. En paralelo, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia indirecta para ver si el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A era capaz de inducir una mayor formación de estructuras de avance como lamelipodios y filopodios.

6.1.1 Efecto de distintas concentraciones del complejo Thy-1- Fc/Proteína-A en la formación de adhesiones focales y fibras de estrés.

Se demostró que Thy-1-Fc unido a esferas de Proteína-A- Sefarosa inducen la formación de adhesiones focales y fibras de estrés en astrocitos de rata de la línea DI-TNC1. Como para los ensayos de migración por herida se requiere sacar fotografías en el tiempo, este medio de estimulación no sirvió dado que las esferas

de Proteína-A-Sefarosa son alrededor de 10 veces más grandes que las células, por lo que impiden observar y fotografiar las células. Por lo tanto, hubo que probar otro medio de estimulación sin esferas. Para esto, se sembraron astrocitos DI-TNC1 en placas de 24 pocillos y después de un período de privación de suero de 30 min, fueron estimulados con concentraciones crecientes del complejo Thy-1-Fc/Proteína-A durante 30 min. Como control negativo se utilizó astrocitos sin estímulo. Se observó que el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A a una concentración de 4 μg / 0,4 μg , indujo una mayor formación de adhesiones focales y fibras de estrés en estos astrocitos (Fotografía1 y Gráfico 1).

La cuantificación de las adhesiones focales se realizó utilizando el programa ImageJ y como se observa en el gráfico 1, a una concentración de 4 μg de Thy-1-Fc + 0,4 μg de Proteína- A se indujo una mayor formación de adhesiones focales en los astrocitos DI TNC1 comparado con su control negativo sin estímulo. Por lo tanto, esta fue la concentración que se utilizó en los distintos ensayos para esta tesis.



Fotografía 1: Inmunofluorescencia de astrocitos estimulados con distintas concentraciones del complejo Thy-1-Fc/Proteína-A. A) No estimulados B) Astrocitos estimulados con una concentración del complejo de Thy-1 -Fc (2 $\mu\text{g/pocillo}$ en placas de 24 pocillos) unida a Proteína-A (0.2 $\mu\text{g/pocillo}$), C) de Thy-1 -Fc (4 $\mu\text{g/pocillo}$) unida a Proteína-A (0.4 $\mu\text{g/pocillo}$) y D) de Thy-1 -Fc (8 $\mu\text{g/pocillo}$) unida a Proteína-A (0.8 $\mu\text{g/pocillo}$) por 30 min. Luego, las células fueron fijadas y marcadas con un anticuerpo monoclonal anti- paxilina (verde), faloidina conjugada a rodamina (rojo). En algunos casos se incluyó el reactivo SYTOBLUE (Azul) para teñir el núcleo.

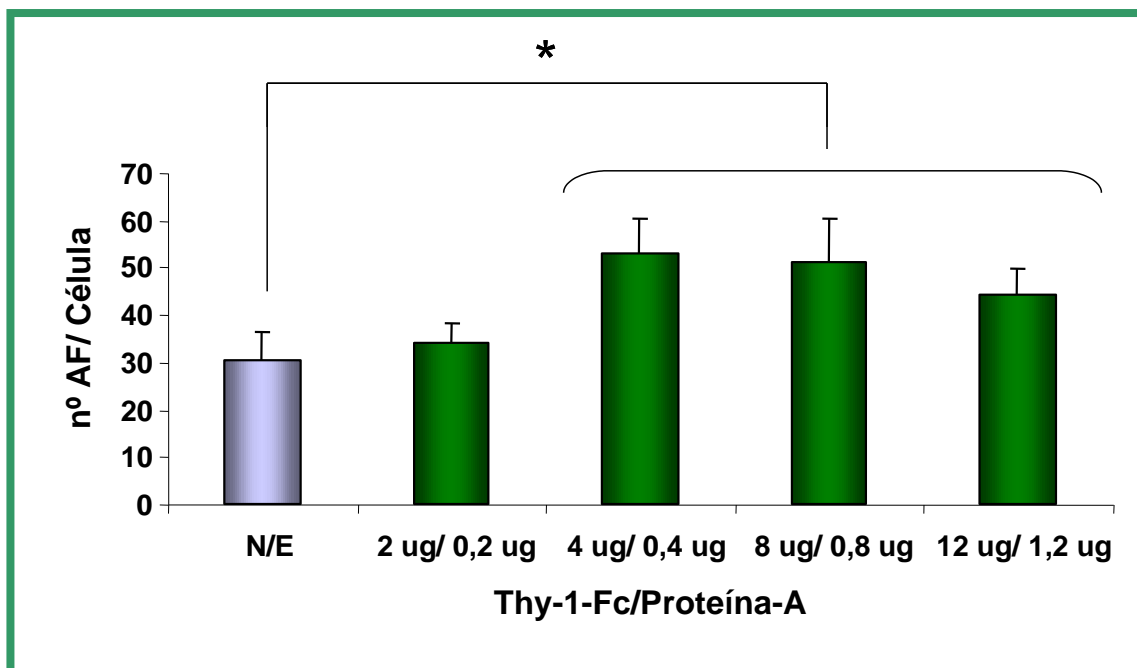


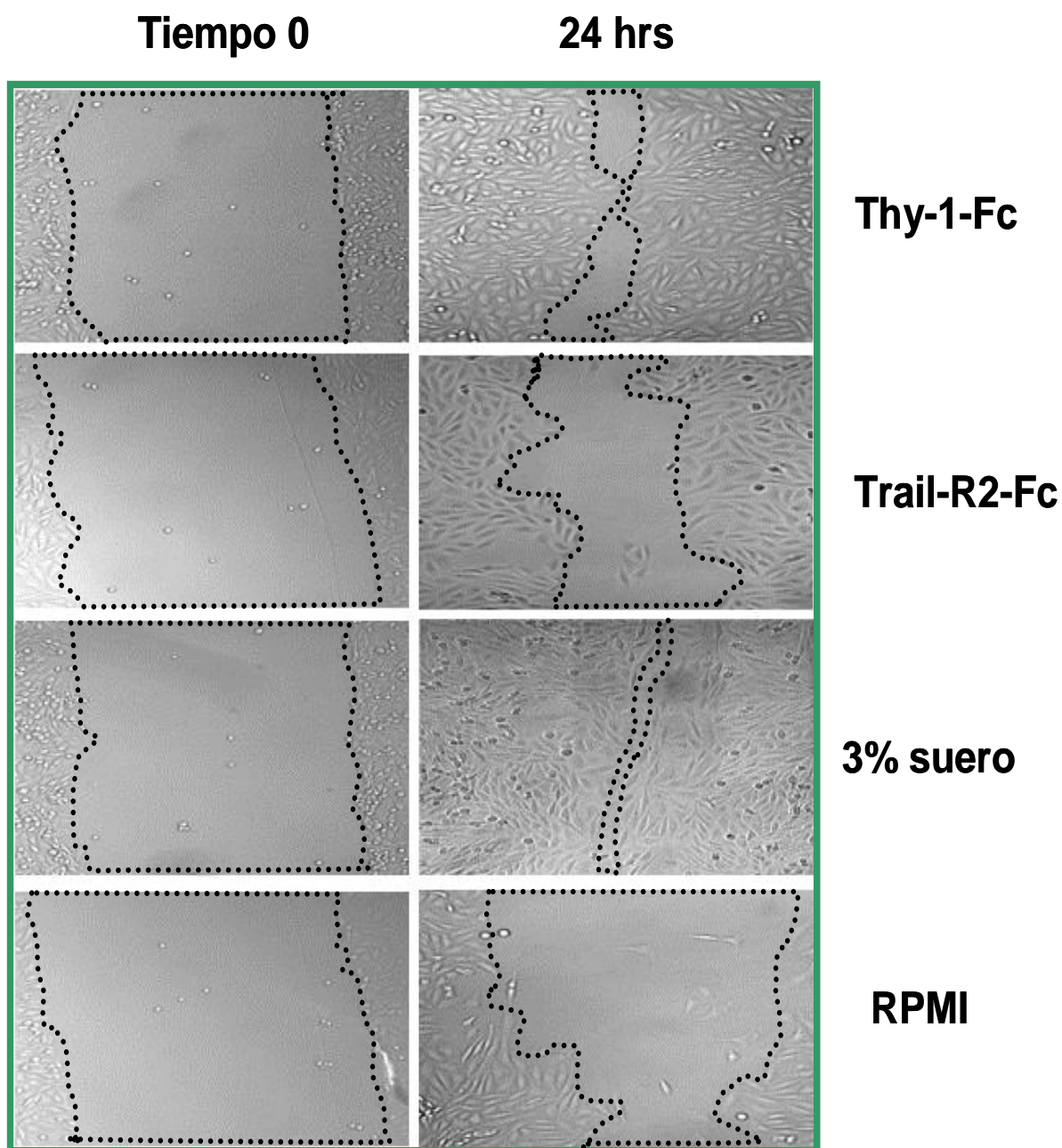
Gráfico1: Cuantificación del número de adhesiones focales por astrocito estimulado con distintas concentraciones del complejo Thy-1-Fc/Proteína-A. Los resultados demuestran que una concentración de 4 μg de Thy-1-Fc + 0,4 μg de Proteína-A es suficiente para inducir una máxima formación de adhesiones focales en astrocitos DI TNC1. El número de adhesiones focales es significativamente mayor que su control negativo sin estímulo. La cuantificación de las adhesiones focales se realizó utilizando el programa Image J. Este resultado corresponde al promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes.* $p < 0,05$.

6.1.2 Ensayo de migración por herida.

Conociendo la concentración óptima para la estimulación de los astrocitos se pasó a la segunda parte de este objetivo que era estudiar si la estimulación con Thy-1 induce migración de estas células. Para ello se realizó el ensayo de migración por herida descrito en Materiales y Métodos.

Como se observa en la fotografía 2, el ancho de la herida a tiempo 0 es de alrededor de 200 μm y en el caso de los astrocitos estimulados con 3% suero la herida es de alrededor de 30-40 μm luego de 24 hrs de estimulación. Se observa también que el ancho de la herida no es el mismo en todos lados, por lo que se decidió medir el área de toda la herida para su cuantificación.

Una vez tomadas las fotografías a distintos tiempos, se calculó el área de cada herida. El promedio de éstas áreas sacadas a tiempo 0 se estandarizó como 100%. Como demuestran los resultados de la cuantificación de las distintas heridas, los astrocitos estimulados con suero son los que migran más eficientemente al área libre de células (Zona de la herida), seguido de los astrocitos estimulados con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A (4 μ g/ 0,4 μ g). Esta diferencia fue significativa también entre los astrocitos estimulados con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A comparada con los controles negativos los cuales cubren un 20% menos el área libre de células (Gráfico 2A). Esta diferencia se observa mejor a las 24 hrs donde las diferentes condiciones se compararon con respecto a los astrocitos tratados con medio RPMI sin suero. Lo que se pudo observar es que las células estimuladas con Thy-1-Fc/Proteína-A (4 μ g/0, 4 μ g□) migran un 70% más que el medio sin suero. También se observó que los astrocitos estimulados con 3% suero son los que más migran (alrededor del doble), comparado con los astrocitos sin estímulo (Gráfico 2B).



Fotografía 2: Ensayo de migración por herida a las 24 hrs de estimulación. En una monocapa confluyente de astrocitos se le hizo una herida con la punta de una pipeta amarilla para luego monitorear la migración de estos astrocitos hacia el área libre de células usando un microscopio invertido luego que las células fueron tratadas con el complejo soluble Thy-1-Fc/Proteína-A o Trail-R2-Fc/Proteína-A, RPMI sin suero o con 3% suero. La migración no fue la misma en todos los lugares de la herida. En el mismo pocillo hay zonas en que la herida esta cerrada y en otras todavía mide alrededor de 30 μm por lo que se decidió medir el área de cada herida como se representa con la línea punteada negra.

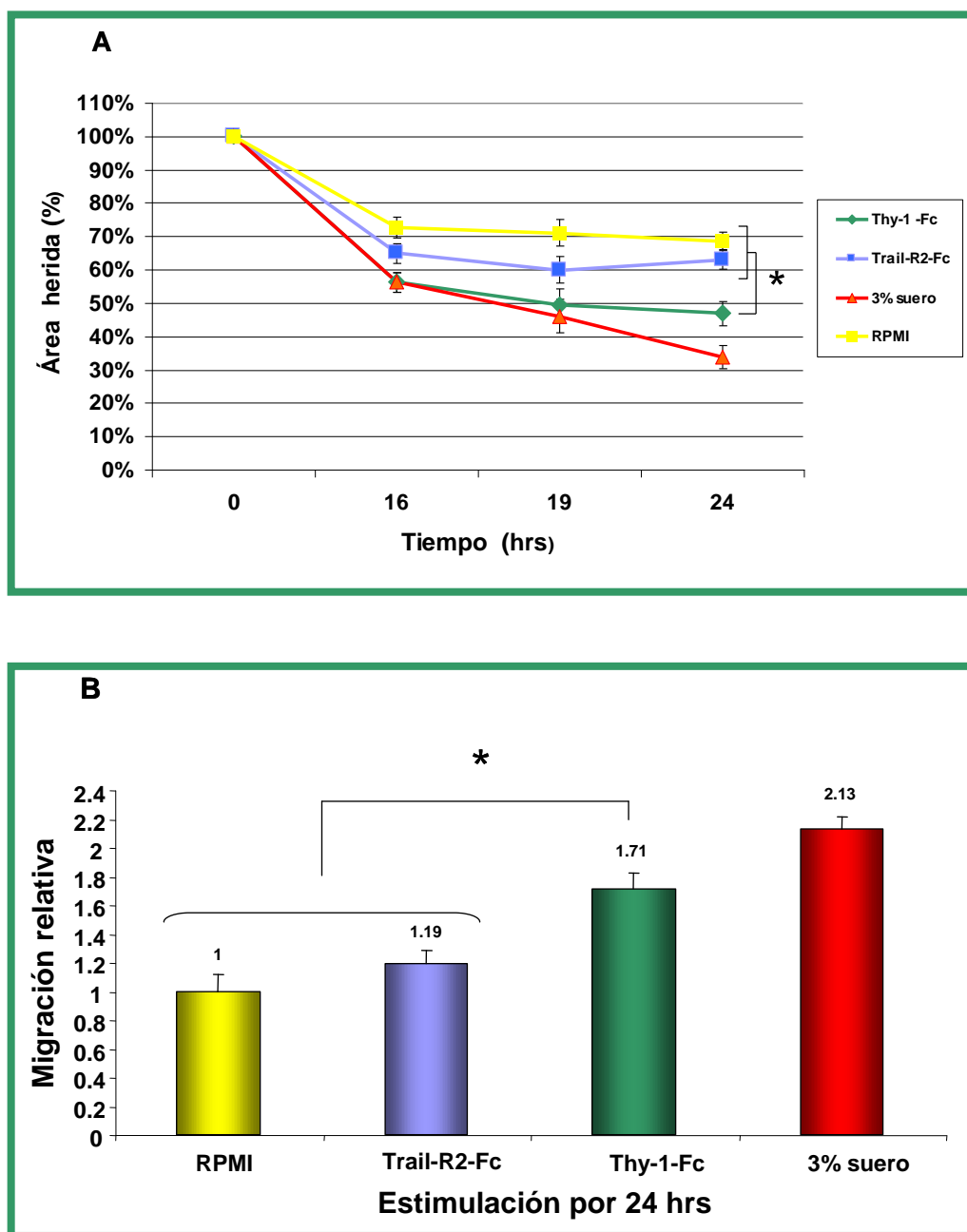
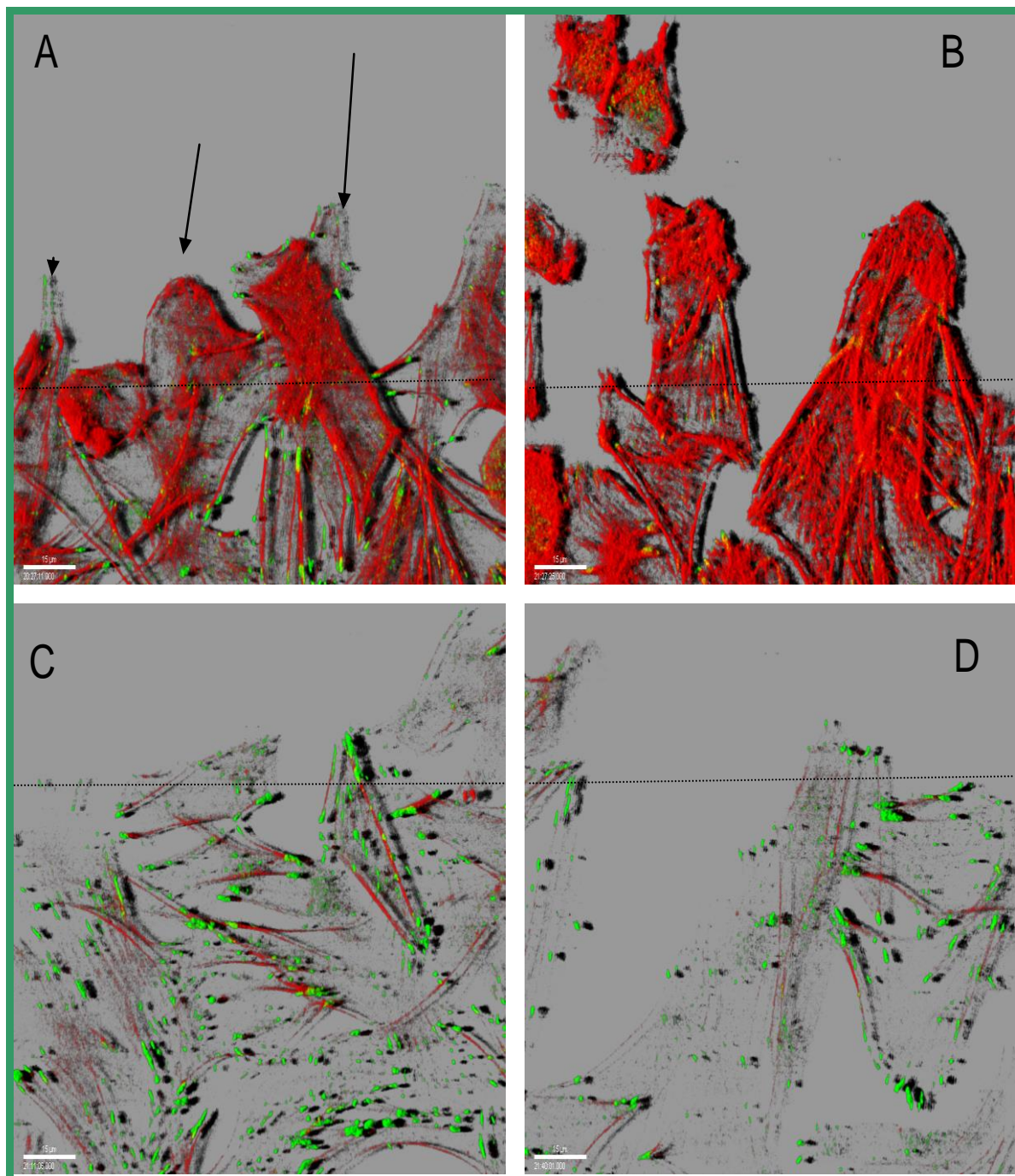


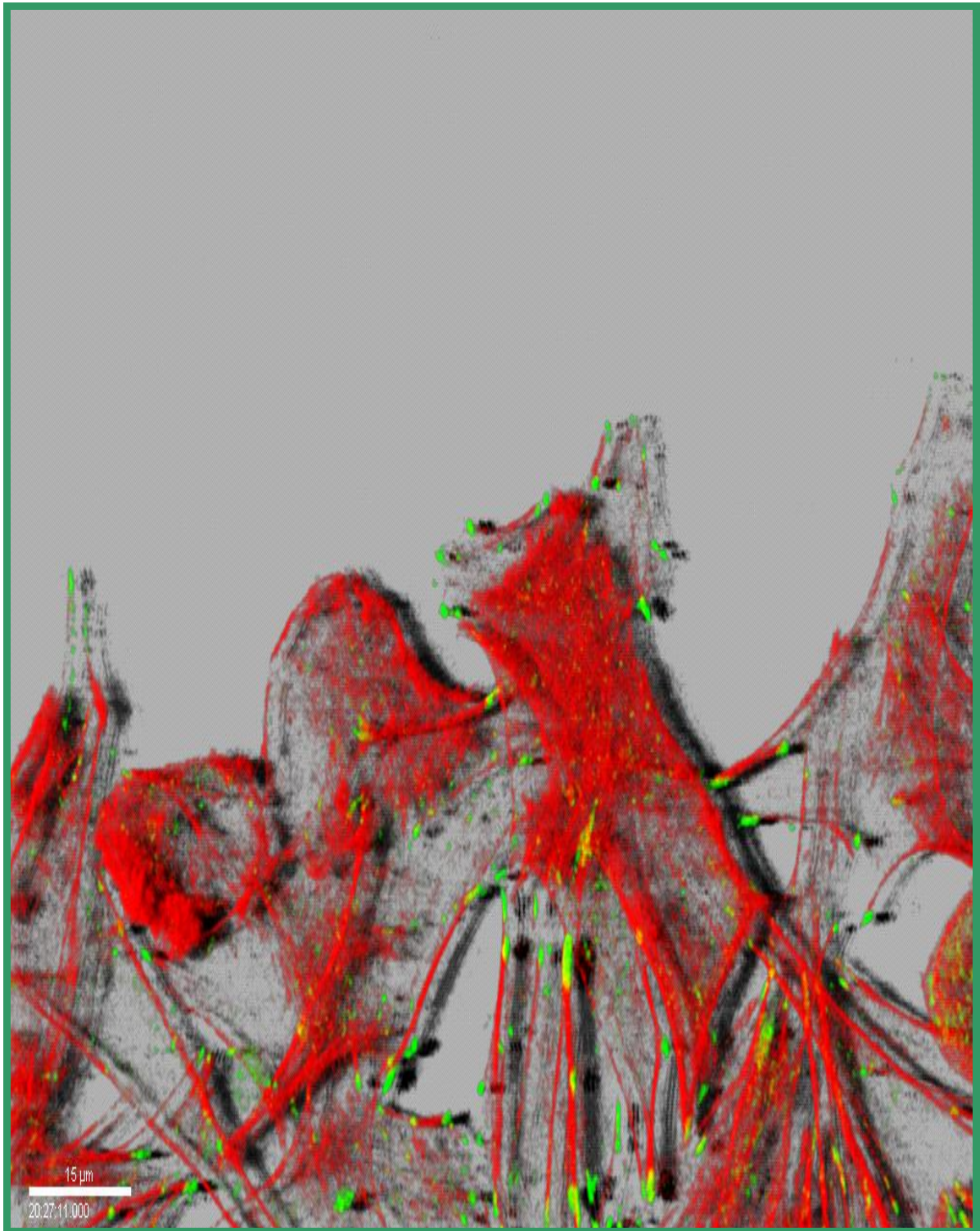
Gráfico 2: Cuantificación del ensayo de migración por herida. A) Cuantificación temporal del área de las heridas con distintos estímulos. El promedio de la cuantificación del área de cada herida bajo las distintas condiciones fue evaluada a distintos tiempos y el tiempo 0 se estandarizó como el 100%. B) Comparación de las diferentes condiciones con respecto a los astrocitos tratados con medio RPMI sin suero a las 24 hrs. Se observó que las células estimuladas con Thy-1-Fc/Proteína-A ($4 \mu\text{g}/0, 4 \mu\text{g}/\square$) migran un 70% más que el medio sin suero. Estos resultados corresponden al promedio \pm SEM de 8 experimentos independientes y * indica $p < 0,05$ comparado con el control negativo RPMI sin suero y los estimulados con Trail-R2-Fc/Proteína-A.

6.1.3 Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta del borde de la herida

Para corroborar los resultados donde Thy-1 induce la migración de los astrocitos, se realizó un ensayo de Inmunofluorescencia indirecta de la monocapa de astrocitos con la herida después de 1 hr de estimulación con Thy-1-Fc/Proteína-A. Las células fueron fijadas y tratadas con un anticuerpo anti-paxilina, una proteína que está presente en las adhesiones focales. El citoesqueleto de actina fue teñido con faloidina conjugada a rodamina, la que se une fuertemente a la actina polimerizada. Los resultados demuestran que la estimulación con Thy-1-Fc/Proteína-A inducen la formación de lamelipodios (flechas) y filopodios (cabeza de flechas), en las células y además una menor cantidad de adhesiones focales comparado con los controles sin suero o tratados con Trail-R2-Fc/Proteína-A, en las cuales las fibras de estrés se localizaron corticalmente bajo la membrana plasmática (Fotografía 3A y 4). En las células estimuladas con suero se observó una menor formación de lamelipodios y filopodios y adhesiones focales, pero las fibras de estrés son más robustas (Fotografía 3B). En el caso de los controles negativos, éstos presentan una menor cantidad de actina polimerizada y además los astrocitos se encuentran más adheridos a su sustrato a través de grandes adhesiones focales (Fotografía 3C y 3D).



Fotografía 3: Visualización 3D de astrocitos en el borde de las heridas. A una monocapa confluyente de astrocitos se le hizo una herida con la punta de una pipeta amarilla, luego las células fueron estimuladas durante 1 hr. Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo anti- paxilina y el citoesqueleto de actina fue teñido con faloidina conjugada a rodamina. A) Células estimuladas con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A. (B) RPMI con 3% suero como control positivo. Los controles negativos incluyen medio RPMI sin suero (C) y células tratadas con Trail-R2-Fc/Proteína-A (D). Línea punteada denota el borde de la herida al tiempo 0. Barra de Magnificación=20 μm . La visualización en 3D se realizó con el programa de imágenes Imaris.



Fotografía 4: Zoom digital aplicado a la fotografía 3A. Esta fotografía obtuvo 2º lugar en el concurso “premio a las mejores imágenes” otorgado por Nikon en la XX Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile, Pucón 2006.

6.2 Objetivo específico 2: Demostrar si la interacción de Thy-1 con la Integrina $\alpha_V\beta_3$ estimula la proliferación de astrocitos.

6.2.1 Ensayo de viabilidad MTS (Promega)

Los resultados obtenidos por el ensayo de MTS indican que no hay una diferencia significativa en el número de células entre los astrocitos estimulados con los complejos Thy-1-Fc/ Proteína-A (1 $\mu\text{g}/0.1 \mu\text{g}$), Trail-R2-Fc/ Proteína-A (1 $\mu\text{g}/0.1 \mu\text{g}$) y medio RPMI a los tiempos de 16, 24 y 48 hrs (Gráfico 3). Sólo se observó que hay 2 a 3 veces mayor viabilidad de las células tratadas con medio RPMI 3% suero (Control positivo) comparado con las otras condiciones.

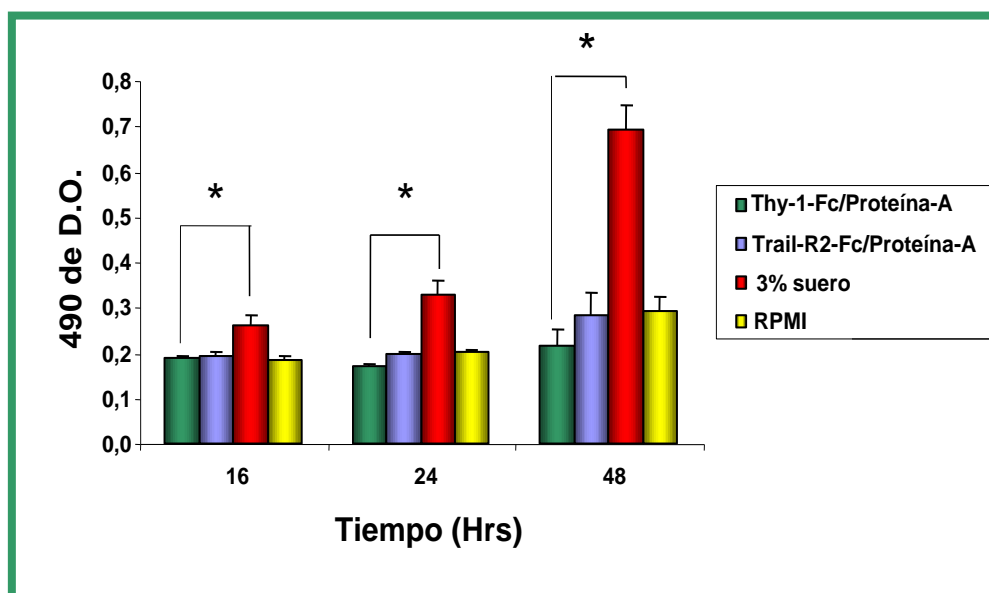


Gráfico 3: Ensayo de viabilidad por MTS. Se sembraron alrededor de 3.000 astrocitos DI-TNC1 por pocillo en placas de 96 pocillos en 100 μl de medio RPMI sin suero y se dejó incubando por 24 hrs a 37° C. Los astrocitos fueron estimulados con los complejos Thy-1-Fc/Proteína-A (1 μg / 0,1 μg), Trail-R2-Fc/Proteína-A (1 μg / 0,1 μg), RPMI sin suero y medio RPMI con 3% suero como control positivo (100 μl por pocillo). Los tiempos de estimulación fueron de 16, 24 y 48 hrs. La cuantificación de la reacción se realiza a 490 nm en lector de micro placas. Sólo se observó que hay una mayor viabilidad de las células tratadas con medio RPMI 3% suero a los distintos tiempos. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes en triplicado y * indica $p < 0.05$ comparado con el control positivo (RPMI 3% suero).

6.2.2 Ensayo de proliferación de astrocitos por azul de tripán.

Cabe destacar que el resultado obtenido en el ensayo de viabilidad por MTS depende directamente de la actividad mitocondrial de las células y podría no correlacionarse con la proliferación de las mismas. Por esta razón, para corroborar estos resultados, se realizó un ensayo de exclusión de azul de tripán donde se contó manualmente el número de células vivas. No se observó ninguna diferencia significativa en la proliferación entre los astrocitos estimulados durante 16, 24 y 48 hrs con los complejos Thy-1-Fc/ Proteína-A (1 μ g/0.1 μ g), Trail-R2-Fc/ Proteína-A (1 μ g/0.1 μ g) y medio RPMI sin suero. Además, se observó que los astrocitos estimulados con medio RPMI 3% suero (Control positivo) por 16, 24 y 48 hrs presentan una proliferación significativamente mayor que en las otras condiciones.

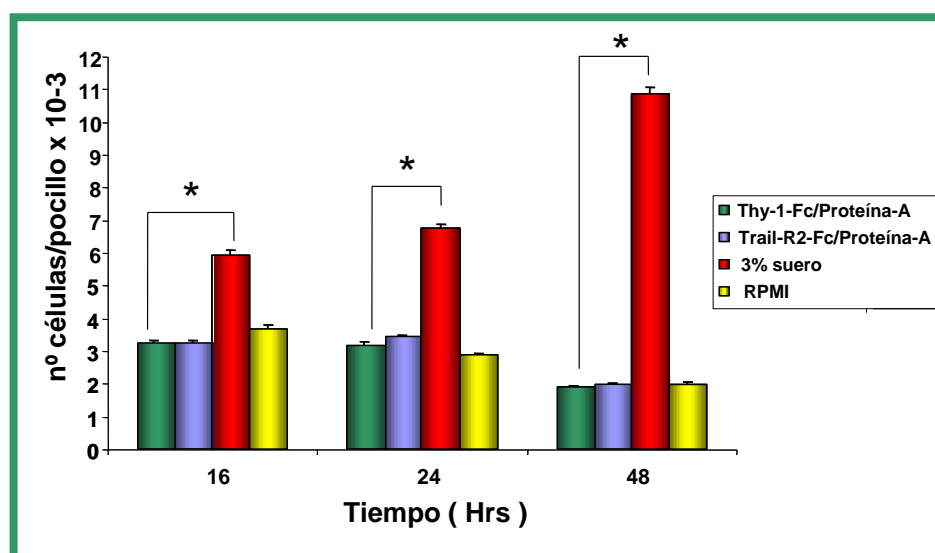


Gráfico 4: Ensayo de exclusión por azul de tripán. Se sembraron alrededor de 3.000 astrocitos de rata DI-TNC1 por pocillo en placas de 96 pocillos junto a 100 μ l de medio RPMI sin suero y se incubaron por 24 hrs. Al día siguiente, las células se estimularon con los complejos Thy-1-Fc/Proteína-A (1 μ g / 0,1 μ g), Trail-R2-Fc/Proteína-A (1 μ g / 0,1 μ g) en 100 μ l de medio RPMI sin suero, RPMI sin suero y RPMI con 3% suero como control positivo (100 μ l por pocillo). Al igual que el ensayo de MTS sólo se observó que hay una mayor proliferación de las células tratadas con medio RPMI con 3% suero en los distintos tiempos. Este resultado corresponde al promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes en triplicado y * indica $p < 0,05$ comparado con el control positivo (RPMI 3% suero).

Por lo tanto, en base a los resultados de estos dos ensayos se comprueba que Thy-1 no induce la proliferación de estos astrocitos a los diferentes tiempos de estimulación (Gráfico 3 y 4).

6.2.3 Análisis del ciclo proliferativo de astrocitos mediante citometría de flujo.

Se analizó también si alguno de los tratamientos utilizados afectaban el ciclo proliferativo de los astrocitos. El análisis por citometría de flujo de las células estimuladas con Thy-1-Fc/ Proteína-A (4 μ g/ 0,4 μ g), Trail-R2-Fc/Proteína-A (4 μ g/ 0,4 μ g) y medio RPMI sin suero, muestran que no hay diferencia entre los porcentajes de células que se encuentran en cada fase a las 24 hrs de estimulación. Esto concuerda con los ensayos anteriores donde se observa que Thy-1 no afecta la proliferación ni la viabilidad de los astrocitos. A su vez, los astrocitos estimulados con medio RPMI con 3% suero presentan un aumento en el porcentaje de células en la fase G2/M, lo que también concuerda con los resultados de los ensayos anteriores, es decir, existe una mayor proliferación y viabilidad de los astrocitos en presencia de suero (Gráfico 5 y Tabla 1 para datos numéricos).

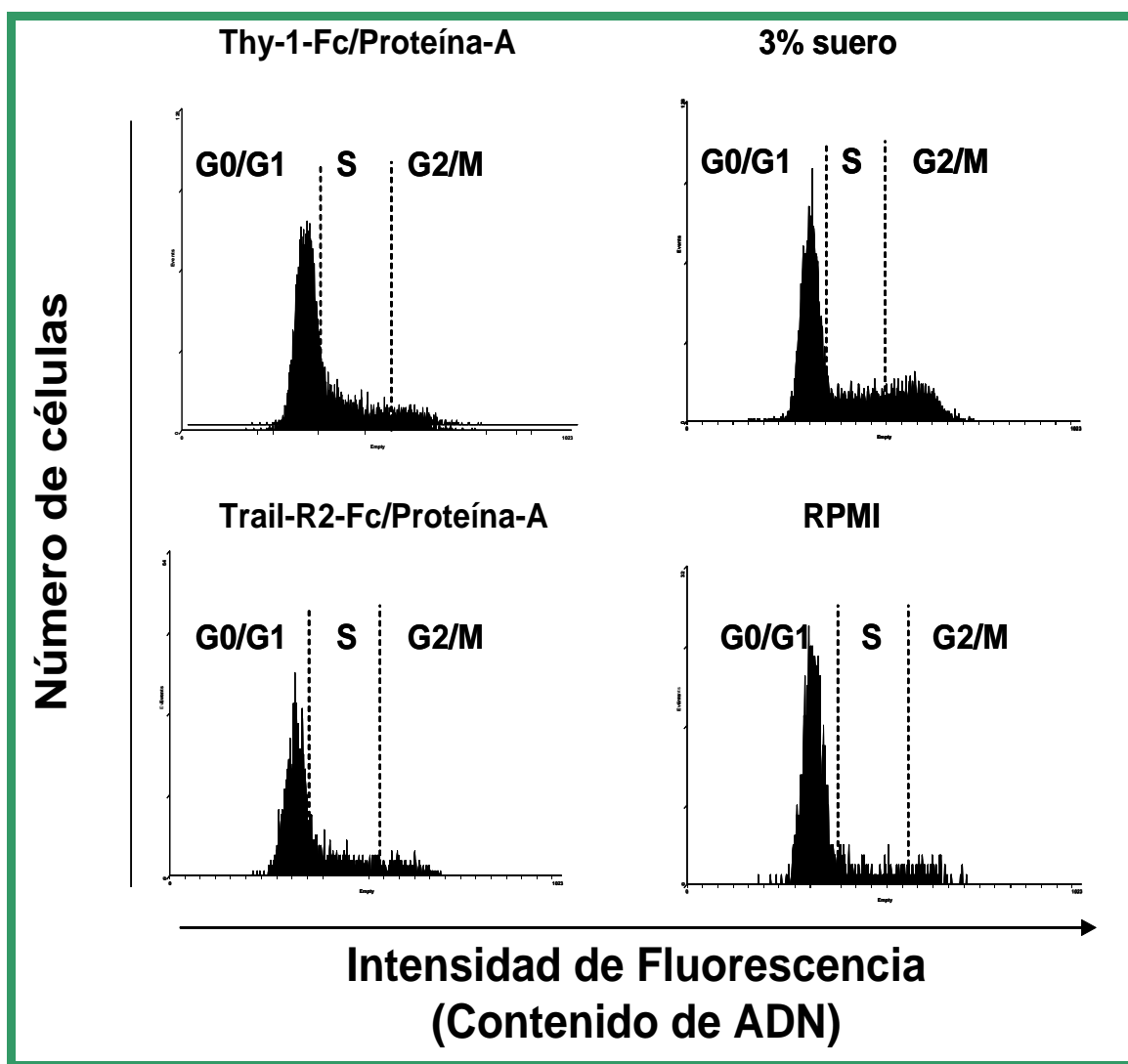


Gráfico 5; Análisis de ciclo proliferativo de astrocitos mediante citometría de flujo. Se sembraron alrededor de 50.000 astrocitos DI-TNC1 por pocillo en placas de 24 pocillos. Luego las células fueron estimuladas durante 24 hrs con los complejos Thy-1-Fc/Proteína-A y Trail-R2-Fc/Proteína-A, además las células se trataron con RPMI sin suero y RPMI 3% suero como control positivo. Pasado este tiempo, las células fueron tripsinizadas, permeabilizadas y su ADN fue teñido con yoduro de propidio para luego ser analizadas por citometría de flujo. Los gráficos muestran un histograma representativo de tres experimentos distintos en el cual se logran diferenciar las distintas fases de ciclo proliferativo de los astrocitos. El peak mas alto corresponde a las células que se encuentran en la fase G0/G1 y se distinguen porque tienen menos intensidad de fluorescencia, por lo tanto, menos cantidad de ADN (2n). La fase de síntesis (S) del ciclo proliferativo se logra diferenciar como la zona entre los dos peak mayores y corresponde a las células que poseen una cantidad de ADN mayor a 2n. Finalmente, las células que están en la fase de G2/M son aquellas que tienen una cantidad de ADN igual a 4n y se ve como un segundo peak en el gráfico (mayor nivel de fluorescencia).

Tabla 1: Porcentaje de astrocitos en las distintas fases del ciclo proliferativo. Astrocitos bajo distintos estímulos durante 24 hrs. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes en duplicado.

	S	G0/G1	G2/M
Thy-1-Fc/Prot-A	36.2 \pm 3.3	55.6 \pm 3.6	6,2 \pm 5.4
Trail-R2-Fc/Prot-A	37.9 \pm 5.4	56.3 \pm 4.9	6.6 \pm 3.7
RPMI 3% Suero	36.6 \pm 3.9	52.2 \pm 5.1	11.7 \pm 2.3
RPMI	42.2 \pm 4.3	51.0 \pm 4.2	7.0 \pm 3.9

6.3 Objetivo específico 3: Estudiar si la enzima PI3-K está implicada en la migración de los astrocitos inducida por Thy-1.

Como se demostró en el objetivo anterior que Thy-1 es capaz de inducir migración de los astrocitos, fue de interés el investigar si la enzima PI3-K estaba implicada en este proceso. Para esto, se utilizaron inhibidores farmacológicos específicos de esta enzima, como son LY 294002 y Wortmanina, en un ensayo de migración por herida en astrocitos estimulados con Thy-1. Otra forma de demostrar que se está activando la PI3-K en los astrocitos estimulados con Thy-1, fue midiendo los niveles de fosforilación de un sustrato de esta enzima, la proteína Akt, mediante un ensayo de Western blot con un anticuerpo específico que reconoce a esta proteína fosforilada en la serina 473 de su secuencia aminoacídica.

6.3.1 Ensayo de migración por herida en presencia de inhibidores farmacológicos de la enzima PI3-K.

Los resultados de la primera parte de este objetivo demuestran que cuando se adiciona el inhibidor LY294002 a una concentración de 3 y 5 μM y Wortmanina a 2 y 4 nM, los astrocitos estimulados con Thy-1 no son capaces de migrar y cubrir la zona libre de células después de 24 hrs. Es importante destacar que la inhibición de la migración es completa debido a que los valores de la migración obtenidos cuando se utilizan los inhibidores y el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A, son los mismos comparados a la migración de los astrocitos sin estímulo (RPMI sin suero) (Gráfico 6).

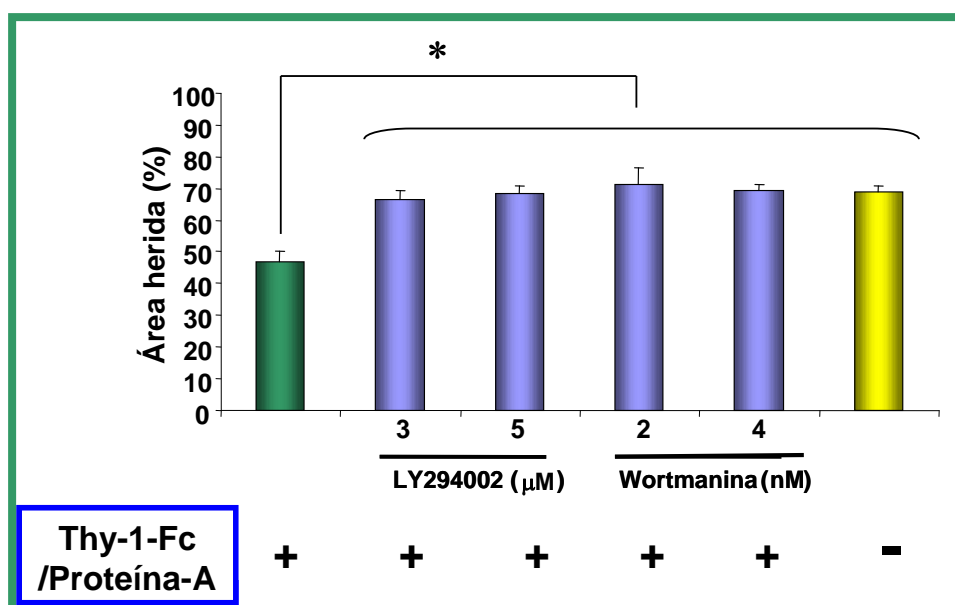


Gráfico 6: Cuantificación de migración de astrocitos estimulados con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A, en presencia de inhibidores farmacológicos de la PI3-K. A una monocapa confluyente de astrocitos se le hizo una herida con la punta de una pipeta amarilla, luego las células fueron tratadas con inhibidores específicos de la enzima PI3-K como LY294002 a una concentración de 3 y 5 μM ó 2 y 4 nM de Wortmanina, para luego monitorear la migración de estos astrocitos hacia el área libre de células usando un microscopio invertido. Una vez sacadas las fotografías al tiempo 0 las células fueron tratadas con el complejo soluble Thy-1-Fc/Proteína-A en medio RPMI sin suero. Como control positivo de migración, las células se trataron solo con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A. Como control negativo se utilizó medio RPMI sin suero. Este resultado corresponde al promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes en duplicado y * indica $p < 0,05$ con respecto al control positivo.

6.3.2 Activación de PI3-K analizada por Western blot.

Por otro lado, los resultados obtenidos del análisis por Western blot indican que en los astrocitos estimulados con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A hay fosforilación de un sustrato de la enzima PI3-K denominado Akt. Este aumento en la fosforilación se ve aumentado a partir de los 10 minutos de estimulación llegando a un peak alrededor de 1 hr el cual es 6 a 7 veces mayor que lo observado para astrocitos sin estímulo (RPMI sin suero) (Gráfico 7).

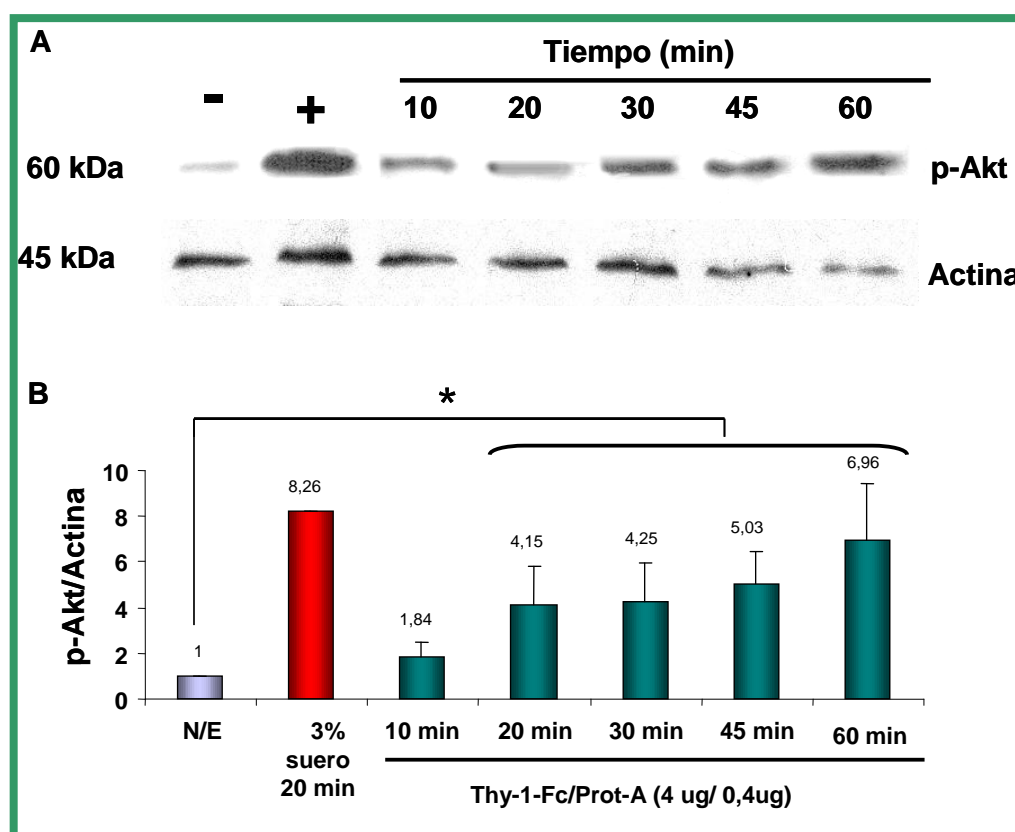


Gráfico 7: Ensayo de fosforilación de Akt en astrocitos estimulados con o sin el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A. A) Inmunoblots en el cual astrocitos fueron estimulados con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A (4 ug/0, 4 ug) a distintos tiempos. Como control negativo se utilizaron astrocitos sin estímulo y como control positivo astrocitos estimulados con 3% suero por 20 min. B) Cuantificación por densitometría de los Inmunoblots los cuales fueron estandarizados con respecto a la actina. Los resultados demuestran que Thy-1 es capaz de inducir fosforilación de Akt, lo que quiere decir que es capaz de activar la enzima PI3-K a partir de los 20 min de estimulación aumentando paulatinamente 6-7 veces más que la condición basal o astrocitos no estimulados a la hora de estimulación. Los datos representan un promedio \pm SEM obtenido de 4 experimentos independientes y * indica $p < 0,05$ con respecto a los astrocitos no estimulados (N/E).

6.4 Objetivo específico 4: Demostrar si la enzima Erk está implicada en la proliferación de los astrocitos inducida por Thy-1.

Dado que el objetivo 2 mostró que Thy-1 no afectaba la proliferación de astrocitos, este objetivo se omitió.

7. DISCUSIÓN

En esta tesis se investigó el papel que cumple la glicoproteína neuronal Thy-1 en la migración y proliferación de los astrocitos. También se inició el estudio de las vías de traducción de señales implicadas en estos procesos, los que son importantes en la astrogliosis gatillada después de un daño cerebral. Específicamente, se estudió si la proteína quinasa PI3-K estaba implicada en el proceso de migración de los astrocitos.

7.1 Estandarización del método de estimulación con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A.

Se ha demostrado que la Integrina $\alpha_V\beta_3$ de los astrocitos interactúa directamente con Thy-1 para inducir un cambio en su morfología (Leyton *et al.*, 2001 y Hermosilla *et al.*, 2007). Al estimular los astrocitos con la proteína de fusión Thy-1-Fc unida a Proteína-A-Sefarosa se produce la agregación de las Integrinas, activación de la proteína G pequeña RhoA y su efector ROCK (Avalos *et al.*, 2002, 2004), a la vez un mayor grado de forforilación en tirosinas de las proteínas implicadas en la formación de adhesiones focales, como p130^{Cas} y FAK y el reclutamiento de paxilina, vinculina y FAK a los sitios donde se forman estos contactos focales. En su conjunto, todos estos eventos inducen cambios en el citoesqueleto de actina y una mayor adhesión celular (Leyton *et al.*, 2001).

En estos estudios, la estimulación de los astrocitos se realizó usando Thy-1-Fc unida a esferas de Proteína-A-Sefarosa o Trail-R2-Fc como control. Estas esferas sirven como una matriz para que las proteínas de fusión se adhieran a través de su fragmento Fc a la Proteína-A, semejando una célula que presenta moléculas de Thy-1 en su superficie. Por otra parte, se ha observado que los astrocitos estimulados con la proteína Thy-1-Fc soluble es capaz de aumentar de

2 a 3 veces la actividad de RhoA, comparado con las células sin estímulo. Aún más, la activación de RhoA causada por Thy-1-Fc soluble es significativamente mayor después de la subsecuente adición de esferas de Proteína-A-Sefarosa indicando la importancia de la agregación de los receptores en la actividad de la vía de transducción de señales que activa a RhoA (Avalos *et al.*, 2004). Dado que el gran tamaño de estas esferas impedía ver la migración de las células en el microscopio, en esta tesis se utilizó un método distinto de estimulación, donde Thy-1-Fc fuese presentado a los astrocitos como un complejo multimérico soluble. Para esto, se utilizó Thy-1-Fc pero unido a Proteína-A soluble para formar un complejo equimolar. Se sabe que la Proteína-A es capaz de unir cuatro moléculas con fragmento Fc, es decir, se necesitan 4 moléculas de Thy-1-Fc por cada molécula de Proteína-A. Teniendo en cuenta que el peso molecular de Thy-1-Fc es aproximadamente 100 kDa y el de la Proteína-A, de 40 kDa se estimó que [4M x 100 grs/moles: 1M x 40grs/moles]. Por lo tanto, se necesitan 10 gramos de Thy-1-Fc por cada gramo de Proteína-A soluble.

Para probar la proporción requerida para estimular la adhesión de los astrocitos se realizó un ensayo de Inmunofluorescencia indirecta. La **fotografía 1** muestra que este complejo sin esferas fue capaz de inducir la formación de adhesiones focales y fibras de estrés de manera significativa cuando se comparó con los astrocitos sin el estímulo de Thy-1. Por otro lado, la cuantificación de las adhesiones focales descrita en el **gráfico 1** mostró que existió un aumento de estas estructuras cuando se estimuló con el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A a concentraciones iguales o mayores a 4 $\mu\text{g}/0,4 \mu\text{g}$. Por lo tanto, se utilizó la cantidad de 4 $\mu\text{g}/0,4 \mu\text{g}$ del complejo Thy-1-Fc/Proteína-A para una superficie de 2 cm^2 (placas de 24 pocillos) en los diferentes ensayos de esta tesis. Interesantemente, se observó que tanto el número de adhesiones focales como el número de células estimuladas por campo es mayor cuando se usa este complejo que cuando se utiliza Thy-1-Fc/Proteína-A-Sefarosa. Esta diferencia probablemente se deba a la condición soluble del complejo, lo cual lo hace accesible a todas las células de la monocapa y de manera homogénea. Por el

contrario, cuando el complejo se usa unido a esferas de Sefarosa, Thy-1-Fc se encuentra adherido a una superficie rígida y convexa que no le permite interactuar de igual manera con todas las células.

7.2 Thy-1 induce la migración de los astrocitos.

Conociendo la cantidad óptima de Thy-1 para estimular a los astrocitos, se estudió si la estimulación sostenida con Thy-1 inducía la migración celular. Usando el ensayo de migración en monocapa se demostró que los astrocitos tratados con medio suplementado con 3% suero son aquellos que primero cierran la herida. Este cierre de la herida podría deberse a que las células migran más rápido o a que proliferan más eficientemente, o ambas. Los resultados también mostraron que el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A es capaz de inducir una migración significativamente mayor que los astrocitos tratados con los controles negativos Trail-R2-Fc/Proteína-A o medio RPMI sin suero (**gráfico 2 y fotografía 2**).

Se utilizó la proteína Trail-R2-Fc como un control negativo porque fue preparada de la misma forma que Thy-1-Fc, ambas contienen el fragmento Fc de la IgG humana y, finalmente, Trail-R2-Fc no es capaz de producir una respuesta en nuestro sistema debido a que sólo corresponde a la porción extracelular del receptor Trail, el cual no se une a los astrocitos. Otra observación interesante fue que los astrocitos tratados con Trail-R2-Fc o con medio sin suero también fueron capaces de migrar hacia la herida aunque de una manera más lenta que las otras condiciones ensayadas. Este resultado sugiere que los astrocitos son capaces de sintetizar sus propias proteínas de matriz extracelular como fibronectina, laminina, vitronectina, colágeno, etc. y estas moléculas son capaces de interactuar con las Integrinas. La interacción y consecuente agregación de las Integrinas lleva a la activación de la proteína G pequeña Rac y a la inducción de la migración celular (Del Pozo *et al.*, 2000).

Otra forma empleada para demostrar que Thy-1 es capaz de inducir la migración celular fue estudiando la formación de estructuras de avance, como lamelipodios y filopodios, en los astrocitos ubicados en el borde de la herida mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta. Lo que se pudo observar en la **fotografía 3**, fue que los astrocitos estimulados con Thy-1 presentaban una gran cantidad de filopodios y lamelipodios en el frente de avance de éstos. Además, estas células presentaban bastante actina polimerizada, principalmente de tipo cortical, debajo de la membrana plasmática. Estudios en cultivos celulares (desarrollados originalmente en fibroblastos, pero luego en muchos otros tipos celulares) usando dominantes negativos o proteínas constitutivamente activas de proteínas G pequeñas, demuestran que las proteínas pequeñas Rac y Cdc42 regulan la polimerización de actina para formar lamelipodios periféricos y filopodios, respectivamente (Nobes y Hall, 1995; Ridley y Hall, 1992; Ridley *et al.*, 1992). Rac puede ser activada a través de la unión de las Integrinas a su ligando (Del Pozo *et al.*, 2000) y se han implicado en esta activación, GEFs de la familia Vav. Una vez activada, Rac induce la nueva polimerización de actina a través de la estimulación del complejo Arp2/3, el que inicia la formación de nuevos filamentos de actina en un ángulo de 70° a partir de otros ya existentes, para formar un verdadero enrejado de filamentos de actina (Pollard y Borisy, 2003).

Evidencias sugieren que el complejo Arp2/3 es activado por Rac a través de IRSp53 (Miki *et al.*, 2000). Rac interactúa con IRSp53, el que a su vez interactúa con una proteína de andamiaje denominada WAVE a través de un dominio SH3 y, finalmente, este complejo es capaz de unir a Arp2/3 y activarlo. Con estos antecedentes obtenidos en otros tipos celulares estimulados con proteínas de la matriz extracelular, sugerimos que lo más probable es que Thy-1, al unirse a la Integrina $\alpha_v\beta_3$ del astrocito y agregarla produzca la activación de Rac y sus distintos agregados efectoras. Dentro de las perspectivas de esta investigación, pero que no fueron abordadas en esta tesis, se pretende demostrar que efectivamente Thy-1 es capaz de inducir la activación de Rac.

Otra observación realizada en los ensayos de inmunofluorescencia fue que los astrocitos tratados con los controles negativos, Trail-R2-Fc o medio RPMI sin suero, presentaban una gran cantidad de adhesiones focales, indicando que las células están fuertemente adheridas a su sustrato e impidiendo su migración. Este fenómeno se relaciona con la activación de la proteína G pequeña RhoA en las células, lo que induce una mayor formación de adhesiones focales y fibras de estrés (Ridley *et al.*, 1992). Estudios en fibroblastos muestran que un efector de RhoA, denominado ROCK, es capaz de inhibir a Rac (Tsuji *et al.*, 2002). Por lo tanto, en una célula en migración generalmente hay una distribución espacial diferencial de las distintas proteínas de la familia Rho. Por ejemplo, en el frente de avance hay una elevada actividad de Rac con una leve actividad de RhoA mientras que la actividad de Rac es débil ya sea detrás del frente de avance como en los lados y cola de la célula y, a su vez, hay un aumento de la actividad Rho en estas zonas de la célula.

7.3 La enzima PI3-K está implicada en el proceso de migración celular inducido por Thy-1-Fc/Proteína-A.

La transducción de señales mediada por Integrinas requiere tanto de la unión al ligando como el entrecruzamiento de las mismas con proteínas de la matriz extracelular o de otras células (Schwartz *et al.*, 1991; Kornberg *et al.*, 1991; Miyamoto *et al.*, 1995; Shankar *et al.*, 1993; Leyton *et al.*, 2001). Estas señales, además de activar cascadas de proteínas tirosina y serina/treonina quinasas activan otras cascadas de señalización que involucran a fosfolípidos y lípidos tipo inositol.

Un aspecto importante en las señales activadas por Integrinas es el hecho de que esta estimulación es en zonas o contactos definidos, a diferencia de lo que ocurre con factores de tipo soluble, donde la respuesta es gatillada en toda la célula. Este nivel de regulación es especialmente importante para la migración celular u organización tisular, pero no es suficientemente extensa para gatillar la

progresión del ciclo celular, la cual generalmente necesita la sinergización, como por ejemplo, con factores de crecimiento.

Las señales intracelulares mediadas por Integrinas se pueden dividir en dos grandes grupos las de tipo transitorio y las de tipo sostenido. Las señales de tipo transitorio son aquellas en que la activación de la Integrina por su ligando decae en tiempos cortos. Por ejemplo, cuando las células son sembradas sobre proteínas de la matriz extracelular, la actividad de la tirosina quinasa c-Src se ve aumentada por alrededor de una hora para luego volver a sus niveles basales. Este mismo comportamiento se puede observar con Rac, Cdc42, JNK, Ras y Shc (Giancotti y Rouslahti, 1999; Cary *et al.*, 1999). Por otra parte, la actividad de Rho comienza con un descenso transitorio, seguido de un gran “peak”, para finalmente decaer gradualmente a sus niveles basales antes de una hora. Se ha visto que la actividad de Erk y PI3-K son del tipo transitorio, debido a que hay un aumento de la actividad de éstas pero que tiende a bajar dentro de una hora (Schwartz y Assoian, 2001).

Por el contrario, las señales de tipo sostenido son generalmente gatilladas por adhesión celular. La fosforilación de FAK en la tirosina 397 es un ejemplo de este tipo de activación. La habilidad de las Integrinas para activar a los receptores de factores de crecimiento es considerada también una señal sostenida (**gráfico 8**).

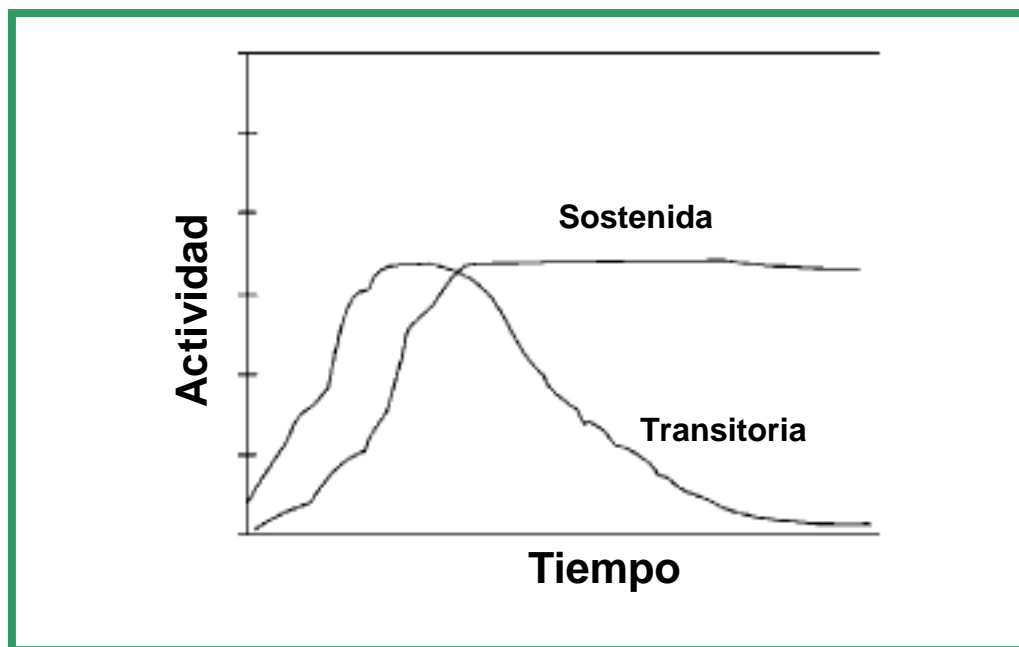


Gráfico 8: Señales de tipo transitorio y sostenido de las Integrinas. Células sembradas sobre proteínas de la matriz extracelular muestran un aumento de actividad de tipo transitorio de ciertas proteínas como son c-Src, Erk, GTPasas de la familia Rho, PI3-K, Akt y JNK. Por otro lado, eventos, como son fosforilación de FAK, localización de balsas lipídicas en la membrana plasmática y un aumento de la activación de señales relacionadas con factores de crecimiento, son de tipo sostenido en el tiempo (adaptado de Moissoglu y Schwartz, 2006),

FAK es un proteína tirosina quinasa de tipo no receptor que participa en un variado número de eventos relacionados con direccionalidad y migración celular (Mitra *et al.*, 2005). Células en que se ha bloqueado la actividad de FAK presentan serios defectos tanto en la migración como en la polaridad celular. A su vez, la sobreexpresión de FAK induce una gran persistencia de migración direccional (Gu *et al.*, 1999).

La activación de FAK está mediada por su fosforilación en múltiples sitios, siendo el principal, la tirosina 397 (Parsons, 2003; Mitra *et al.*, 2005). Esta fosforilación es de tipo sostenida en células adherentes y se ha reportado que FAK fosforilada es capaz de unir y activar a c-Src y PI3-K (Schaller *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996). La fosforilación de FAK en la tirosina 397 aumenta la formación de protrusiones pseudopodales, lo que le confiere un marcado rol en la migración celular (Cho y Klemke, 2002). A su vez, células deficientes de FAK

muestran una marcada disminución en la actividad de Rac y la pérdida de la formación de lamelipodios (Sieg *et al.*, 1999; Hsia *et al.*, 2003). Por otro lado, la fosforilación transitoria de FAK en la tirosina 925 luego de la adhesión celular forma un sitio de unión para la proteína adaptadora Grb2, activándose así la vía de las MAP quinasas. Una vez activada la vía, ésta afecta la migración celular debido a que promueve la activación de la quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK), con la consecuente contracción celular, demostrándose además que aumenta la afinidad de las Integrinas por su ligando (Hughes *et al.*, 1997; Klemke *et al.*, 1997).

Varios otros sitios de fosforilación de FAK han sido identificados como moduladores de la actividad de otras proteínas quinasas y la unión de otras moléculas “río abajo” como son paxilina y p130^{Cas} (Grigera *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2005). Ambas proteínas activan a Rac a través del complejo Crk-DOCK180 (Kiyokawa *et al.*, 1998a, 1998b; Cheresh *et al.*, 1999; Brugnera *et al.*, 2002; Valles *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que paxilina también puede inhibir a Rac en los lados y cola de una célula migratoria a través de la activación de un GAP para Arf6 (West *et al.*, 2001; Nishiya *et al.*, 2005). Otra forma en que FAK induce la migración celular es inhibiendo a Rho a través de la fosforilación y posterior activación de un GAP de Rho denominado p190RhoGAP. Finalmente, FAK a través de la formación de un complejo con otras proteínas quinasas como c-Src, Erk, MLCK y proteínas adaptadoras como paxilina y p130^{Cas}, aumenta la actividad de una proteasa denominada Calpaina la cual, a su vez, promueve el desensamblaje de las adhesiones focales en el frente de avance y en la cola de la célula (Carragher *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2004).

En resumen, como indica la **figura 9**, existen múltiples vías para gatillar y regular la activación de Rac y la migración celular, y todas ellas implican la activación de Integrinas y FAK. Me interesó particularmente estudiar la ruta Integrina-FAK-PI3-K-Rac debido a que existen evidencias indicando que la expresión de PI3-K constitutivamente activa en fibroblastos genera la formación de

lamelipodios extensos y velos de membrana luego de la activación de Rac (Reif *et al.*, 1996). Además, PI3-K y sus productos lipídicos han sido ampliamente involucrados en el control de la polaridad y la migración celular (Stephens *et al.*, 2002). La producción de fosfatidilinositol trisfosfato (PI (3,4,5) P3) por parte de esta quinasa lleva a la unión de GTP a Rac a través de GEFs tales como DOCK180, VAV2, TIAM-1 y PIX, con el consecuente aumento de la actividad de esta proteína en muchos tipos celulares (Cheresh *et al.*, 1999; Yoshii *et al.*, 1999; Marignani y Carpenter, 2001; Hamelers *et al.*, 2005).

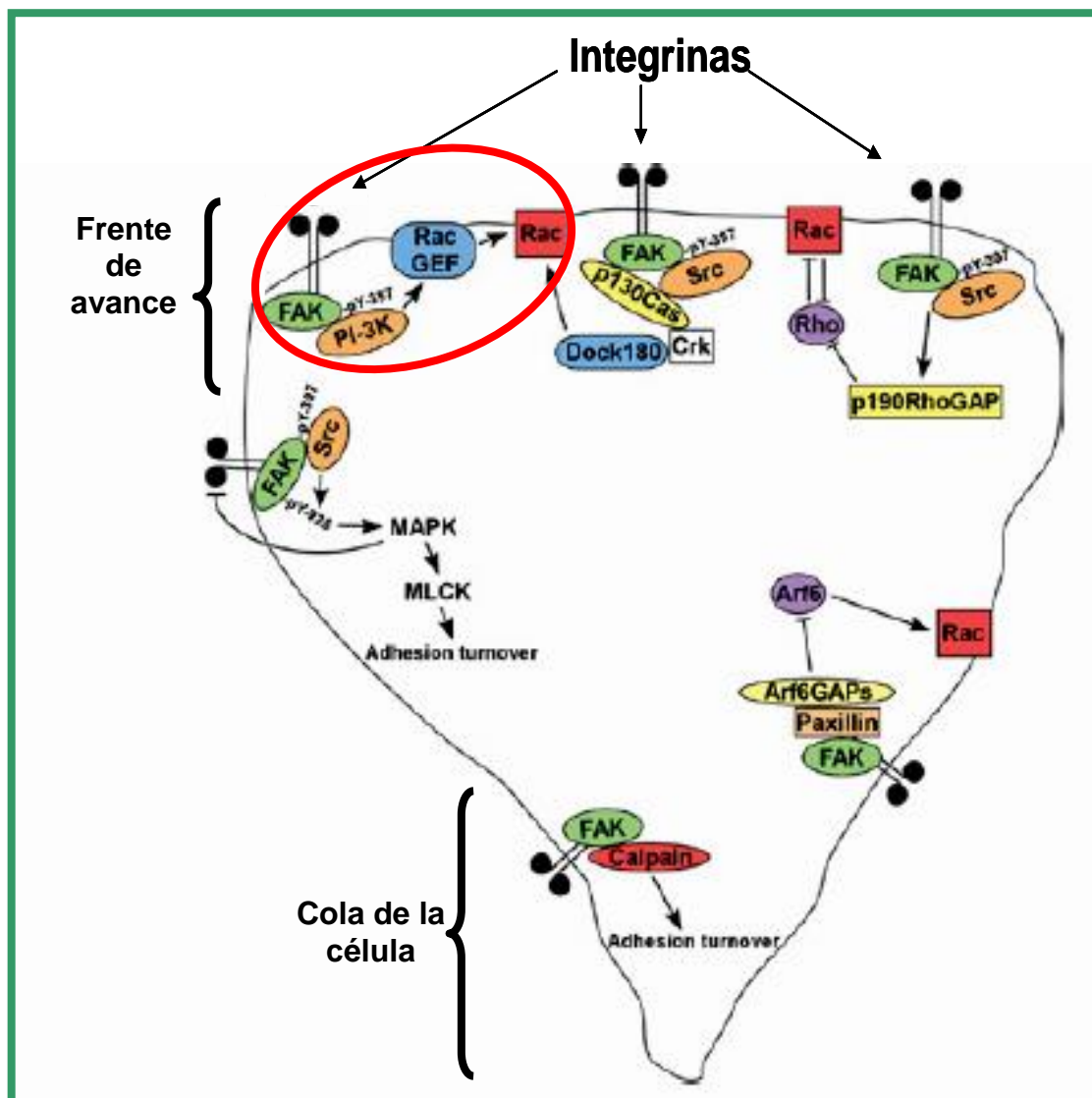


Figura 9: Señalización intracelular a través de Integrinas/FAK y su rol en la migración celular. En el frente de avance, FAK forma un complejo con PI3-K el cual promueve la activación de Rac a través de GEFs, los que se unen a lípidos de tipo fosfoinositósido. El complejo FAK-p130^{Cas} también activa a Rac a través del GEF DOCK180. FAK y c-Src median la inhibición de Rho a través de la fosforilación y activación de p190RhoGAP. FAK promueve también la activación de Erk, el cual facilita el desensamblaje de adhesiones focales a través de MLCK y la desactivación de las Integrinas. FAK también regula la localización o activación de GAPs de la familia Arf, como es GIT1, el cual inhibe Arf6 suprimiendo la activación de Rac en la parte posterior de la célula en avance. Finalmente, FAK regula a la proteasa Calpaína que a su vez degrada algunas proteínas de las adhesiones focales favoreciendo su desensamblaje en la cola de la célula y permitiendo su despegue. (Adaptado de Moissoglu y Schwartz, 2006)

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la enzima PI3-K efectivamente está involucrada en la migración de los astrocitos estimulados por el complejo Thy-1-Fc/Proteína-A ya que los inhibidores LY294002 y Wortmanina la disminuyeron a sus niveles basales (**gráfico 6**). Además, se pudo observar un aumento de la fosforilación de Akt, un sustrato de PI3-K, la cual aumentó a partir de los 10 min y se mantuvo alta hasta alrededor de 1 hora (**gráfico 7**).

No podemos descartar que exista otro mecanismo de activación de Rac, como por ejemplo, a través de paxilina y p130^{Cas}. De hecho, existen evidencias que demuestran que existe un aumento en la fosforilación de FAK, p130^{Cas} y un reclutamiento de paxilina en los sitios donde se forman las adhesiones focales después de estimular lo astrocitos con Thy-1 (Leyton *et al.*, 2001).

7.4 Thy-1 no induce proliferación de astrocitos.

Otro punto importante fue si Thy-1 es capaz de inducir la proliferación de los astrocitos. La proliferación de astrocitos ha sido involucrada en astrogliosis, fenómeno que ocurre después de un daño cerebral. Resultados de diversos estudios han demostrado que la activación de las Integrinas lleva a un aumento de la proliferación celular. Por ejemplo, se ha visto que la pérdida de adhesión de las células sobre su sustrato generalmente resulta en una completa detención en la fase G1 del ciclo celular, destacándose el papel importante de las Integrinas en este proceso (Stoker *et al.*, 1968). Diferentes estudios demuestran que la sola activación de las Integrinas no es capaz de inducir progresión del ciclo celular, pero si es acompañada de la activación de receptores de factores de crecimiento, existe un aumento de la proliferación mediante mecanismos que involucran a la activación de Erk, ciclinas y Cdks.

El primer método que se utilizó para demostrar este objetivo fue la utilización de un ensayo de viabilidad denominado MTS, que mide principalmente la

actividad mitocondrial de las células, lo que se relaciona indirectamente con proliferación celular. Los resultados de este ensayo mostraron que la viabilidad de los astrocitos tratados con Thy-1 no difería significativamente de aquellos tratados con Trail-R2-Fc o con medio RPMI sin suero (**gráfico 3**). Este resultado sugiere que Thy-1 no es capaz de inducir una mayor viabilidad o un aumento de la actividad metabólica de los astrocitos tanto a las 16, 24 ó 48 hrs, lo que a su vez es indicativo de que no induce la proliferación de estas células.

Otro hecho importante que se pudo apreciar fue que los astrocitos tratados con medio RPMI suplementado con 3% suero presentaban un aumento de la viabilidad de estas células. Como este método es un ensayo indirecto de medición de proliferación celular se utilizó otro método para medir directamente el número de células antes y después de cada tratamiento, cual es la técnica de proliferación por exclusión de azul de tripán. Obteniéndose resultados parecidos a los con la técnica de MTS. Es así como en células tratadas con Thy-1-Fc/Proteína-A no se observó un aumento significativo del número de células luego de 16, 24 ó 48 hrs de tratamiento, comparado con sus controles negativos (**gráfico 4**).

En cuanto a las células tratadas con medio suplementado con 3% suero se pudo observar un marcado aumento en el número de células en cultivo indicando, por lo tanto, un aumento en la proliferación. Este aumento se debe a que el suero posee distintos componentes que promueven la proliferación celular, como factores de crecimiento EGF, PDGF y el ácido lisofosfatídico (LPA). Los factores de crecimiento inducen una activación sostenida de Erk y MAP quinasas y requiere de la adhesión a la matriz extracelular a través de la Integrinas (Walkers y Assoian, 2005). Erk fosforilado puede translocar al núcleo aumentando la expresión de, por ejemplo, ciclina D1, la que a su vez es capaz de inducir una progresión del ciclo celular y consecuentemente un aumento de la proliferación celular. Este fenómeno se pudo observar en los ensayos en que se midió la cantidad de células en las distintas fases del ciclo celular. Los resultados de estos experimentos (**gráfico 5 y tabla 1**), mostraron que efectivamente las células

tratadas con 3% suero durante 24 hrs presentaban un mayor número de células en la fase G2/M. Las células tratadas con Trail-R2-Fc, Thy-1-Fc y medio RPMI sin suero mostraron un número parecido de células en las distintas etapas del ciclo proliferativo, indicando que Thy-1 por sí solo, no induce una progresión del ciclo proliferativo celular. Sin embargo, no se puede descartar que Thy-1 junto a factores de crecimiento potencie el efecto de estos últimos.

Como perspectiva futura se piensa estimular a los astrocitos con Thy-1-Fc junto a algún factor de crecimiento (PDGF o EGF), para ver si combinado con factores de crecimiento, Thy-1 induce una mayor proliferación en relación a los tratados sólo con factores de crecimiento.

8. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan en parte la hipótesis planteada. Por un lado, se completó el objetivo específico 1 que era demostrar que la interacción de la glicoproteína neuronal Thy-1 con la Integrina $\alpha_v\beta_3$ en la membrana del astrocito es capaz de inducir su migración.

2. A su vez, en el contexto del objetivo específico 3 se demostró que la enzima PI3-K está implicada en la migración de los astrocitos inducida por Thy-1,

3. Se demostró también que el complejo Thy-1-Fc/Proteína A no induce la proliferación de los astrocitos, por lo que el objetivo específico 2 de esta tesis se cumplió pero de manera negativa y por ende el objetivo 4 que pretendía estudiar el rol de la enzima Erk en la proliferación de los astrocitos carecía de sentido.

La trascendencia fisiológica de la interacción molecular estudiada en esta tesis, se fundamenta en el contexto de un daño cerebral, en la cual Thy-1 neuronal se uniría a la Integrina $\alpha_v\beta_3$ (gracias al aumento en su expresión) generando cambios moleculares y morfológicos en los astrocitos. Es así como, en el evento de un daño cerebral, la formación de las adhesiones focales y fibras de estrés estimuladas por Thy-1 se podría favorecer por el aumento en la expresión de la Integrina $\alpha_v\beta_3$, lo que permitiría que los astrocitos reactivos cambien su morfología, migren y luego permanezcan en el sitio de la lesión con el propósito de formar la cicatriz glial, la cual constituye un impedimento en la regeneración de las neuronas dañadas.

9. BIBLIOGRAFÍA

ABANKWA, D.; KURY, P. 2004. Traumatic injury to CNS fiber tracts--what are the genes telling us? *Curr. Drug Targets*. 5: 647-654.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. 2002. *Biología molecular de la célula*. 3ª. ed. Ediciones Omega, Barcelona, España. 1387 p.

ANGEL, P.; KARIN, M. 1991. The role of jun, Fos and the AP-1 complex in the cell proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1072: 129-157.

AVALOS, A.M.; LABRA C.V.; QUEST, A.F.; 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.; ARTHUR, W.T.; SCHNEIDER, P.; QUEST, A.F.; BURRIDGE, K.; LEYTON, L. 2004. Aggregation on Integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes. *J Biol Chem*. 279: 39139-39145.

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.

BEECH, J.N.; MORRIS, R.J.; RAISMAN, G. 1983. Density of Thy-1 on axonal membrane of different rat nerves. *J Neurochem* 41: 411-417.

BEISSERT, S.; HE, H.T.; HUEBER, A.O.; LELLOUCH A.C.; METZE, D.; MEHLING, A.; LUGER, T.A.; SCHWARZ, T.; GRABBE, S. 1998. Impaired cutaneous immune responses in Thy-1-deficient mice. *J Immunol*. 161:5296-5302.

BENSON, M.D. 2003. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 10694-10699.

BOUKHELIFA, M.; HWANG, S.J.; VALTSCHANOFF, J.G.; MEEKER, R.B.; RUSTIONI, A.; OTEY, C.A. 2003. A critical role for palladin in astrocyte morphology and response to injury. *Mol. Cell Neurosci*. 23: 661-668.

BRUGNERA, E.; HANEY, L.; GRIMSLEY, C.; LU, M.; WALK, S.F.; TOSELLO-TRAMPONT, A.C.; MACARA, I.G.; MADHANI, H.; FINK, G.R.; RAVICHANDRAN, K.S. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat. Cell Biol*. 4: 574-582.

BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. 1996. Focal adhesion, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12: 463-518.

BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M.; ZHONG C. 1997. Focal adhesion assembly. *Trends Cell Biol.* 7:342-347.

BURRIDGE, K. 2005. Foot in mouth: do focal adhesions disassemble by endocytosis? *Nat Cell Biol.* 7: 545-547.

CARRAGHER, N.O.; WESTHOFF, M.A.; FINCHAM, V.J.; SCHALLER, M.D.; FRAME, M.C. 2003. A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. *Curr. Biol.* 13: 1442–1450.

CARY, L.; HAN, D.C.; GUAN, J.L. 1999. Integrin-mediated signal transduction pathway. *Histol. Histopathol.* 14: 1001-1009.

CHEN, H.C.; APEDDU, P.A.; ISODA, H.; GUAN, J.L. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 26329–26334.

CHEN, C.H.; WANG, S.M.; YANG, S.H.; 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.; CRIST, F.; 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.

CHERESH, D.A.; LENG, J.; KLEMKE, R.L. 1999. Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J. Cell Biol.* 146: 1107–1116.

CHO, S.Y.; KLEMKE, R.L. 2002. Purification of pseudopodia from polarized cells reveals redistribution and activation of Rac through assembly of a CAS/Crk scaffold. *J. Cell Biol.* 156: 725–736

CHOI, J.; LEYTON, L.; NHAM, S.U. 2005. Characterization of alphaX I-domain binding to Thy-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 331: 557-561.

CRAWFORD, J.M.; BARTON, R.W. 1986. Thy-1 glycoprotein: structure, distribution and ontogeny. *Lab Invest.* 54: 122-135.

DALCHAU, R.; DAAR, A.S.; FABRE J.W. 1989. The human Thy-1 molecule. *Immunol.* 45:185-96.

DAVIES, S.J.; GOUCHER, D.R.; DOLLER, C.; SILVER, J. 1999. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 19: 5810-5822.

DEL POZO, M.A. 2000. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector Pak. *EMBO J.* 19: 2008-2014.

DE MELKER, A.A.; SONNENBERG, A. 1999. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and Integrin signaling events. *Bioessays* 21: 499-509.

DEZAWA, M.; TAKAHASHI, I.; ESAKI, M.; TAKANO, M.; SAWADA, H. 2001. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1771-1776.

DEZAWA, M. 2002. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anat. Sci. Int.* 77: 12-25.

DREYER, E.B.; LEIFER, D.; HENG, J.E.; McCONNELL, J.E.; GORLA, M.; LEVIN, L.A.; BARNSTABLE, C.J.; LIPTON, S.A. 1995. An astrocytic binding site for neuronal Thy-1 and its effects on neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11195-11199.

DOMENICONI, M.; FILBIN, M.T. 2005. Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration. *J. Neurol. Sci.* 233: 43-47.

ELLISON, J.A.; VELIER, J.J.; SPERA, P.; JONAK, Z.L.; WANG, X.; BARONE, F.C.; 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.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420: 629-635.

FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. 1990. Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 43-60.

FELLIN, T.; CARMIGNOTO, G. 2004. Neurone-to astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol.* 559: 3-15.

FUJIMOTO, T. 1996. GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking. *J. Histochem. Cytochem.* 44: 929-941.

GIANCOTTI, F.G.; ROUSLAHTI, E. 1999. Integrin signalling. *Science*. 285: 1028-1032.

GILLE, J.; SWERLICK, R.A. 1996. Integrins: role in cell adhesion and communication. *Ann N Y Acad Sci*. 797: 93-106.

GRAND PRE, T.; NAKAMURA, F.; VARTANIAN, T.; STRITTMATTER, S.M. 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403: 439-444.

GRIGERA, P.R.; JEFFERY, E.D.; MARTIN, K.H.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; PARSONS, J.T. 2005. FAK phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *J. Cell Sci*. 118: 4931-4935.

GU, J.; TAMURA, M.; PANKOV, R.; DANEN, E.H.; TAKINO, T.; MATSUMOTO, K.; YAMADA, K.M. 1999. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J. Cell Biol*. 146: 389-403.

GUNTER, K.C.; MALEK, T.R.; SHEYACH, E.M. 1984. T cell activating properties of an anti-Thy-1 monoclonal antibody: possible analogy to OKT3/Leu4. *J Exp Med* 159: 716-730.

HAERYFAR, S.M.; AL-ALAWAN, M.M.; MADER, J.S.; ROWDEN, G.; WEST, K.A.; HOSKIN, D.W. 2003. Thy-1 signaling in the context of costimulation provided by dendritic cells provides signal 1 for T cell proliferation and cytotoxic effector molecule expression, but fails to trigger delivery of the lethal hit. *J Immunol*. 171: 69-77.

HAERYFAR, S.M.; HOSKIN, D.W. 2004. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol* 273: 3581-3588.

HALL, S. 2001. Nerve repair: a neurobiologist's view. *J. Hand Surg. [Br.]* 26: 129-136.

HAMELERS, I.H.; OLIVO, C.; MERTENS, A.E.; PEGTEL, D.M.; VAN DER KAMMEN, R.A.; SONNENBERG, A.; COLLARD J.G. 2005. The Rac activator Tiam1 is required for $\alpha3\beta1$ -mediated laminin-5 deposition, cell spreading, and cell migration. *J. Cell Biol*. 171: 871-881.

HANSSON, E.; RONNBACK, L. 2003. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J* 17: 341-348.

HE, H.T.; NAQUET, P.; CAILLOL, D.; PIERRES, M. 1991. Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca^{2+} -independent mechanism. *J Exp Med* 173: 515-518.

HERMOSILLA, T.; MUÑOZ, D.; HERRERA-MOLINA, R.; VALDIVIA, A.; SANG-UK, N.; SCHNEIDER, P.; BURRIDGE, K.; QUEST, A.F.G.; LEYTON, L. 2007. Direct Thy-1/Integrin α v β 3 interaction mediates neuron to astrocyte communication in a species independent-manner. *J.Biol.Chem.* in revision.

HERMOSILLA, T. 2005. Expresión regulada de Thy-1 modula el proceso de diferenciación neuronal en células PC12 y CAD. Tesis Doctorado en Cs Biomédicas. Santiago, Chile. U Chile, Fac. de Medicina. 111p.

HORNER, P.J.; GAGE, F.H. 2000. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407: 963-970.

HSIA, D.A.; MITRA, S.K.; HAUCK, C.R.; STREBLOW, D.N.; NELSON, J.A.; LLIC, D.; HUANG, S.; LI E.; NEMEROW, G.R.; LENG, J.; SPENCER, K.S.; CHERESH, D.A.; SCHLAEPFER, D.D. 2003. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J. Cell Biol.* 160: 753–767.

HUEBER, A.O.; PIERRES, M.; 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.

HUEBER, A.O.; RAPOSOS, G.; PIERRES, M.; HE, H.T. 1994. Thy-1 triggers mouse thymocyte apoptosis through a bcl-2-resistant mechanism. *J Exp Med* 179: 785-796.

HUGHES, P.E.; RENSHAW, M.W.; PFAFF, M.; FORSYTH, J.; KEIVENS, V.M.; SCHWARTZ, M.A.; GINSBERG, M.H. 1997. Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 88: 521–530.

HUTTENLOCHER, A.; SANBORG, R.R.; HORWITZ, A.F. 1995. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 7:697-706.

HYNES, R.O 2002. Integrins. Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673.

JESSEN K.R. 2004. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1861-1867.

JOHNSON, R.; LANCKI, D.; FITCH, F. 1993. Accessory molecules involved in antigen-mediated cytotoxicity and lymphokine production by cytotoxic T lymphocyte subset. *J Immunol* 151: 2986-2999.

KILLEEN, N. 1997. T-cell regulation: Thy-1 - hiding in full view. *Curr Biol* 7: R774-R777.

KIRYUSHKO, D.; BEREZIN, V.; BOCK, E. 2004. Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 1014: 140-154.

KIYOKAWA, E.; HASHIMOTO, Y.; KOBAYASHI, S.; SUGIMURA, H.; KURATA, T.; MATSUDA, M. 1998a. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12: 3331–3336

KIYOKAWA, E.; HASHIMOTO, Y.; KURATA, T.; SUGIMURA, H.; MATSUDA, M. 1998b. Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130Cas complex. *J. Biol. Chem.* 273.: 24479–24484

KLEMKE, R.L.; CAI, S.; GIANNINI, A.L.; GALLAGHER, P.J.; DE LANEROLLE, P.; CHERESH, D.A. 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* 137: 481–492

KORNBERG, L. J.; EARP, H. S.; TURNER, C. E.; PROCKOP, C.; JULIANO, R.L. 1991. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by integrin clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88. 8392-8396.

KOTTIS, V.; THIBAUT, P.; MIKOL, D.; XIAO, Z.C.; ZHANG, R.; DERGHAM, P.; BRAUN, P.E. 2002 .Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 82: 1566-1569.

LEYTON, L.; QUEST, A.F.G.; BRON, C. 1999. Thy-1/CD3 Coengagement promotes TCR signaling and enhances particularly tyrosine phosphorylation of the raft molecule LAT. *Mol Immunol.* 36: 755-768.

LEYTON, L.; SCHNEIDER, P.; LABRA, C.V.; RUEGG, C.; QUEST, A.F.; BRON, C. 2001. Thy-1 binds to Integrin beta (3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Curr Biol.* 11: 1028-1038.

MAHANTHAPPA, N. K.; PATTERSON, P. H. 1992. Thy-1 involvement in neurite outgrowth: perturbation by antibodies, phospholipase C and mutation. *Dev Biol* 150: 47-59.

MARIGNANI, P.A.; CARPENTER, C.L. 2001. Vav2 is required for cell spreading. *J. Cell Biol.* 154: 177–186.

MAYEUX-PORTAS, V.; FILE, S.E.; STEWART, C.L; MORRIS, R.J. 2000. Mice lacking the cell adhesion molecule Thy-1 fail to use socially transmitted cues to direct their choice of food. *Curr Biol* 10: 68-75.

McKENZIE, J.L.; FABRE, J.W. 1981. Human Thy-1: unusual localization and possible functional significance in lymphoid tissues. *J Immunol.* 126: 843-850.

McKEIRACHER, L. 1994. Identification of myelinaassociated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13: 805-811.

MIKI, H.; YAMAGUCHI, H.; SUETSUGU, S.; TAKENAWA, T. 2000. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*. 408: 732-735.

MITCHISON, T.J.; CRAMER, L.P. 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84:371-379.

MITRA, S.K.; HANSON, D.A.; SCHLAEPFER, D.D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 56–68

MIYAMOTO, S.; AKIYAMA, S. K.; YAMADA, K. M. 1995. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 267: 883-885.

MOISSOGLU, K.; SCHWARTZ, M.A. 2006. Integrin signalling in directed cell migration. *Biol Cell*. 98:547-55.

MOREAU-FAUVARQUE, C. 2003. The transmembrane semaphorin sema 4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J. Neurosci.* 23: 9229-9239.

MORRIS, R.J. 1985. Thy-1 in developing nervous tissue. *Dev Neurosci* 7: 1133-1160.

MORRIS, R. 1992. Thy-1, the enigmatic extrovert on the neuronal surface. *Bioessays*. 14:715-722.

MUKHOPADHYAY, G.; DOHERTY, P.; WALSH, F.S.; CROCKER, P.R.; FILBIN, M.T. 1994. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13: 757-767.

NISHIYA, N.; KIOSSES, W.B.; HAN J.; GINSBERG, M.H. 2005. An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol.* 7:343-352.

NOBES, C.D.; HALL, A. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: 53-62.

NOSTEN-BERTRAND, M.; ERRINGTON, M.L.; MURPHY, K.P.; TOKUGAWA, Y.; BARBONI, E.; KOZLOVA, E.D.; MORRIS, R.G.; SILVER, J.; STEWART, C.L.; BLISS, T.V.; MORRIS, R.J. 1996. Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking Thy-1. *Nature* 379: 826-829.

PARPURA V.; BASARSKY T.A.; LIU F.;JEFTINIJA K.; HAYDON P.G. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744-747.

PARSONS, J.T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 116: 1409–1416.

PASTI, L.; VOLTERRA, A.; POZZAN, T.; CARMIGNOTO G. 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17(20):7817-7830.

PEREA, G.; ARAQUE, A. 2002. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J Physiol Paris* 96: 199-207.

POLLARD, T.D.; BLANCHOIN, L.; MULLINS, R.D. 2000. Molecular mechanism controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 545-576.

POLLARD, T.D.; BORISY, G.G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112:453-65.

PORTER J.T.; McCARTHY K.D. 1996. Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16: 5073-5081.

RAHEMTULLA, N.; DESCHEPPER, C.F.; MAURICE, J.; MITTAL, B.; DAVID, S. 1994. Immunocytochemical and functional characterization of an immortalized type 1 astrocytic cell line. *Brain Res.* 642: 221-227.

REIF, A.E.; ALLEN, J.M.V. 1964. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J Exp Med.* 120: 413-433.

REIF, K.; NOBES, C.D.; THOMAS, G.; HALL, A.; CANTRELL, D.A. 1996. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol.* 6:1445-55.

RICHARDSON, P.M.; McGUINNESS, U.M.; AGUAYO, A.J. 1980. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature.* 284: 264-265.

RIDET, J.L.; MALHOTRA, S.K.; PRIVAT, A.; GAGE, F.H. 1997. Reactive astrocytes; cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* .20: 570-577.

RIDLEY, A.J.; HALL, A. 1992. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399.

RIDLEY, A.J.; PATERSON, H.F.; JOHNSTON, C.L.; DIEKMANN, A.; HALL, A. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70: 401-410.

RIDLEY, A.J. 2001a. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114: 2713-2722.

RIDLEY, A.J. 2001b. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11: 471-477.

ROUGON, G.; HOBERT, O. 2003. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Ann Rev Neurosci* 26: 207-238.

RUOSLAHTI, E. 1996. RGD and other recognition sequences for Integrins. *Ann Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.

SAALBACH, A.; HILDEBRANDT, G.; HAUSTEIN, U.F.; ANDEREGG, U. 2002. The Thy-1/Thy-1 ligand interaction is involved in binding of melanoma cells to activated Thy-1-positive microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 64: 86-93.

SAALBACH, A.; WETZEL, A.; HAUSTEIN, U.F.; STICHERLING, M.; SIMON, J.C.; ANDEREGG, U 2005. Interaction of human Thy-1 (CD90) with the Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. *Oncogene* 24: 4710-4720.

SCHALLER, M.D.; HILDEBRAND, J.D.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W.; VINES, R.R.; PARSONS J.T. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1680-1688.

SCHLAEPFER, D.D.; HANKS, S.K.; HUNTER, T.; VAN DER GEER, P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786-791.

SCHWARTZ M. A.; LECHENE C.; INGBER D. E. 1991. Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin $\alpha_5\beta_1$, independent of cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7849-7853.

SCHWARTZ, M.A.; ASSOIAN, R.K. 2001. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J. Cell Sci.* 114: 2553-2560.

SEEGER, R.C.; DANON, Y.L.; RAYNER, S.A.; HOOVER, F. 1982. Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J Immunol* 128: 983-989.

SHANKAR, S.; DAVISON, I.; MASON, W.T.; HORTON, M.A. 1993. Integrin receptor mediated mobilization of intranuclear calcium in rat osteoclasts. *J. Cell Sci.* 105: 61-68.

SIEG D.J.; HAUCK C.R.; SCHLAEPFER D.D. 1999. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.* 112:2677–2691.

SIMON, P.D.; McCONNELL, J.; ZURAKOWSKI, D.; VORWERK, C.K.; NASKAR, R.; GROSSKREUTZ, C.L.; DREYER, E.B. 1999. Thy-1 is critical for normal retinal development. *Brain Res Dev Brain Res.* 117: 219-223.

SOARES, H.D.; CHEN, S.C.; MORGAN, J.I. 2001. Differential and prolonged expression of Fos-lacZ and Jun-lacZ in neurons, glia, and muscle following sciatic nerve damage. *Exp. Neurol.* 167: 1-14.

STEPHENS, L.; ELLSON, C.; HAWKINS, P. 2002. Roles of PI3-Ks in leukocytes chemotaxis and phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 203-213.

STOKER, M.; O'NEILL, C.; BERRYMAN, S.; WAXMAN V. 1968. Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int. J. Cancer.* 3: 683-693.

TAWIL, N.J.; WILSON, P.; CARBONETTO, S. 1994. Expression and distribution of functional Integrins in rat CNS glia. *J Neurosci Res.* 39: 436-447.

TIVERON, M.C.; BARBONI,E.; PLIEGO, F.B.; GORMLEY, A.M.; SEELEY, P.J.; GROSVELD, F.; MORRIS, E.J. 1992. Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by Thy-1 glycoprotein. *Nature* 335: 745-748.

TIVERON, M.C.; NOSTEN-BERTRAND, M.; JANI, H.; GARNETT, D.; HIRST, E.M.; GROSVELD, F.; MORRIS, R.J. 1994. The mode of anchorage to the cell surface determines both the function and the membrane location of Thy-1 glycoprotein. *J. Cell Sci* 107: 1783-1796.

TSUJI, T.; ISHIZAKI, T.; OKAMOTO, M.; HIGASHIDA, C.; KIMURA, K.; FURUYASHIKI, T.; ARAKAWA, Y.; BIRGE, R.B.; NAKAMOTO, T. HIRAI, H.; 2002. ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 157: 819–830.

VALLES, A.M.; BEUVIN, M.; BOYER, B. 2004. Activation of Rac1 by paxillin–Crk–DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells. *J. Biol. Chem.* 279: 44490–44496.

VOLTERRA, A.; MELDOSI, J. 2005 Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6: 626-640.

WALKER, J.L.; ASSOIAN, R.K. 2005. Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Rev.* 24:383-393.

WANG, K.C.; KIM, J.A.; SIVASANKARAN, R.; SEGAL, R.; HE, Z. 2002. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420: 74-78.

WEBB, D.J.; DONAIS, K.; WHITMORE, L.A.; THOMAS, S.M.; TURNER, C.E.; PARSONS, J.T.; HORWITZ, A.F. 2004. FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6: 154–161.

WEST, K.A.; ZHANG, H.; BROWN, M.C.; NIKOLOPOULOS, S.N.; RIEDY, M.C.; HORWITZ, A.F.; TURNER, C.E. 2001. The LD4 motif of paxillin regulates cell spreading and motility through an interaction with paxillin kinase linker (PKL). *J Cell Biol.* 154: 161-176.

WETZEL, A.; CHAVAKIS, T.; PREISSNER, K.T.; STICHERLING, M.; HAUSTEIN, U.F.; ANDEREGG, U.; SALBAACH, A. 2004. Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol* 172: 3850-3859.

XING, Z.; CHEN, H.C.; NOWLEN, J.K.; TAYLOR, S.J.; SHALLOWAY, D.; GUAN, J.L. 1994. Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol. Biol. Cell* 5: 413–421.

YOSHII, S.; TANAKA, M.; OTSUKI, Y.; WANG, D.Y.; GUO, R.J.; ZHU, Y.; TAKEDA, R.; HANAI, H.; KANEKO, E.; SUGIMURA, H. 1999. α PIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 18: 5680–5690.