

## MODELANDO EL CRECIMIENTO DE NEURITAS

Oscar Ávila<sup>1</sup>, Damián Hernández<sup>1</sup>,  
Rafael A. Barrio<sup>1</sup> y Limei Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Física, UNAM. Apdo. Postal 20-364, México 01000, D.F.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, UNAM, México 04510, D.F. E-mail: barrio@fisica.unam.mx

### RESUMEN

El funcionamiento adecuado del sistema nervioso de un organismo, aun desde su estado embrionario, requiere que las neuronas establezcan conexiones específicas con otras neuronas o tejidos. Dado que una red neuronal contiene un número inmenso de neuronas, encontrar el camino correcto para cada una de ellas es claramente un fenómeno complejo, en el que participan muchos procesos. En este artículo estudiamos el crecimiento de neuritas *in vitro*, y nos enfocamos en los efectos que tienen diversos factores químicos en el medio de cultivo. Construimos un modelo teórico para explicar las diferencias encontradas en medios químicos diferentes. Simulaciones numéricas reproducen las observaciones y permiten predecir la forma como actúan diversas sustancias químicas en el crecimiento y la conexión de neuritas.

**Palabras Clave:** Cultivos de células, difusión anómala, guías de axones, patrones de Turing, redes de neuronas.

### ABSTRACT

The correct functioning of the nervous system, even from early embryo stages, requires that neurons establish specific connections with other neurons or tissues. Since a neuronal network consists of an enormous number neurons, finding the correct pathway for each one of them clearly constitutes a problem of morphogenesis. In this article we study experimentally neurite growth using various culture media, and construct a theoretical model to explain the experimental results. Numerical simulations reproduce the observations and allow to predict the existence and functioning of chemicals which are important in neurite growth and guidance to attain connections.

**Key Words:** Cell culture, anomalous diffusion, axon guidance, Turing patterns, neuronal network.

### INTRODUCCIÓN

**E**l funcionamiento correcto del sistema nervioso depende de la habilidad con la que las neuronas puedan conectarse con blancos específicos durante el desarrollo del embrión. En cada neurona crecen neuritas, que deben encontrar trayectorias viables hacia objetivos espacialmente específicos, ya sea con otras neuronas, como en el sistema nervioso central, o con otros tejidos. El problema de empaquetamiento de neuronas, axones y neuritas no ha sido resuelto y existe un gran interés en la investigación de este tema. Físicamente es muy difícil imaginar una red altamente conexas, como lo requiere el entramado cerebral, en un volumen tan pequeño. Un estudio de este fascinante tema topológico se puede consultar en la Ref. [1].

Aun cuando existen varios tipos de neuronas que difieren en detalles estructurales, dependiendo de su función, la mayor parte de ellas comparten características comunes. Una neurona tiene un cuerpo relativamente grande, que contiene un núcleo con material genético y una variedad de otros organelos celulares. Además, las neuronas tienen extensiones fibrilares que sirven para transportar información a otros lugares.

Se observa que en algún momento del desarrollo de una neurona, del cuerpo celular crecen una o varias neuritas que exploran la vecindad en busca de un blanco para conectarse. Posteriormente una neurita se puede diferenciar en un axón o una dendrita. En la punta de una neurita está el cono de crecimiento<sup>2</sup>, que como su nombre lo indica, es una estructura que le sirve de guía durante su crecimiento. Con la polimerización de cadenas de actina se producen protuberancias del cono de crecimiento llamadas

Nota: Artículo recibido el 05 de marzo de 2007 y aceptado el 08 de junio de 2007.

filopodia. Las filopodia se van adhiriendo al sustrato en el que crecen, “palpando” el espacio por el que la neurita crece.

Durante el crecimiento varias reacciones intracelulares se desatan, resultando en la polimerización de tubulina en la neurita y la adición de más membrana celular proveniente del cuerpo de la célula. Actualmente se admite que estos procesos son provocados por varias moléculas que sirven de guía, algunas atraen al cono, mientras que otras lo repelen.

Las moléculas guía pueden estar fijas en el sustrato (por ejemplo en un músculo sobre el que la neurona crecería) o pueden ser secretadas por una célula blanco, que señala así su posición a distancia debido a la difusión de la sustancias guía en el medio. El cono de crecimiento es capaz de percibir gradientes de concentración y seguir la dirección de mayor o menor concentración.

Existen varios modelos matemáticos que intentan reproducir la dinámica de los conos de crecimiento. El cono normalmente se representa con un autómata celular, el cual puede seguir la pista de un gradiente de concentración de alguna molécula. En los modelos se tienen neuronas blanco que secretan moléculas guía, que son reconocidas por la neurona que crece. A su vez, ésta también puede secretar moléculas guía. El cono las percibe y crece hacia la célula blanco. Los resultados de simulaciones numéricas usualmente muestran trayectorias rectas, debido a que las señales se propagan por difusión simple en el medio. Pero esto no corresponde a lo observado.

Los caminos seguidos por las neuritas son en general intrincados, y de ninguna manera rectos. La topología depende del tejido, el tipo de neurona y de muchos otros factores, como es de esperarse en un sistema con múltiples funciones diferentes. Para poder estudiar este fenómeno complejo, generalmente se hacen observaciones en cultivos de neuronas *in vitro*, en los cuales se regulan algunas variables para observar los cambios en el crecimiento de neuritas bajo diversas condiciones de cultivo.

En general se observa que en un cultivo ideal (en el que no hay restricciones para el crecimiento) las células crecen muchas neuritas y se conectan radialmente, en forma casi recta prácticamente con todas las demás. Una vez que se conectan, las neuronas empiezan a pulsar, las conexiones que son redundantes mueren y al final se obtiene una red muy parecida a la observada en el tejido *in vivo*. Sin embargo, si se restringen ciertas sustancias durante el crecimiento (de aquí en adelante las llamaremos nutrientes), las neuronas crecen en un número relativamente bajo de neuritas y no se conectan “todas contra todas”. Aún más sorprendente es el hecho que las trayectorias de las neuritas no son rectas. Esto es interesante y sorprendente, ya que se esperaría que ante condiciones adversas al crecimiento, la neurita debería seguir trayectorias rectas, que ahorren la cantidad de masa y energía, y evitar una posible muerte antes de conectarse

al blanco predeterminado. La energía gastada para crecer material es considerable, y como en todos los sistemas biológicos, debe existir un mecanismo que permita la supervivencia del organismo, aun en condiciones adversas.

Nuestro propósito y motivación es estudiar este mecanismo, por lo que diseñamos un experimento *ex profeso* en el que cultivamos neuronas en medios adversos al crecimiento. Reconocemos que los factores de crecimiento y los nutrientes son sustancias que favorecen el crecimiento sano y normal de las neuritas. Por consiguiente, escogimos dos medios que difieren substancialmente, y observamos su comportamiento. Corroboramos las observaciones publicadas por otros autores en las que las neuronas en el medio adverso crecen con trayectorias sinuosas.

Estas observaciones pueden explicarse si se supone que los químicos que secretan las neuronas, además de difundirse, reaccionan en el medio. Bajo condiciones generales adecuadas se pueden producir patrones espaciales estacionarios en las concentraciones de los químicos por mecanismo de Turing<sup>3</sup>.

Este patrón espacial podría ser detectado por los conos de crecimiento si la neurona blanco secreta un tercer químico que se difunda preferencialmente en las regiones donde la concentración de una de las sustancias que forman el patrón espacial sea abundante. Estos caminos químicos funcionarían como guías para encontrar las células blanco, que en general no son rectos. La difusión preferencial es posible si una de las sustancias que forman el patrón espacial reacciona con la sustancia guía produciendo un compuesto inerte, de forma que su concentración en equilibrio dinámico sólo sea detectable en los caminos dictados por el patrón espacial. En un medio donde no existan restricciones en las sustancias que producen el crecimiento, la existencia de un patrón espacial no sería importante, puesto que existiría suficiente cantidad de sustancia guía como para que la reacción secundaria no disminuya la concentración a niveles no detectables por el cono, y como consecuencia la difusión sería normal produciéndose trayectorias más rectas. Cuando se tiene una red con miles de millones de neuronas, la interferencia de las trayectorias de las neuritas puede ser un gran problema, que se solucionaría con los caminos prediseñados por estos patrones espaciales. En este artículo presentamos un modelo que capta todas estas ideas y que reproduce cualitativamente las observaciones experimentales.

A continuación presentaremos algunos hechos básicos de la fisiología de las neuronas, necesarios para apreciar y justificar con claridad nuestros experimentos y nuestro modelo.

## LA FISIOLÓGIA DEL SISTEMA NERVIOSO

En un tejido nervioso maduro las *neuritas* son de dos tipos: Las dendritas que llevan la información del exterior hacia el cuerpo, y los axones, que llevan mensajes hacia afuera. En las etapas

embrionarias las neuritas no se distinguen entre axones y dendritas, ya que aún no adquieren una función específica.

En la punta de una neurita está el cono de crecimiento, que es una estructura altamente sensible que le permite orientarse durante el crecimiento para conectarse con su objetivo. Los mecanismos de orientación pueden ser complicados, como: acelerar o frenar la migración, pausar el crecimiento, colapsar, retraer y bifurcar su camino. Estas conductas le permiten, sin duda, encontrar el camino hacia el blanco adecuado.

En la Fig. 1 se muestra un esquema del cono de crecimiento.

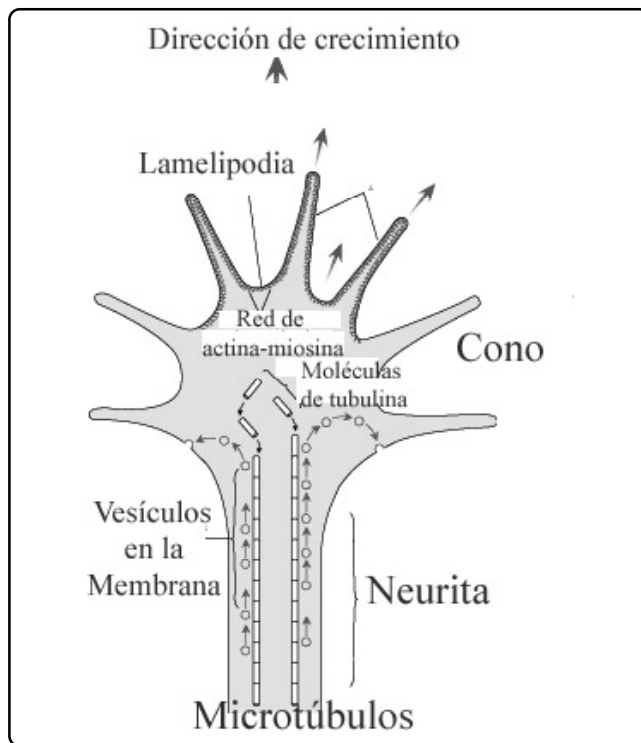


Figura 1. Esquema de las partes del cono de crecimiento.

El cono de crecimiento está dividido en dos partes, el dominio central y el periférico, determinados básicamente por sus componentes. El dominio periférico es rico en filamentos de actina unidos en grupos de filamentos paralelos. Éstos están en continuo movimiento, creciendo o retrayéndose por medio de la polimerización o depolimerización de monómeros de actina. Si los filamentos salen del cono de crecimiento como si fueran dedos, se les conoce como filopodios, o si no, se les llaman costillas (por su nombre en inglés "ribs"). Entre los filopodios existe una red de actina que puede avanzar mediante la adhesión con el medio externo. A esta red se le conoce como lamelipodia.

La activación de cierto tipo de moléculas motoras, las miosinas, situadas en la membrana del cono de crecimiento, puede atraer los filopodios hacia el dominio central del cono, causando así un

movimiento retrógrado que culmina con el avance del cono hacia adelante. El dominio central del cono de crecimiento es rico en microtúbulos y organelos de membrana. Los microtúbulos están orientados con su terminación positiva hacia el dominio periférico y forman la estructura del citoesqueleto por la cual se lleva a cabo el transporte vesicular rápido. La entrega de vesículas al cono de crecimiento es necesaria para el abastecimiento de material de membrana adicional para el crecimiento de la neurita, así como de diferentes receptores en la membrana<sup>4</sup>.

Para encontrar el camino correcto hacia su destino, el cono de crecimiento debe reconocer las señales presentes en el medio. Hasta la fecha se han logrado encontrar varias familias de moléculas que intervienen de varias formas para guiar al cono de crecimiento<sup>5-8</sup>. La mayor parte de los mecanismos moleculares para la guía de neuritas se puede clasificar en tres grupos, sin embargo, cierto número de moléculas guía puede tomar diferentes papeles, dependiendo de las circunstancias. Los tres grupos de moléculas son permisivos o inhibitorios, atractivos o repulsivos y por contacto o difusibles.

1) Permisivos o inhibitorios: Una de las formas más simples para dirigir neuritas en crecimiento a través de caminos específicos se logra expresando moléculas en patrones tridimensionales. Estos patrones etiquetan ciertas partes del medio como permisible para el crecimiento y otras partes como inhibitorio para el crecimiento. Así, el crecimiento de la neurita puede llevarse a cabo por un camino angosto restringido por moléculas inhibitorias.

2) Atractivos o repulsivos: Este tipo de moléculas es eficiente para guiar neuritas cuando está presente en un gradiente de concentración, proporcionando una señal vectorial para que la neurita se mueva en una dirección u otra, en un proceso conocido como quimiotaxis. Esta puede ser positiva (atractiva) o negativa (repulsiva). De esta forma, una molécula secretada por un blanco para la neurita genera un gradiente de concentración debido a su difusión en el medio, el cual puede dar información al cono sobre la localización del blanco.

3) Por contacto o difusibles: Otro tipo de moléculas guía están fijas en el sustrato, por ejemplo, expresadas en la membrana de otras células o fijas en la matriz extracelular (MEC). En este caso, el cono de crecimiento tiene que mantenerse en contacto directo con el tejido en cuestión. Hasta la fecha se han identificado cuatro grupos de moléculas guía así como sus receptores. Varias de las moléculas no actúan por sí solas sino en conjunto con otras de otros grupos.

Dentro de las moléculas guía que se han podido identificar, está el grupo de las netrinas<sup>9</sup>, el grupo de las efrinas<sup>10,11</sup>, el grupo de las semaforinas, y el grupo de las slit<sup>12</sup>, con su receptor Robo. Además de estos grupos de proteínas, también se ha descubierto que los nucleótidos cíclicos intervienen en la guía de neuritas. Actualmente se han encontrado evidencias

de que además de las moléculas tradicionales de guía (netrinas, efrinas, semaforinas y slit), otros grupos de moléculas actúan en conjunto con éstas.

Los otros grupos de proteínas son bien conocidas por su papel como morfógenos y cada vez es más evidente que reaccionan con el cono de crecimiento. Los morfógenos son proteínas producidas y secretadas por un grupo restringido de células. Estas proteínas inducen diferentes respuestas en las células, dependiendo de sus concentraciones. Los morfógenos se unen a receptores específicos para desatar cascadas químicas intracelulares, que controlan la transcripción de ciertos genes y así influir en el comportamiento de las células.

De acuerdo con esta definición, miembros de las familias de hedgehog (Hh)<sup>13,14</sup>, wingless (Wnt)<sup>15</sup>, factor de crecimiento transformante (TGF) y, más recientemente, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) parecen actuar como morfógenos en contextos específicos<sup>16</sup>. En el sistema nervioso central de los vertebrados se conocen algunos ejemplos de estas moléculas. Las Wnts, forman patrones en la placa neural a través del eje anteroposterior. Las proteínas morfogénicas del hueso (BMP por su nombre en inglés) y el sonic hedgehog (Shh), especifican la identidad neural a lo largo del eje dorsoventral en todo el tubo neural. Estudios que implican a las Shh, BMP y Wnt controlando el movimiento de los conos de crecimiento, han sido la base para creer que estas moléculas no actúan como guías.

Hemos mencionado que experimentos anteriores han mostrado que la morfología de la neurona cambia de acuerdo al medio en el que crece, pero no existen hipótesis ni modelos que investiguen este punto. Por esta razón hemos efectuado una serie de experimentos enfocados a verificar las condiciones que cambian la morfología de las conexiones.

## MÉTODOS EXPERIMENTALES

Realizamos experimentos en los que cultivamos neuronas de ratas Wistar recién nacidas, con el objeto de observar la morfología de crecimiento de las neuronas como función de la composición del medio en el que fueron cultivadas. Se prepararon dos medios distintos que simulan condiciones favorables y desfavorables para el crecimiento de dendritas. De aquí en adelante nos referiremos al medio favorable como “medio rico”, y consecuentemente al otro como “medio pobre”.

La diferencia en los medios es el recubrimiento del sustrato de crecimiento para neuronas en cultivo. Para el medio pobre se utilizó una capa de Poli-L-lisina (PLL) y para el medio rico, Matrigel. Ambos recubrimientos favorecen la adhesión celular, indispensable para la sobrevivencia de neuronas en un cultivo primario. El piso de las cajas de cultivo está cargado negativamente como consecuencia del tratamiento de plasma del poliestireno, y los polímeros de lisina de la PLL cambian la carga a positiva, lo que favorece no sólo la adhesión celular, sino que facilita la

absorción de serum y otras proteínas extracelulares. El sustrato de PLL provee las condiciones mínimas para la supervivencia de las células.

Matrigel es el nombre comercial de una mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por células tumorales del sarcoma del ratón Engelbreth-Holm-Swarm. Esta sustancia no sólo promueve la adhesión celular, sino que contiene el complejo extracelular de muchos tejidos, que favorecen el crecimiento, en particular nutrientes y factores de crecimiento.

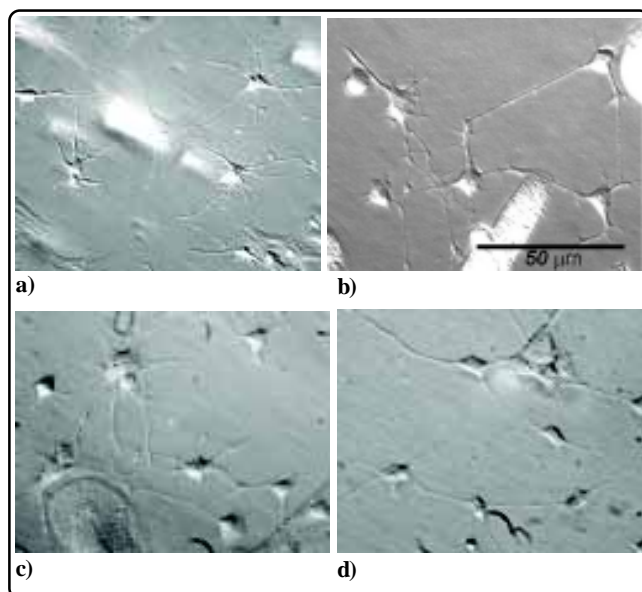
Se obtuvieron neuronas de cerebelo y estriado de ratas *Wistar* de tres días de vida, a través de disociación mecánica. La solución del medio de cultivo fue de sal balanceada de Hank (Gibco Cat. 14185-052) con suplementos de suero de albúmina bovina.

Para cada tipo de neurona se fijaron dos condiciones experimentales: cultivos con medio pobre en nutrientes (PN) y cultivos con medio rico en nutrientes (RN). Para el PN se recubrieron cajas de Petri con pozos para cultivos con Poli-L-lisina (Sigma Cat. P5899-5MG), (mol. Wt 30,000-70,000). Para el RN se utilizaron las mismas cajas de cultivo recubiertas con Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Cat. 356234). Matrigel contiene componentes de base de membrana (colágenos, laminina y proteoglicanos) y también tiene enzimas degradadoras de matriz, sus inhibidores y factores de crecimiento.

Las células se colocaron en las cajas mencionadas a una densidad aproximadamente de 500,000/0.5ml con Neurobasal (Invitrogen Cat. 21103049) suplementado con B-27 (Gibco Cat. 10889-038), 100U/ml de penicilina y 100U/ml de estreptomycin. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora humectante a 37°C dentro de un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada tres días, y se sostuvo por dos semanas, ya que en este tiempo se puede observar un crecimiento neurítico abundante y firme. Nunca inhibimos el crecimiento de células no neuronales, ya que las células gliales favorecen la formación normal del tejido neural.

El mismo tipo de neurona crece en forma diferente en cada uno de los sustratos. En la Fig. 2 se muestra un ejemplo del crecimiento de neuritas de dos tipos de neuronas en dos sustratos diferentes. Observe que la densidad de células no corresponde a la densidad de sembrado, ya que muchas células sembradas no sobreviven en el cultivo. Esto depende mucho del recubrimiento, el medio, el tipo de tejido neural y la frecuencia de cambio del medio.

Se puede observar que en el RN, las neuronas están conectadas entre sí de una forma casi recta, mientras que en el PN, los patrones de conexión entre neuronas presenta formas más sinuosas. Estas observaciones son contrarias al comportamiento que se esperaría si uno considera que en un medio pobre se deberían de ahorrar recursos de masa y energía.



**Figura 2. Neuritas creciendo:** (a) neuronas de cerebelo en medio pobre (PN). (b) neuronas de cerebelo en medio rico (RN). (c) neuronas del estriado en PN y (d) neuronas del estriado en RN. La escala indicada es la misma para todas las imágenes.

Se podría inferir lógicamente que, si el crecimiento significa un esfuerzo grande para la célula, gastando energía y materia, en el PN las neuritas deberían ser lo más rectas posibles para minimizar la energía y materia que se consume durante el proceso de crecimiento. Por otra parte, en el RN las consideraciones del ahorro de energía no son importantes y por esa razón las neuritas pueden crecer sinuosamente sin peligro de morir de inanición.

Estos hechos necesitan explicación. Propondremos un modelo cuya hipótesis central es que los meandros son una señal de la existencia de caminos químicos que las neuritas pueden seguir. De esta forma se asegura que eventualmente serán conectadas a otras neuronas sin el riesgo de morir en el camino. Más específicamente, proponemos que las moléculas señalizadoras se difunden de forma diferente dependiendo de la concentración de alguna sustancia que forma los caminos químicos. Para esto se necesita postular la existencia de un patrón espacial de concentraciones químicas.

## EL MODELO TEÓRICO

Nuestro modelo se divide entonces en dos partes, la formación de un patrón espacial químico que sirva como un “viaducto” por el que las neuritas puedan crecer y la difusión preferencial de una sustancia guía sobre estos patrones.

La primera parte puede justificarse si las sustancias que guían al cono de crecimiento, además de difundirse reaccionan químicamente, de forma que un patrón espacial de concentraciones se forme de manera estacionaria y estable. De esta forma se obtiene información posicional precisa.

La forma más simple de obtener un patrón espacial es proponiendo un sistema de reacción-difusión que presente una bifurcación de Turing<sup>3</sup> con sólo dos morfógenos con concentraciones  $u$  y  $v$ . Esta bifurcación se conoce con el nombre de “inestabilidad provocada por la difusión”. Los patrones de Turing se han utilizado en años recientes para modelar numerosos sistemas biológicos.

La segunda parte del modelo tiene que ver con los mecanismos por los que el cono de crecimiento puede ser guiado a través de estos caminos químicos para alcanzar su blanco.

Con este propósito proponemos la existencia de una tercera sustancia  $W$  que debe ser secretada por la neurona blanco y que anuncia su disponibilidad para conectarse. Esta sustancia actúa como guía y es responsable de desencadenar la cascada de reacciones dentro del cono de crecimiento que resulten en su desplazamiento, tales como la adición de tubulina y material de membrana.

La difusión de  $W$  debe ser selectiva, en el sentido que sólo se lleve a cabo en regiones de alta concentración de uno de los morfógenos que formen el patrón. Esto es posible si  $W$  interactúa en forma diferente con los otros dos químicos, por ejemplo, puede ser que sólo la sustancia  $V$  reaccione químicamente con  $W$  produciendo una sustancia inerte, y en consecuencia la concentración de esta sustancia ( $w$ ) es pequeña en regiones donde  $v$  es grande y por lo tanto la difusión, que es un fenómeno de largo alcance, se llevará a cabo en las regiones de alta  $u$ , donde  $w$  no se pierda. Obviamente, si  $w$  es lo suficientemente grande,  $W$  se difundirá por todas las regiones, ya que  $V$  no puede eliminar eficientemente a  $W$ , haciendo que la existencia del patrón no sea importante. En este caso las trayectorias del cono podrán ir directamente a la fuente de  $W$ , sin seguir los caminos impuestos por el patrón.

## Modelo de formación de un prepatrón

En esta sección describimos el modelo específico para generar el patrón espacial de químicos. Éste servirá para formar caminos para guiar a las neuritas en crecimiento. Los químicos deberán ser producidos por las neuronas. Supóngase que hay dos neuronas  $A$  y  $B$  que se deben conectar entre sí. La neurona  $A$  es la neurona blanco y desde la neurona  $B$  crecen las neuritas hacia el blanco.

Una posibilidad es que la neurona  $A$  secrete un químico  $U$  que se difunda y reaccione con otro químico  $V$ , secretado por la neurona  $B$ . Otra posibilidad es que las dos neuronas secreten tanto  $U$  como  $V$ . En cualquiera de los dos casos, la dinámica de los químicos puede ser descrita por ecuaciones de reacción-difusión, ya que se supone que los químicos son secretados al medio por fuentes cerca del cuerpo neuronal y éstos reaccionan entre sí.

Existen varios modelos de este tipo que pudieran ser utilizados, sin embargo, dada la ausencia de datos suficientes para construir la cinética de reacción para el problema, escogimos uno de los más simples que satisfacen las necesidades de los dos casos antes mencionados. Éste se conoce como el modelo de Gray-Scott<sup>17</sup>, el cual es un ejemplo de un sistema de inhibidor-activador con una cinética relativamente simple. De cualquier forma, se deben tomar en cuenta todos los datos experimentales para dar sentido a los parámetros introducidos. Las ecuaciones son las siguientes:

$$\begin{aligned}\frac{\partial u}{\partial t} &= D\delta\nabla^2 u - uv^2 + F(1-u) + A(n_1) + B(n_2), \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= \delta\nabla^2 v + uv^2 - (F+k)v,\end{aligned}\quad (1)$$

Donde  $u$  y  $v$  son las concentraciones de las sustancias mencionadas, las cuales actuarán eventualmente como moléculas del tipo activador-inhibidor durante el crecimiento de la neurita.  $D = D_u/D_v$  es la razón de los coeficientes de difusión, la cual deberá ser diferente de uno para que se cumplan los requisitos para la inestabilidad de Turing. La constante  $\delta$  proporciona una escala de longitud y los parámetros  $F$  y  $k$  son las tasas para las reacciones químicas. Éstas son:



donde  $P$  es un producto inerte de la reacción. De esta forma, el sistema puede ser descrito por dos especies,  $F$  y  $k$  son los parámetros de reacción. La mayor parte de los modelos de Turing forman puntos o rayas. El modelo de Gray-Scott ha sido estudiado exhaustivamente y los valores de  $D$  para los cuales aparecen inestabilidades de Turing son bien conocidos, así como los valores en los que aparecen puntos o rayas<sup>18</sup>. Existen también condiciones en las cuales aparecen patrones de laberintos y frentes de onda oscilantes. Para nuestros propósitos escogimos una región en el espacio de parámetros en la cual aparecen tanto puntos como rayas, de tal forma que uno de los morfógenos percola el espacio.

Hemos realizado simulaciones numéricas en dominios sobre un plano bidimensional de diferentes tamaños y con dos condiciones a la frontera, ya sea periódica o de flujo cero. Los patrones son sumamente estables, aun con la presencia de ruido.

En la Fig. 3 presentamos el proceso de formación de un patrón utilizando los parámetros:  $k=.0635$ ,  $F=.04$ ,  $\delta=.05$  y  $D=2$ . Observe que los patrones se forman rápidamente y el domino se cubre con pocas interacciones de tiempo. Después toma más tiempo para que la configuración se estabilice, debido a la relajación de los defectos. Las condiciones iniciales se escogieron aleatoriamente alrededor del punto  $(u_0, v_0) = (0.5, 0.5) \pm 0.01$  en una malla de 120 por

120 puntos. Para simular la posición de las neuronas, escogimos 10 lugares que actúan como fuentes del morfógeno  $U$ , responsable de la señalización. Las fuentes son simuladas añadiendo un término constante ( $A=+0.01$ ) a la primera de las ecuaciones 1. Esto es análogo a considerar un campo externo en algún lugar que mantiene el valor del campo constante, como un momento dipolar en un campo magnético externo. Existen otras 10 neuronas que actúan como sumideros de  $U$ , lo cual se logra añadiendo un término negativo ( $B=0.02$ ). La posición de las neuronas es escogida al azar.

En todas las simulaciones usamos un método simple de Euler para integrar en el tiempo, se tuvo cuidado de escoger un paso de tiempo  $\Delta t$  lo suficientemente pequeño para evitar fluctuaciones numéricas.

Queda por justificar el uso de un modelo tan simple, sin embargo, prácticamente todas las conclusiones de este trabajo son independientes del modelo de reacción química usado. Casi todos los sistemas de Turing producen los mismos tipos de patrones, lo importante es que la reacción química real debe garantizar la percolación espacial de uno de los morfógenos.

### Modelo de crecimiento

Una vez que se forma el patrón espacial, se supone que las neuronas blanco  $A$  secretan un tercer químico  $W$ , el cual actúa como molécula atractiva de largo alcance. La difusión de  $W$  obedece a la ecuación de Fick:

$$\frac{\partial w}{\partial t} = D_w \nabla^2 w \quad (3)$$

El punto clave es que la difusión es diferente dependiendo de la cantidad de nutrientes a disposición en el medio. Si la cantidad de nutrientes es alta, la concentración de la sustancia guía  $w$  es muy grande y la difusión domina sobre la reacción química que elimina a  $W$ , mientras que si no hay suficiente cantidad de nutrientes hay poca producción de  $W$  y la reacción química domina sobre la difusión. Dado que se supone que el patrón químico está inmerso en un medio diluido que contiene varias sustancias, la presencia de éste puede ser sentida por  $W$  con una susceptibilidad dependiente de la dilución.

Si la cantidad de nutrientes es suficientemente grande, el hecho de que haya regiones en el patrón donde la sustancia inhibidora predomina, no es importante y la difusión de  $W$  se puede llevar a cabo por todo el dominio, ya que  $W$  sobrevive aún en regiones con concentraciones grandes de inhibidor. Por otro lado, cuando la cantidad de nutrientes es baja, el patrón elimina la existencia de  $W$  en las regiones con alta concentración de inhibidor, y por lo tanto las moléculas  $W$  sólo se difundirán en regiones donde haya poco inhibidor. Las regiones con concentración grande de inhibidor deben considerarse como barreras para la difusión de  $W$ . El problema para encontrar la distribución en equilibrio de  $W$

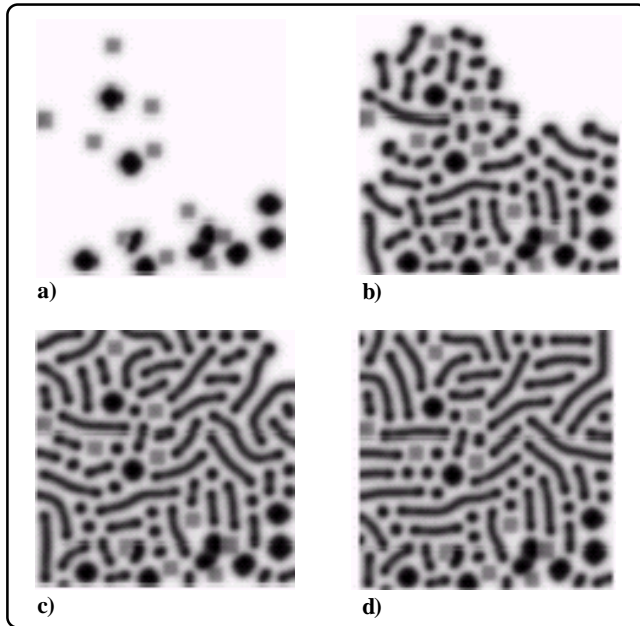


Figura 3. Patrón bidimensional obtenido con  $k=0.0635$ ,  $F=0.04$ ,  $\delta=0.05$  y  $D=2$  con condiciones de flujo cero. (a) Configuración inicial, (b) después de 5000, (c) 10000, y (d) 2 850 000 pasos de tiempo. Hay diez fuentes morfógeno U (círculos negros) y un número igual de sumideros (cuadros grises).

se reduce a resolver la ecuación de Laplace en un dominio complejo.

En la Fig. 4 presentamos la difusión de  $w$  desde una fuente escogida en la Fig. 3. Note la diferencia entre los dos escenarios: en un medio pobre en nutrientes  $W$  se difunde sólo sobre las áreas de alta concentración de  $u$ , mientras que en un medio rico en nutrientes  $W$  se difunde en forma radial por todo el dominio. La constante de difusión  $D_w$  se escogió 10 veces más pequeña que  $D_u$ .

El modelo ahora se completa haciendo una suposición universalmente aceptada, que los conos de crecimiento tienen sensores que le permiten medir el gradiente de las sustancias guía. Existen en la literatura modelos apegados a los datos biológicos que permiten al cono orientarse en la dirección de máximo gradiente y entonces crecer en esa dirección. Sin embargo, para nuestros propósitos, un modelo más simple basta. Un pixel determina la posición del cono en cada tiempo, y por un proceso de autómatas celulares se mide en cada paso la concentración  $w$  en cada uno de los pixeles vecinos, y entonces la posición del autómatas cambia hacia el sitio vecino que tiene mayor  $w$  desplazando la punta del cono a ese lugar. De esta forma se diseña un programa numérico simple que consiste en escoger una neurona blanco (la fuente de  $W$ ) y proceder con el crecimiento de dendritas que siguen los caminos hasta alcanzar el blanco.

En la Fig. 5 mostramos los resultados de ese cálculo numérico

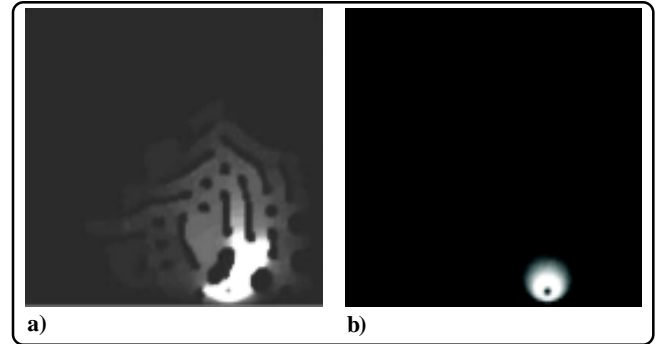


Figura 4. (a) Concentración estacionaria de  $W$  después de difundirse en un medio pobre desde una sola fuente. (b) Lo mismo en un medio rico. Observe que el patrón de la Fig. 3 se percibe en (a) pero no en (b).

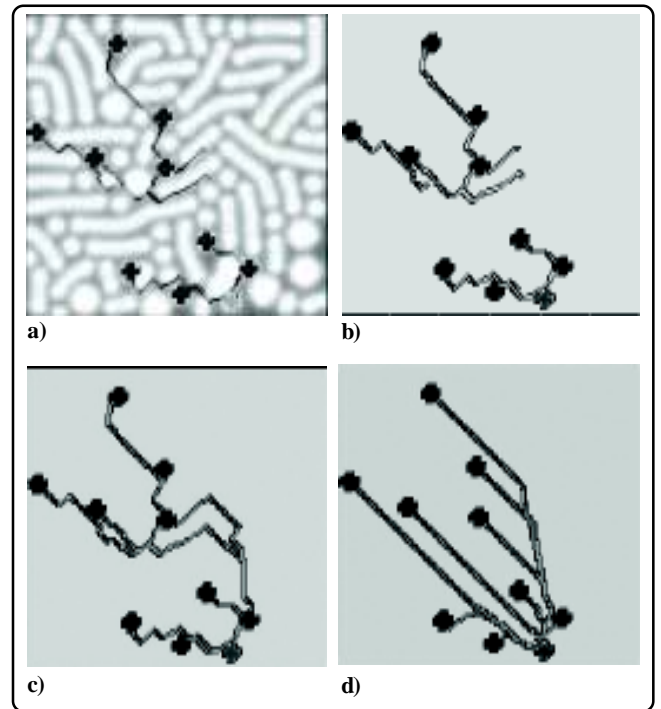


Figura 5. Crecimiento de neuritas simulado por un autómatas celular. (a) Trayectorias seguidas en un medio pobre en nutrientes que siguen los caminos en que los valores de  $u$  son altos. El patrón de Turing se muestra también. (b) Lo mismo que en (a) pero sin mostrar el patrón. (c) Estado final de crecimiento cuando todas las neuritas alcanzan el blanco. (d) Lo mismo que en (c), pero en un medio rico. Observe que las trayectorias son más rectas que en el medio pobre.

usando el mismo dominio que el de la Fig. 3. Note que cuando el medio es pobre las trayectorias aparecen sinuosas, ya que siguen los caminos químicos dictados por el patrón, mientras que en el medio rico en nutrientes, como en la Fig. 3(d), la susceptibilidad de  $W$  hacia el patrón de  $U$  es pequeña, y entonces el blanco se alcanza directamente, en correspondencia con las observaciones experimentales.



## DISCUSIÓN Y COMPARACIÓN CON EL EXPERIMENTO

En el ejemplo mostrado en la Fig. 5 mantuvimos todos los parámetros constantes así como un solo patrón de Turing de referencia. Esto se hizo para presentar los resultados en forma clara y simple. Sin embargo, realizamos numerosos cálculos numéricos, que no mostramos porque no aportan nada básico a los resultados. En estos cálculos se exploraron diferentes regiones del espacio de parámetros en dominios bidimensionales de varios tamaños y formas. También cambiamos las condiciones a la frontera (por ejemplo periódicas, para simular espacios infinitos), así como el número de neuronas que crecen o neuronas blanco. Exploramos los efectos de cambiar la constante de difusión de  $W$  y su sensibilidad para difundirse en los laberintos, así como las velocidades de crecimiento.

Los resultados que hemos mostrado no cambian cualitativamente si se varían los parámetros en una región grande, alrededor de los valores escogidos. La única restricción que se debe considerar concierne a los parámetros de reacción del modelo de Gray-Scott, que deben escogerse de tal forma que produzcan un patrón en el cual  $u$  percole en todo el dominio.

Los resultados mostrados en la Fig. 5(c) y (d), deben ser comparados visualmente con los resultados experimentales mostrados en la Fig. 2. Sostenemos que nuestro modelo reproduce adecuadamente la característica básica del fenómeno que consiste en que los caminos de crecimiento son más rectos en un medio rico en nutrientes que en uno pobre (es reproducida adecuadamente por nuestro modelo). Observe que esto sucede con neuronas de partes diferentes del sistema nervioso.

Nuestros experimentos no muestran si las moléculas guía reaccionan entre sí. De hecho es extremadamente difícil determinar experimentalmente si estas moléculas reaccionan o no, por varias razones importantes. Primera, la identificación de estas moléculas debe hacerse dentro de un grupo de cientos de moléculas secretadas. Segunda, las moléculas deberían ser marcadas con marcadores que permitan su visualización. Tercera, las reacciones químicas que se detectaran no necesariamente producirían los efectos que describimos. En realidad en muy pocos sistemas experimentales se han podido obtener patrones de Turing. Sin embargo, no deja de ser alentador que recientemente se ha encontrado que el patrón de folículos pilosos en ratones se produce por un mecanismo de Turing muy parecido al usado aquí<sup>20</sup>.

Nosotros no argumentamos que **sólo tres** sustancias tomen parte en el proceso, seguramente hay docenas de mecanismos que regulan el proceso real de crecimiento. No obstante, pensamos que el modelo simplificado que se mostró, captura las características esenciales requeridas para explicar los experimentos. Los experimentos sólo nos muestran indirectamente lo que sucede, los patrones de crecimiento son diferentes en distintas condiciones, y esta distinción es contraria a lo que se

esperaría con mecanismos de difusión simple.

Estamos convencidos que este modelo presenta lo necesario para explicar el crecimiento serpenteante. Si es necesario, cada parte del modelo puede ser modificada, incorporando así más datos experimentales. La cinética de la reacción que forma el patrón de Turing espacialmente estable podría ser notablemente más complicada. Las moléculas guía podrían reaccionar con el medio, o entre ellas. Incluso, se podría modelar el crecimiento mismo de las neuritas con mecanismos más sofisticados.

El modelo puede ser utilizado para explicar algunos fenómenos, como axones cruzando la línea media. Axones comisurales crecen hacia la línea media siguiendo guías como Netrinas. Después de que cruzan, los axones cambian de dirección en un sentido longitudinal. Una vez que llegan a la línea media, moléculas Slit inhiben la actividad de las Netrinas. Ya cerca de la línea media la actividad de tres tipos de receptores Robo modulan el comportamiento de los axones. Este hecho está claramente ligado con un problema de patrones espaciales. Los axones deben seguir un camino y cambiar de dirección repentinamente.

Por ejemplo, existen otros modelos matemáticos que describen en forma general el crecimiento de neuritas<sup>19</sup>, en un marco de referencia de interacción entre campos, que permiten orientar el cono de crecimiento apropiadamente. Estos mecanismos funcionan muy bien, excepto que la ausencia de un mecanismo sofisticado de difusión impide que el modelo reproduzca las trayectorias sinuosas que se observan en los experimentos. En estos modelos se intentan reproducir las desviaciones de la línea recta por medio de fluctuaciones térmicas. Sin embargo, los resultados numéricos de esos cálculos no se parecen a las trayectorias observadas. Es evidente que el ruido térmico por sí solo no puede reproducir los cambios abruptos de dirección que ocurren en los cultivos. Entonces proponemos que los modelos más sofisticados que existen y toman en cuenta los procesos moleculares que se conocen, deberían introducir con cuidado el hecho de que en general estas moléculas reaccionan entre sí. En este artículo simplemente enfatizamos este hecho y las importantes repercusiones que tiene en moldear y controlar la morfología del tejido nervioso.

## CONCLUSIONES

Hemos presentado un estudio sobre crecimiento de neuritas variando las características del medio en el que crecen. Los experimentos muestran que los patrones de crecimiento varían dependiendo del sustrato en el que crecen. Opuesto a nuestras expectativas, los patrones de crecimiento de neuritas son más rectos en un medio rico en nutrientes que los patrones en un medio pobre en nutrientes.

Presentamos un modelo básico con las propiedades necesarias para explicar los resultados experimentales. En este modelo se



propone que se forma un prepatrón químico de sustancias activadoras e inhibidoras, y es estacionario. El patrón es seguido por moléculas secretadas por las neuronas blanco, cuya difusión depende de la cantidad de nutrientes disponibles en el sustrato. El crecimiento de las neuritas es modelado con un autómata celular que crece en dirección de mayor concentración de las moléculas guía.

Con este modelo llevamos a cabo cálculos numéricos y obtenemos patrones de crecimiento sinuosos en ambientes pobres de nutrientes, y patrones rectos en ambientes ricos de nutrientes, tal como en los experimentos. Sostenemos que la existencia de los caminos con meandros pueden ser explicados con la idea básica del modelo en su forma más simple. Queda por verificar experimentalmente si las reacciones químicas presentes en el medio interneuronal pudieran generar patrones. Admitimos que la observación de estos patrones debe ser muy difícil. Sería bueno también comparar la versatilidad del modelo contra la idea usualmente aceptada de que sería suficiente considerar moléculas atrayentes y repelentes<sup>21</sup>. Algunos modelos de guía de crecimiento para neuritas utilizan ecuaciones de difusión y producen patrones rectos. La adición de un término de reacción en las ecuaciones de difusión, nos permite justificar el por qué de los cambios drásticos de dirección en el crecimiento de neuritas. Además, esto permite la ventaja de asegurar que todas las neuritas lleguen a sus blancos específicos sin obstruirse entre sí y con otros tejidos.

En los últimos años se han descubierto varias moléculas guía. Algunas de éstas han sido identificadas también por sus propiedades de morfógenos en etapas de desarrollo. Este es el primer modelo que incorpora moléculas guía así como morfógenos en un solo marco teórico. Esto es muy importante ya que la mayor parte de la actividad de crecimiento de neuronas sucede durante el desarrollo del embrión. La mayor parte de las transformaciones espaciales que ocurren en el organismo son mediadas por morfógenos. La teoría de reacción-difusión de Turing es la más aceptada para modelar morfogénesis. En nuestro modelo, hemos introducido el concepto de guía de neuritas acoplado a morfogénesis.

Creemos que nuestro modelo inspirará la realización de nuevos experimentos con reacciones entre las moléculas guía. Químicamente es un reto encontrar estas reacciones. Si se lograra, y además se cumplieran las condiciones necesarias para tener la inestabilidad de Turing, se podría tener la certeza que los modelos de reacción-difusión son esenciales para describir el crecimiento de neuritas. Nuestro modelo es adecuado para incorporar la interacción entre moléculas guía y enfatizar la importancia de reacciones químicas entre morfógenos al modelar el crecimiento de neuronas.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el soporte financiero a través del proyecto F-40416

de CONACyT. Los experimentos fueron realizados en la Facultad de Medicina de la UNAM.

## REFERENCIAS

1. Rozada, I. Redes exponenciales ordenadas. Tesis de Licenciatura en Física, UNAM (2004). ~60 págs.
2. Gordon-Weeks, P.R. Neuronal growth cones Cambridge: Cambridge University Press (2000).
3. Turing, A. The chemical basis of morphogenesis. *Phil Trans. R. Soc. Lond.* **B237**, 37 (1952).
4. Zhou, F.Q., Waterman-Storer, C.M. & Cohan, C.S. Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *J. Cell. Biol.* **157**, 839-849 (2002).
5. Zheng, J.G., Felder, M., Conner, J.A. & Poo, M.M. Turning of growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* **368**, 140-144 (1994).
6. Zheng, J.G., Wan, J.J. & Poo, M.M. Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J. Neurosci.* **16**, 1140-1149 (1996).
7. Song, H.J., Ming, G.L. & Poo, M.M. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* **388**, 275-279 (1997).
8. Parent, C.A. & Devreotes, P.N. A cell's sense of direction. *Science* **284**, 765-770 (1999).
9. Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 11-23 (1996).
10. Wilkinson, D.G. Topographic mapping: Organising by repulsion and competition. *Curr. Biol.* **10**, R447-R451 (2000).
11. Klein, R. Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 196-203 (2001).
12. Brose, K., et al. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806 (1999).
13. Marti, E. & Bovolenta, P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci.* **25**(2), 89-96 (2002).
14. Ingham, P.W. & McMahon, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**(23), 3059-3087 (2001).
15. Zou, Y. Signaling in axon guidance. *Trends Neurosci.* **27**(9), 528-532 (2004).
16. Augsburger, A., Schuchardt, A., Hoskins, S., Dodd, J. & Butler, S. BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* **24**(1), 127-141 (1999).
17. Gray, P. & Scott, S.K. Autocatalytic reactions in the isothermal continuous stirred tank reactor - oscillations and instabilities in the system  $A+2B \rightarrow 3B$  and  $B \rightarrow C$ . *Chem. Eng. Sci.* **39**, 1087 (1984).
18. Pearson, J.E. Complex Patterns in a simple systems. *Science* **261**, 189 (1993).
19. Krottje, J.K. & Van Ooyen, A. A mathematical framework for modelling axon guidance. *Bulletin of Mathematical Biology* (2006) (in press).
20. Sick, S., Reinker, S., Timmer, J. & Schlake, T. WNT and DDK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism. *Science* **314**, 1447-1450 (2006).
21. Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D. & Cloutier, J.F. Signaling at the growth cone: Ligand-Receptor Complexes and the Control of Axon Growth and Guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 509-563 (2003).