



# Modulación de las propiedades migratorias de las células de la glía envolvente olfatoria

Diego Reginenesi Espinoza



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CELULAR

# MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES MIGRATORIAS DE LAS CÉLULAS DE LA GLÍA ENVOLVENTE OLFATORIA

Memoria presentada por el Ingeniero Biomédico

**DIEGO REGINENSI ESPINOZA**

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado en Biomedicina, bienio 2011-2012 de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados bajo la dirección y tutoría del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología Celular de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Febrero 2015.



**Director de Tesis**  
Dr. José Antonio del Río Fernández



**Doctorando**  
Diego Reginensi Espinoza



“Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres,  
abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños”

**Pablo Neruda**



# Índice

<b>ABREVIACIONES.</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	
<b>1. Migración Celular.</b>	
1.1 Principios de migración celular.	1
1.2 Ciclo de motilidad celular.	3
1.3 Tipos de migración celular.	7
1.4 Análisis microscópico de la migración celular.	9
1.5 Biomecánica celular.	10
<b>2. Neurobiología Celular.</b>	
2.1 Morfofisiología neuronal.	13
2.2 Comunicación neuronal: unión neuromuscular.	14
2.3 Sistema de cultivo neuronal compartimentalizado.	16
<b>3. Regeneración Neural.</b>	
3.1 Biología regenerativa del sistema nervioso.	19
3.2 Lesión traumática en el sistema nervioso central.	20
<b>4. Inhibidores de la regeneración en el sistema nervioso central.</b>	
4.1 Inhibidores asociados a la mielina.	24
4.2 Receptores de las proteínas inhibitorias de la mielina.	27
4.3 Proteoglicanos.	30
4.4 Moléculas de guía axonal.	32





<b>5. Estrategias Regenerativas.</b>	
5.1 Administración de factores neuroprotectores y promotores regenerativos.	35
5.2 Factores de potenciación de la capacidad regenerativa intrínseca neuronal.	36
5.3 Bloqueo de moléculas inhibitorias de la regeneración neuronal.	36
5.4 Trasplante celular y biomateriales.	38
<b>6. Células de la glía envolvente olfatoria.</b>	
6.1 Neuroanatomía olfatoria.	39
6.2 Desarrollo y morfofisiología de la glía envolvente olfatoria.	40
6.3 Potencial regenerativo de la glía envolvente olfatoria.	41
6.4 Trasplante de las células de la glía envolvente olfatoria.	42
<b>7. OBJETIVOS.</b>	<b>47</b>
<b>8. RESULTADOS.</b>	<b>51</b>
8.1 Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy.	55
8.2 Increased migratory potential of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord.	73
8.3 Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip.	93
<b>9. DISCUSIÓN.</b>	<b>113</b>
<b>10. CONCLUSIONES.</b>	<b>133</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>139</b>
<b>12. ANEXOS.</b>	<b>173</b>
12.1 Factor de impacto de las publicaciones.	175



# Abreviaciones

<b>AA</b>	aminoacid
<b>ACh</b>	acetylcholine
<b>AChR</b>	acetylcholine receptor
<b>AMIGO3</b>	amphoterine-induced gene and open reading frame 3
<b>BDNF</b>	brain derived neurotrophic factor
<b>BLyS</b>	B lymphocyte Stimulator
<b>ChABC</b>	chondroitinase ABC
<b>CNS</b>	central nervous system
<b>CNTF</b>	ciliary neurotrophic factor
<b>CREB</b>	cAMP response element-binding
<b>CS</b>	chondroitin sulfate
<b>CSPG</b>	chondroitin sulfate proteoglycan
<b>CST</b>	corticospinal tract
<b>Cx43</b>	conexin-43
<b>DD</b>	death domain
<b>DDC</b>	deleted in colorectal cancer
<b>DRG</b>	dorsal root ganglia
<b>DS</b>	dermatan sulfate
<b>E</b>	embryonic day
<b>ECM</b>	extracellular matrix
<b>eGFP</b>	enhanced GFP
<b>EGF</b>	epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor
<b>E-NCAM</b>	embryonic N-CAM
<b>ER</b>	endoplasmatic reticulum
<b>ERK</b>	extracellular signal regulated kinase
<b>FA</b>	focal adhesion
<b>FAK</b>	FA kinase
<b>GAG</b>	glycosaminoglycans
<b>GAP</b>	growth associated protein
<b>GDNF</b>	glial-cell line derived neurotrophic factor
<b>GFAP</b>	glial fibrillary acidic protein
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>GPI</b>	glycosylphosphatidylinositol
<b>GTP</b>	guanosine-5'-triphosphate
<b>HS</b>	heparan sulfate



<b>HSPG</b>	heparan sulfate proteoglycans
<b>IL-1</b>	interleukin 1
<b>IL-6</b>	interleukin 6
<b>ITIM</b>	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs
<b>JNK</b>	c-jun n-terminal kinases
<b>KO</b>	knock-out
<b>KS</b>	keratan sulfate
<b>LBD</b>	ligand-binding domain
<b>LIF</b>	leukemia inhibitory factor
<b>LGI1</b>	leucine-rich glioma inactivated 1
<b>LGIC</b>	ligand-gated ion channel
<b>LIMK</b>	LIM kinase
<b>LINGO1</b>	leucine rich repeat and Ig domain containing 1
<b>LOTUS</b>	lateral olfactory tract usher substance
<b>LPA</b>	lysophosphatidic acid
<b>LRP1</b>	LDL receptor-related protein1
<b>LRR</b>	leucine-rich repeats
<b>Irrn6a</b>	leucine rich repeat neuronal 6a
<b>MAG</b>	myelin associated glycoprotein
<b>MAIs</b>	myelin associated inhibitors
<b>MAP</b>	microtubules associated protein
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase
<b>MIP</b>	macrophage inflammatory protein
<b>MSD</b>	mean square displacement
<b>NC</b>	neural crest
<b>N-CAM</b>	neural cell adhesion molecule
<b>NEP1-40</b>	nogo extracellular peptide, residues 1-40
<b>NG2</b>	neuron-glia antigen 2
<b>NGF</b>	nerve growth factor
<b>NgR</b>	nogo receptor
<b>NgR(Ecto)</b>	nogo receptor 1(310) ectodomain
<b>NMJ</b>	neuromuscular junction
<b>NPY</b>	neuropeptide Y
<b>NT-3</b>	neurotrophin-3
<b>NT-4</b>	neurotrophin-4
<b>NTN</b>	neurturin
<b>N-WASP</b>	wiskott-aldrich syndroms proteins
<b>OB</b>	olfactory bulb
<b>OE</b>	olfactory epithelium
<b>OECs</b>	olfactory ensheathing cells



<b>OMgp</b>	oligodendrocyte-myelin glycoprotein
<b>ONF</b>	olfactory nerve fibroblasts
<b>ONL</b>	olfactory nerve layer
<b>ORN</b>	olfactory receptor neuron
<b>PAA</b>	polyacrylamide
<b>PAK</b>	p21-activated kinase
<b>PDGF</b>	platelet-derived growth factor
<b>PDMS</b>	polydimethylsiloxane
<b>PG</b>	proteoglycans
<b>PI-3K</b>	phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PirB</b>	paired-immunoglobulin-like receptor B
<b>PAA</b>	polyacrylamide
<b>PLA</b>	polylactic acid
<b>PNS</b>	peripheral nervous system
<b>PKA</b>	protein kinase A
<b>PKC</b>	protein kinase C
<b>PSC</b>	perisynaptic schwann cell
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog
<b>ROCK</b>	rho-associated serine/threonine kinase
<b>RTN</b>	reticulum
<b>SC</b>	schwann cells
<b>SCI</b>	spinal cord injury
<b>TBI</b>	traumatic brain injury
<b>TFM</b>	traction force microscopy
<b>TRAF2</b>	TNF receptor-associated factor 2
<b>TNFR</b>	tumor necrosis factor receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor $\alpha$
<b>TROY</b>	TNFRSF expressed on the mouse embryo
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>UNC5</b>	uncoordinated 5
<b>WAVE</b>	WASP-like verprolin homologous protein





# Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b>	Elementos del citoesqueleto.	2
<b>Figura 2:</b>	Dinámica del citoesqueleto de actina.	2
<b>Figura 3:</b>	Arquitectura de la actina en el movimiento celular.	3
<b>Figura 4:</b>	Contactos focales.	4
<b>Figura 5:</b>	Migración celular.	5
<b>Figura 6:</b>	RhoGTPasas y migración celular.	6
<b>Figura 7:</b>	Modos de migración y transiciones.	8
<b>Figura 8:</b>	Análisis microscópico de la migración celular.	9
<b>Figura 9:</b>	Biomecánica celular.	11
<b>Figura 10:</b>	Polarización dinámica neuronal.	13
<b>Figura 11:</b>	Estadios polarización de neuronas corticales <i>in vitro</i> .	14
<b>Figura 12:</b>	Migración neuronal y señalización.	14
<b>Figura 13:</b>	Unión neuromuscular.	16
<b>Figura 14:</b>	Sistema de microfluídica en neurobiología.	17
<b>Figura 15:</b>	Resumen filogenético de la capacidad de regeneración del CNS.	20
<b>Figura 16:</b>	Mielina inhibidor del CNS.	24
<b>Figura 17:</b>	Proteínas inhibitorias asociadas a la mielina.	27
<b>Figura 18:</b>	Esquema de NgR1.	28



<b>Figura 19:</b>	Composición del CSPG.	31
<b>Figura 20:</b>	Moléculas de guía axonal.	33
<b>Figura 21:</b>	Biomateriales utilizados tras lesión medular.	38
<b>Figura 22:</b>	Diagrama esquemático del sistema olfatorio de rata adulta.	40
<b>Figura 23:</b>	Efectos promotores de la neuroregeneración de las OECs.	43
<b>Figura 24:</b>	Migración OECs <i>in vivo</i> .	115
<b>Figura 25:</b>	Migración OECs y moléculas inhibitorias del CNS.	117
<b>Figura 26:</b>	Caracterización adhesión y dinámica TEG3 en fibras PLA.	123
<b>Figura 27:</b>	Tipo de migración de las TEG3	125
<b>Figura 28:</b>	Patrón y migración de TEG3 asociado a moléculas inhibitorias.	126







# INTRODUCCIÓN





# Migración Celular

## Principios de la migración celular.

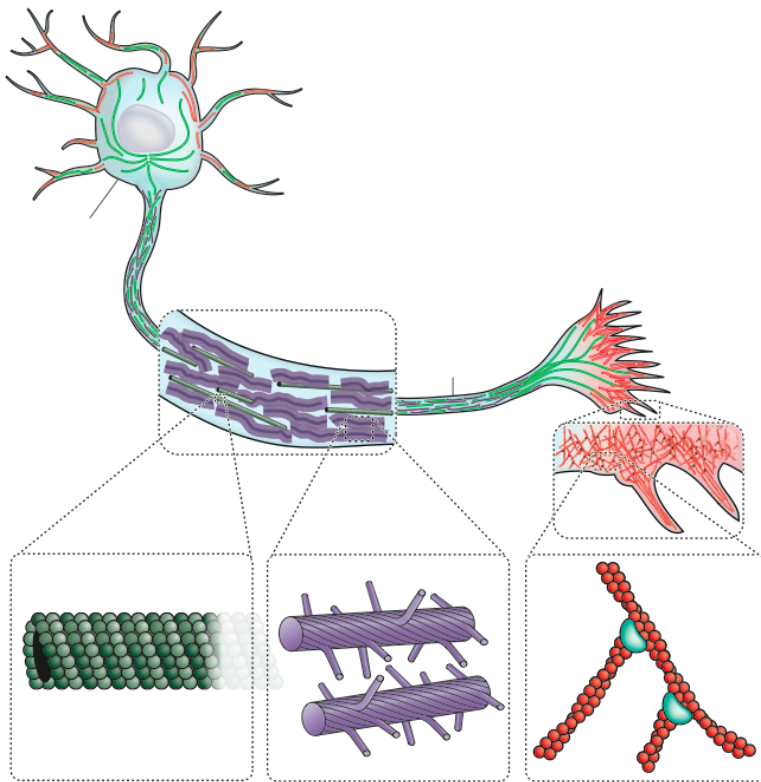
Los seres vivos son redes de producciones moleculares en las que las moléculas producidas generan con sus interacciones la misma red que las produce. Esta propiedad de los sistemas de producirse a sí mismos es la autopoiesis y define el acoplamiento de un sistema a su entorno. Aunque estos sistemas son abiertos (intercambian materia y energía con el medio), están operacionalmente cerrados (se hacen a sí mismos y no están programados desde afuera), pues sus operaciones internas son las que lo distinguen del medio (Varela et al., 1974). Así, la autopoiesis intenta definir la unicidad de la emergencia que produce la vida en su forma celular fundamental (Varela, 1995).

El movimiento es un fenómeno evolutivo muy importante a nivel celular. Su aparición temprana en la evolución puede comprobarse por la similitud genómica y estructural, en bacterias y archae, de proteínas como: FtsZ, MreB, crescentina y ParM con el citoesqueleto eucariota (Defeu Soufo and Graumann, 2004). Las células eucariotas tienen la capacidad de organizar movimientos para migrar, alimentarse, dividirse y dirigir coordinadamente el transporte de materiales intracelulares. El mecanismo de direccionamiento del movimiento se realiza asociado a una disipación calórica requiriendo contrarrestar la resistencia externa impuesta por el medio extracelular y la interna generada por los componentes intracelulares. La resistencia externa resulta de la combinación del grado de viscosidad y rigidez de la matriz extracelular y del nivel de adhesión de la célula con el sustrato que la rodea (Rodríguez et al., 2003). La resistencia interna se origina mayoritariamente en el citoesqueleto, cuya estructura debe mantener un equilibrio siendo lo suficientemente sólida para conservar la consistencia de la célula y, a la vez, flexible para permitir cambios morfológicos y el transporte de elementos citoplasmáticos (Small and Kaverina, 2003). El citoesqueleto está

compuesto por una red de filamentos de tres clases: microtúbulos, filamentos intermedios y filamentos de actina. La combinación de la actividad dinámica de cada uno de ellos determina cambios físicos y de señalización intracelular que permiten el movimiento celular.

Los microtúbulos, como su nombre indica, son tubos de 22-24 nm. de diámetro cuyas paredes están formadas por repeticiones de dímeros de dos proteínas:  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina (Howard and Hyman, 2003; Mandelkow and Mandelkow, 1995). Una propiedad característica de los microtúbulos es su capacidad para generar ciclos de ensamblaje y desensamblaje fenómeno conocido como inestabilidad dinámica y que se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* (Conde and Caceres, 2009). Estos filamentos son indispensables para el desplazamiento intracelular de orgánulos y vesículas, forman el esqueleto de cilios y flagelos y participan activamente en la segregación de cromátidas durante la división celular. La función microtubular requiere de la participación de proteínas motoras denominadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) que se comportan como estructuras de andamiaje capaces de estabilizar y promover el ensamblaje en los microtúbulos, como también arrastrar diversos cargos siguiendo diversas rutas a través del citoesqueleto (Mallik and Gross, 2004).

Los filamentos intermedios tienen dimensiones de 8-10 nm, que son intermedias a los microfilamentos y los microtúbulos. Estos filamentos están presentes tanto en el citoplasma como en el núcleo (Dey et al., 2014). Tienen una función estructural siendo responsables de mantener la integridad celular puesto que funcionan a modo de cables intracelulares que se unen a complejos de unión celular lo que permiten la cohesión entre células contiguas. Son capaces de resistir tensiones mecánicas y deformaciones celulares, y al contrario, que los otros componentes del citoesqueleto, los filamentos intermedios están formados



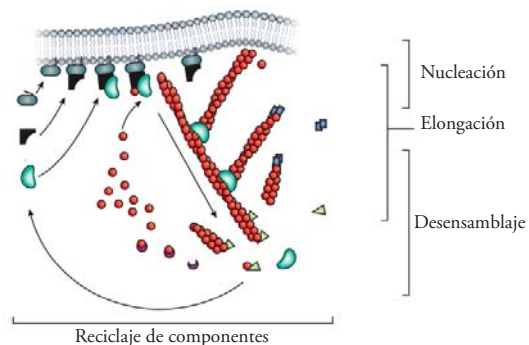
**Figura 1. Elementos del citoesqueleto.** El citoesqueleto está formado por tres tipos de filamentos de proteínas de diferente composición, función y características: los microtúbulos (verde), los filamentos intermedios (violeta) y microfilamentos (rojo). *From Fletcher et. al, 2011*

por unidades pertenecientes a varias familias de proteínas entre las que se encuentran: queratinas, vimentinas, desminas, proteínas ácidas fibrilares gliales (GFAP), periferinas, neurofilamentos, lamininas y nestinas (Chung et al., 2013; Dey et al., 2014; Kim and Coulombe, 2007).

Los microfilamentos, son polímeros de 6-7 nm de diámetro cuya unidad repetida es la actina globular o G-Actina. Son los principales responsables de los procesos de motilidad celular y los cambios de la forma celular durante el ciclo celular y ante diversos estímulos extracelulares, como también la organización del citoplasma durante fenómenos de endocitosis, exocitosis y la generación de fuerzas mecánicas intracelulares (Schmidt and Hall, 1998).

La generación de nuevos filamentos de actina (F-Actina) puede ocurrir de dos maneras diferentes: mediante la formación de novo de un filamento, o bien a partir de filamentos de actina preexistentes. En el primer caso, la actina monomérica (actina G) da lugar a pequeños fragmentos inestables capaces de favorecer su elongación, en lugar de su despolarización; mientras en el segundo caso, el nuevo filamento se genera

por elongación de filamentos preexistentes (Blanchoin et al., 2014). Para ello, se desplazan las proteínas que bloquean las proteínas de capping, o bien, por acción de la proteína cofilina que es capaz de despolimerizar dichos filamentos generando así nuevos extremos de crecimiento libres para de monómeros de actina (Pollard and Borisy, 2003). La polimerización coordinada de los filamentos de actina, en conjunto, la elevada dinámica de la membrana plasmática proporciona la fuerza para diversos procesos celulares, que incluye, por ejemplo la migración celular. Durante este



**Figura 2. Dinámica del citoesqueleto de actina.** Hay tres pasos básicos que intervienen en la ramificación de los filamentos de actina: nucleación y reticulación del filamento, elongación del filamento y desensamblaje de las subunidades del filamento. *From Fletcher et. al, 2011*

proceso los filamentos de actina se organizan en complejos ensamblados tridimensionales que se van modulando constantemente acorde a las necesidades espacio-temporales de la célula (Mattila and Lappalainen, 2008).

## Ciclo de motilidad celular.

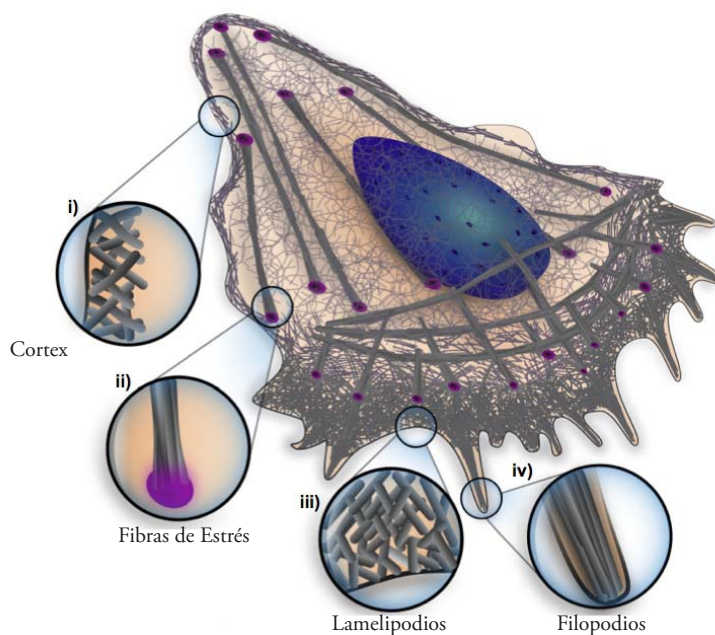
La migración celular es un proceso físico-químico que involucra la coordinación tanto espacial como temporal de los subcomponentes celulares durante su desarrollo a través de la matriz extracelular (Harunaga and Yamada, 2011). La matriz extracelular (ECM) es un entramado organizado de distintos tipos de macromoléculas que constituyen el entorno de las células eucariotas (Miyata et al., 2005). La composición de la matriz es específica y es capaz de generar un ambiente específico para cada tejido y particular para las distintas células del cuerpo. Además, de su función estructural contiene información codificada, en función del tipo de moléculas que la constituyen, que son transmitidas a nivel intracelular para ejercer un papel esencial en el desarrollo de la función celular (Dedhar and Hannigan, 1996; Lafrenie and Yamada, 1996). La composición de la matriz extracelular es compleja y variable dependiendo del tejido asociado, no obstante, se ha determinado que la constituyen cuatro tipos de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos, glucoproteínas no colagenosas y elastinas (Hynes and Naba, 2012).

Durante el proceso migratorio a través de un determinado medio extracelular, la densidad y la rigidez del entorno extracelular representan un inconveniente en la dinámica de desplazamiento. La migración juega un papel crucial en diversos fenómenos biológicos, ya sea en condiciones fisiológicas regulares como en diversas patologías (Franz et al., 2002). Así, por ejemplo, la migración está involucrada en respuestas inflamatorias, en la formación de las capas germinales de un embrión, en la cicatrización de heridas y en metástasis (Belman et al., 2009).

El ciclo de motilidad celular es la repetición cíclica de una serie de eventos celulares y moleculares cuya concreción permite a las células desplazarse. Los principios básicos de la migración celular han sido establecidos a nivel bidimensional (2D), tridimensional (3D), in vitro e in vivo (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Ridley, 2004). Básicamente, la deconstrucción del movimiento celular distingue cinco pasos interdependientes (Friedl and Wolf, 2003).

### I. Polarización morfológica

El primer paso para iniciar el movimiento es adquirir una configuración polarizada. Las células migratorias como los fibroblastos, queratinocitos, leucocitos o neuronas responden polarizándose ante la presencia de un estímulo extracelular. Cuando una célula se polariza presenta diferen-



**Figura 3. Arquitectura de la actina en el movimiento celular.** Representación esquemática de la célula con sus diferentes arquitecturas del citoesqueleto de actina, indicando (i) cortex celular, (ii) fibras de estrés, (iii) lamelipodios y (iv) filopodios. Las regiones de zoom destacan particularidades arquitectónicas de las diferentes regiones de la célula. *From Blanchoin et al., 2014.*

ciación asimétrica de sus dominios celulares a nivel molecular, morfológico y funcional (Orlando and Guo, 2009). En particular, durante el proceso migratorio se observa un polo en la dirección del movimiento (frente de avance o leading process) y un polo diametralmente opuesto (extremo posterior o trailing process), con el núcleo y los orgánulos en medio de ambos extremos (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Este proceso de polarización puede surgir como respuesta espacio-temporal de un gradiente físico o molecular (Parent and Devreotes, 1999) o fluctuaciones mecánicas que alteran la cinética celular variando de esta manera la simetría azimutal de la F-actina presente en el córtex de la célula (Coates et al., 1992).

## II. Extensión de protrusiones de membrana.

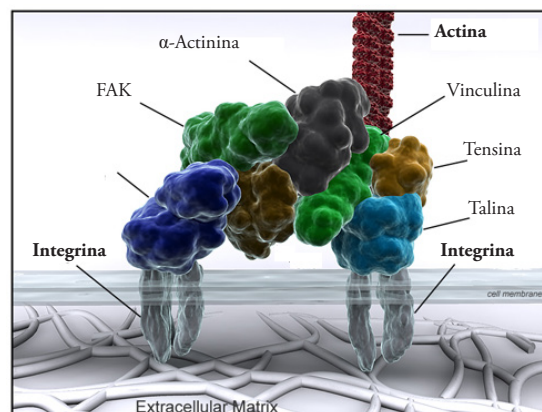
En segundo término, la célula debe interpretar la señal extracelular y localizar la región de su superficie en contacto con el estímulo extracelular. Esto requiere de un mecanismo de comparación de señales a lo largo de la superficie celular y la restricción de la actividad a la región más estimulada. Como efector final de la señal quimiotáctica, el citoesqueleto cambia su dinámica en función del estímulo provocando el crecimiento orientado de protrusiones y el desplazamiento de la célula (Bergman et al., 2014; Bourne and Weiner, 2002; Weiner, 2002).

Así una consecuencia primordial del proceso de polarización celular es la extensión de procesos activos de membrana, tales como: lamelipodios, filopodios o extrusiones irregulares que van indicando la dirección de movimiento y, por tanto, definen el extremo guía. Estas estructuras se extienden tridimensionalmente, en forma reversible, contribuyendo al proceso migratorio dependiendo de circunstancias específicas. Los lamelipodios son protrusiones de la membrana que se forman en el borde frontal de la célula y que pueden extenderse durante largas distancias arrastrando de las células a través del tejido (Small et al., 2002). Los filopodios son proyecciones finas de membrana que sirven para explorar los alrededores de la célula y son particularmente importantes, para la orientación de los conos de crecimiento neuronales y angiogénesis de los vasos sanguíneos (Mattila and Lappalainen, 2008). Las extrusiones irregulares (del inglés, Cellular Blebs) se han descrito para conducir la migración de algunas células

durante el desarrollo y enfermedades. Este proceso migratorio es conducido mediante la presión hidrostática generada en el citoplasma por el córtex contráctil de actinmiosina (Paluch and Raz, 2013). Estos diferentes tipos de protrusiones de membrana pueden coexistir en el frente de avance (Diz-Munoz et al., 2010); ello sí, sin la existencia de una correlación establecida entre la velocidad de translocación celular y la velocidad de la dinámica de estas protrusiones de membrana (Condeelis, 1993).

## III. Anclaje y estabilización acoplamiento célula-sustrato.

Una vez formadas las protrusiones, éstas se estabilizan gracias a la unión de receptores transmembrana al sustrato formándose un complejo de adhesión denominado contacto focal (FA). Estos complejos de adhesión son estructuras altamente dinámicas y que se están constantemente ensamblando y desensamblando durante el proceso migratorio. La composición del complejo incluye: proteínas estructurales, adaptadoras y de señalización. Así, por ejemplo, pueden apreciarse, generalmente, grandes complejos de adhesión compuestos de diversas proteínas que promueven un anclaje muy estable, por lo tanto, reducen la migración; como también, pueden observarse complejos de adhesión más pequeños y de menor complejidad estructural asociados funcionalmente a células de alta tasa migratoria (Fraley et al., 2010; Geiger et al., 2009; Petit and Thiery, 2000).



**Figura 4. Contacto Focal.** Esta unión célula - MEC viene otorgada por proteínas de unión transmembranas del tipo integrinas. El dominio intracelular de la integrina se asocia a diversas proteínas de unión a los microfilamentos, mientras que el dominio extracelular se une a la matriz extracelular. *From University of Reading. Migration Cell Lab.*



Este anclaje célula-sustrato es mediado, generalmente, mediante las integrinas que son receptores heterodímeros constituidos por una cadena  $\alpha$  y  $\beta$  con un dominio largo y un dominio corto y que son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina, siendo esta interacción estabilizada por un complejo proteico formado por diversas proteínas asociadas (p.e  $\alpha$ -actinina, paxilina, talina, tensina y vinculina) (Harburger and Calderwood, 2009). Así la unión de diversos ligandos a la porción extracelular de las integrinas desencadena cambios conformacionales en el receptor que genera el inicio de señales intracelulares, tales como: fosforilación de tirosinas, activación de pequeñas GTPasas y cambios en la biosíntesis de los fosfolípidos que regulan la formación y el fortalecimiento de los sitios de adhesión, la dinámica del citoesqueleto y la polarización celular durante el proceso migratorio (Zamir and Geiger, 2001).

Así a medida que la célula avanza este complejo se va disociando, permitiendo a la célula desacoplarse de la ECM y volver a posicionarse en un nuevo punto de contacto. Así cuando, la célula llega a su destino es capaz de establecer centros de adhesión maduros y estables. Los puntos de adhesión reclutan además proteasas de la superficie celular para degradar la matriz y generar un frente de avance durante el desplazamiento celular (Geiger et al., 2009). Diversos análisis teóricos y prácticos indican que la tasa de adhesión de una célula sobre un sustrato contribuye de manera bifásica a la velocidad de migración (DiMilla et al., 1991;

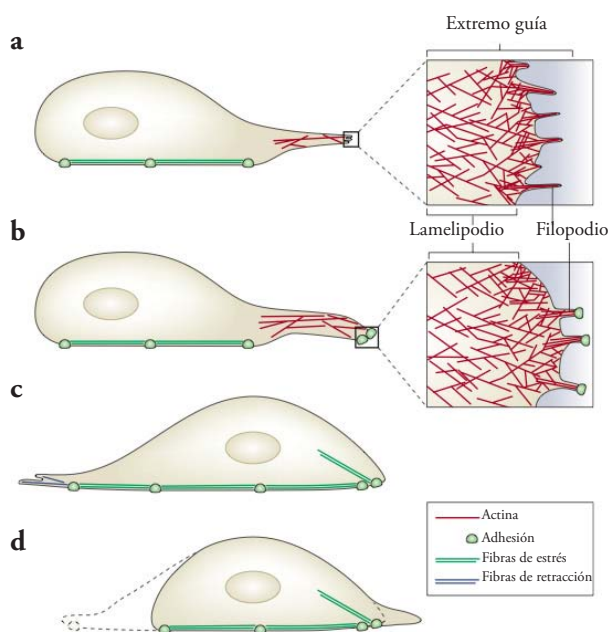
DiMilla et al., 1993).

#### IV. Formación fuerzas contráctiles y tracción celular.

Durante el proceso de migración celular se producen, por lo menos, dos tipos de fuerzas independientes entre sí: fuerzas de protrusión necesarias para el proceso de extensión de membrana durante la formación de lamelipodios y filopodios mediada por polimerización de haces de F-Actina y fuerzas intracelulares asociadas al desplazamiento hacia el extremo delantero por parte de la célula (Ji et al., 2008b; Renkawitz et al., 2009). Este mecanismo de tracción del citoesqueleto es a causa de la acción de un mecanismo contráctil, basado en un sistema actina-miosina, que desencadena el arrastre del cuerpo celular hacia eje delantero (Giannone et al., 2007; Ridley, 2004). No obstante, la magnitud de la generación de fuerzas contráctiles no determina necesariamente la velocidad de migración de las células.

#### V. Desprendimiento del tren posterior y generación de nuevos contactos.

Por último, en la parte posterior de la célula se desprenden los puntos de unión de los receptores de adhesión y la membrana plasmática remanente se retrae contribuyendo a determinar la velocidad global de migración (Morin et al., 2008). Este fenómeno de desestabilización de la membrana plasmática en el tren posterior celular durante el



**Figura 5. Migración celular.** (a) El proceso migratorio se inicia con la formación de lamelipodios y filopodios en el frente de avance. (b) Durante la extensión celular, nuevas adherencias con el sustrato se forman en el frente de avance. (c) Luego, el núcleo y el cuerpo celular translocan hacia adelante a través de fuerzas contráctiles intracelulares. (d) Así, la parte trasera de la célula tira hacia adelante y se desmonta el tren posterior generando una dinámica migratoria hacia el frente delantero. *From Mattila et al., 2008.*

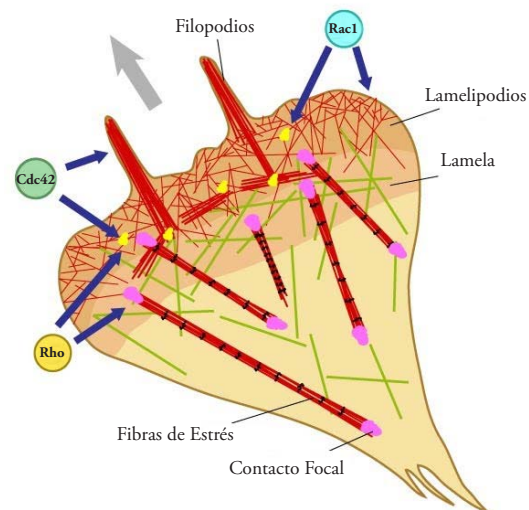
proceso de migración ha sido informada tanto *in vitro* como *in vivo* (Bard and Hay, 1975; Chen, 1981).

Cuando la célula se libera del sustrato para progresar su avance, las moléculas de integrina localizadas en la parte posterior de la célula retornan al interior de la célula mediante procesos de endocitosis, siendo enviadas en vesículas a la región perinuclear donde serán devueltas a la superficie. Es decir, son recicladas constantemente permitiendo que la célula tenga elementos de anclaje de renovación en la zona frontal. Una vez allí, se forman nuevos complejos de adhesión que se van posicionando acorde la célula se desplaza hacia el extremo guía frontal. De esta manera, la parte trasera de la célula, se va liberando y la célula va avanzando; en paralelo, la integrina que formaba parte del tren posterior se integra al borde de avance ya sea por proceso de internalización o mediante difusión a través de la membrana plasmática (Bretscher, 2008; Puklin-Faucher and Sheetz, 2009).

Todo el proceso migratorio a lo largo de sus 5 etapas está regulado por proteínas de la familia Rho, subgrupo dentro de la superfamilia de GTPasas Ras, que actúan como interruptores moleculares siendo activados por una gran variedad de estímulos extracelulares (Etienne-Manneville and Hall, 2002). En las células de mamíferos las proteínas Rho (RhoA, Cdc42 y Rac) están activadas por señales extracelulares específicas y dirigen la organización de la actina del citoesqueleto para inducir cambios morfológicos característicos (Schmidt and Hall, 1998). Así, por ejemplo, la microinyección de la proteína Rho o la activación de Rho por ácido lisofosfatídico (LPA) produce la aparición de grandes haces de filamentos de actina, conocidos como fibras de estrés, como también clusterización de las integrinas y las proteínas asociadas en la formación de contactos focales (Ridley and Hall, 1992). En cambio, se ha observado en líneas celulares que la microinyección de la proteína Rac provoca polimerización de actina en la periferia de la célula e implica la formación de lamelipodios y ondulaciones de membrana (del inglés, Ruffling) (Hall, 1998; Ridley et al., 1992), así es como, mutantes negativos de Rac inhiben la formación de lamelipodios inducidos normalmente por diversos factores de crecimiento como factor de crecimiento derivado de plaque-

tas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o insulina, indicando que la respuesta a estos factores es dependiente de Rac; mientras la activación de Cdc42 por bradicinina provoca la formación de filopodios que son de protuberancias filiformes de actina (Hall, 1998; Kozma et al., 1995). Los roles que cumplen las Rho GTPasas sobre el citoesqueleto de actina se pueden apreciar en la regulación de la morfología celular, las interacciones célula-célula, la polaridad celular y los procesos migratorios (Khosravi-Far et al., 1998; Nobes and Hall, 1995).

El grupo de proteínas efectoras para la familia de las GTPasas Rho es diverso. Para el caso de Rho los efectores más conocidos involucrados en la reorganización del citoesqueleto de actina en el ensamblaje de fibras de estrés, la formación de fibras de estrés y la unión de actina a la membrana plasmática son, al menos, dos efectores: las proteínas ROCK y formina mDia (Thumkeo et al., 2013). Por otra parte, proteínas efectoras de Cdc42 como N-WASP, se unen directamente a monómeros de actina y activan al complejo Arp2/3, el cual actúa como un sitio de nucleación para comenzar la polimerización del citoesqueleto de actina y la formación de microespinas y/o filopodios (Miki and



**Figura 6. Rho GTPasas y migración celular.** La familia de Rho GTPasas cdc42, rac y Rho actúan en diferentes regiones en la célula (indicadas por las flechas) para orquestar el proceso migratorio. Cdc42 generalmente controla la polaridad celular, la formación de los filopodios y adhesiones focales nacientes. Rho influye en la maduración de las adhesiones celulares y además la formación de fibras de estrés. Rac controla principalmente el ensamblaje de actina y la formación de los lamelipodios. *From Mechanobiology Institute, Singapore.*

Takenawa, 2003; Takenawa and Suetsugu, 2007). Por su parte, Rac también es capaz de activar el complejo Arp 2/3 mediante la interacción con WAVE provocando la formación de lamelipodios (Bisi et al., 2013). Otra diana efectora de Rho son las proteínas LIMK. Estas quinasas puede ser fosforiladas y activadas por ROCK, como también por PAK, el principal activador de Rac y cdc42 revelando un punto de convergencia entre las vías de cdc42, Rac y Rho (Bernard, 2007).

En conclusión, la ejecución de los cinco pasos del proceso migratorio no se considera una condición sine qua non para la migración celular debido a que existen variaciones específicas de cada tipo celular de acuerdo a su repertorio molecular y las características de la matriz extracelular a través de la cual se desplazan (Friedl and Wolf, 2003). Sin embargo, los detalles de cómo las células interactúan con el microambiente en el que múltiples señales se presentan simultáneamente están lejos de ser clara aún. Por ello, con el fin de predecir las respuestas de migración celular en entornos complejos como el organismo, es imprescindible entender cómo las células integran la información migratoria de estas múltiples señales extracelulares.

## **Tipos de migración celular.**

La mayoría de las células que forman los organismos tienen la capacidad de migrar en respuesta a estímulos externos o programas internos. Las variaciones en el proceso migratorio dan origen a distintos patrones de comportamiento migratorio que se pueden clasificar en: (i) migración mesenquimal, (ii) migración ameboide y (iii) migración colectiva (Friedl, 2004).

### **Migración Mesenquimal.**

Los fibroblastos y mioblastos se desplazan según el modelo mesenquimal. El elemento distintivo de este tipo de migración es el papel preponderante de las integrinas en la formación de adhesiones fuertes que funcionan como puntos de anclaje para la tracción y arrastre del cuerpo celular. En modelos migratorios 3D, los elementos básicos de este tipo de migración se mantienen: polarización, extensión de protrusiones en el frente de avance y adhesión, contracción del cuer-

po celular, y liberación de adhesiones posteriores (Haemmerli et al., 1983).

### **Migración Ameboidea.**

En los eucariotas, este tipo de movimiento ha sido observado en leucocitos (Friedl et al., 2001). Los leucocitos son células muy deformables que se mueven a gran velocidad debido a la debilidad de los puntos de adhesión (Friedl et al., 1998). La deformación de la morfología celular es producida por los filamentos de actina cortical. Esta versatilidad morfológica permite a los leucocitos adaptar su volumen al espacio extracelular y extender protrusiones muy plásticas. Su desplazamiento se basa en alternar ciclos de expansión y contracción celular. A pesar de no expresar integrinas, utilizan otros receptores que le confieren adhesividad al sustrato extracelular, aunque muy baja y marcadamente transitoria (Fey et al., 2002). Las células con movimiento ameboide migran de forma extremadamente rápida y con gran autonomía con respecto al medio extracelular (Renkawitz and Sixt, 2010), por ejemplo, los linfocitos migran en promedio a una velocidad de 20  $\mu\text{m}/\text{min}$ , mientras que un fibroblasto a sólo unos 0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Lammermann and Sixt, 2009; Renkawitz and Sixt, 2010).

### **Migración Colectiva.**

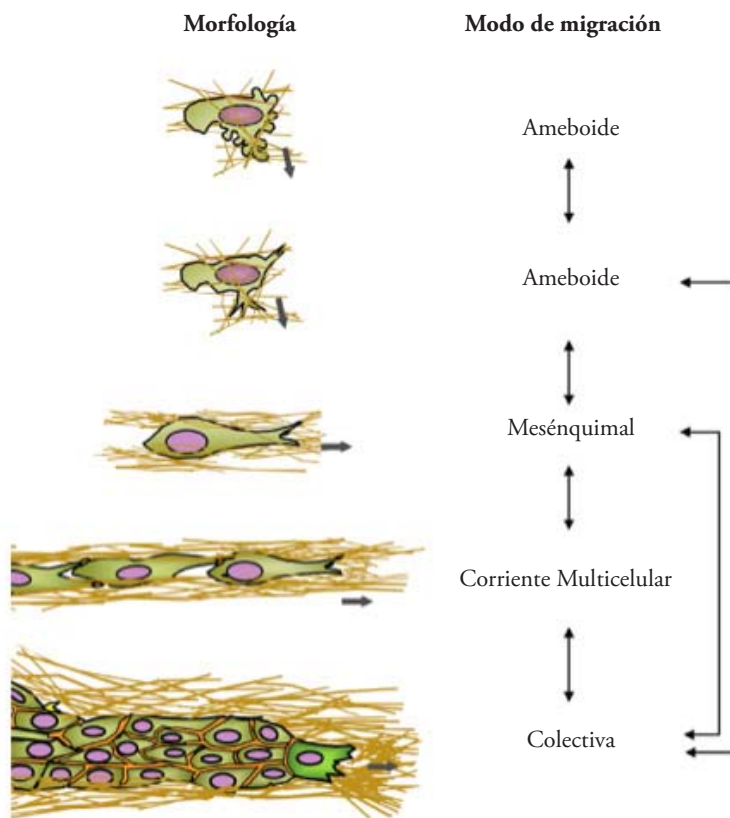
La migración colectiva es un modo de migración importante durante el desarrollo embrionario, cicatrización celular y en algunas formas de cáncer durante la metástasis. Existen diversos aspectos que caracterizan la migración colectiva, tales como: (i) las células permanecen física y funcionalmente conectadas, de manera que existe una interacción célula-célula que se conserva durante el proceso migratorio; (ii) la presencia de propiedades emergentes, tales como: polaridad multicelular, señalización colectiva y organización supracelular del citoesqueleto de actina durante el proceso de avance colectivo; (iii) el conjunto de células opera como una unidad migratoria que incluso puede modificar estructuralmente la matriz extracelular durante su migración (Friedl and Gilmour, 2009).

Independiente de los diferentes modos de migración colectiva, el principio molecular y celular de todos ellos requiere cohesión, polarización

colectiva, coordinación de la actividad del citoesqueleto, orientación por señales fisicoquímicas y dinámica espacio-temporal respecto al sustrato (Friedl and Gilmour, 2009). Este comportamiento colectivo requiere de una organización supramolecular del citoesqueleto, es decir, que el conjunto de células funcione como un conglomerado celular único durante el proceso de migración celular y remodelado de la ECM (Kolega, 1981). El mecanismo por el cual se organiza supramolecularmente el citoesqueleto en el movimiento es casi desconocido (Farooqui and Fenteany, 2005).

En la migración colectiva en algunos casos se observa conectividad intracelular bien establecida, no obstante, en otros casos se observa un mecanismo de migración sin un patrón claramente definido. Como criterio se establece que la dinámica colectiva debe involucrar a un conjunto de células independientes entre sí, pero que actúen de manera asociada afectando la dinámica del grupo, al menos una parte del tiempo, durante el proceso migratorio (Rorth, 2012). La variabilidad del grado de conectividad celular conlleva a varios tipos de migración colectiva: (i) migración laminar (del inglés, Sheet Migration), las células mantienen

un estrecho contacto y continuidad estructural mientras ocurre el proceso migratorio; como el caso de las células epiteliales (Poujade et al., 2007), (ii) migración en racimo (del inglés, Branching Migration), se caracteriza por la formación de un grupo de células a partir de una estructura preexistente y se encuentra asociado a la generación de redes celulares elaboradas; como el caso de la formación de la glándula mamaria (Ewald et al., 2008), (iii) corrientes migratorias (del inglés, Stream Migration), las células migran de manera coordinada, pero mediante disposición libre, es decir, corresponde a un movimiento masivo coordinado más que cooperativo; como el caso de la cresta neural y la corriente migratoria rostral (LaBonne and Bronner-Fraser, 1999; Murase and Horwitz, 2004) y (iv) modelos específicos colectivos (del inglés, Slug-Like and Free Group: As Model Collective), hace referencia a modelos especializados en que se forma un grupo celular que se encuentra estrechamente asociado y que es capaz de migrar libremente en un determinado espacio tisular; como el caso del primordio de la línea lateral de pez cebra y células del borde en mosca de la fruta (Ghysen and Dambly-Chaudiere, 2007; Montell, 2003).



**Figura 7. Modos de migración y transiciones.** Cada modo de migración se basa por un conjunto de mecanismos moleculares que regulan cambios en la dinámica migratoria desde células individualizadas hasta dinámicas colectivas celulares. Las flechas grises indican la dirección de la migración. *From Friedl and Wolf, 2009.*



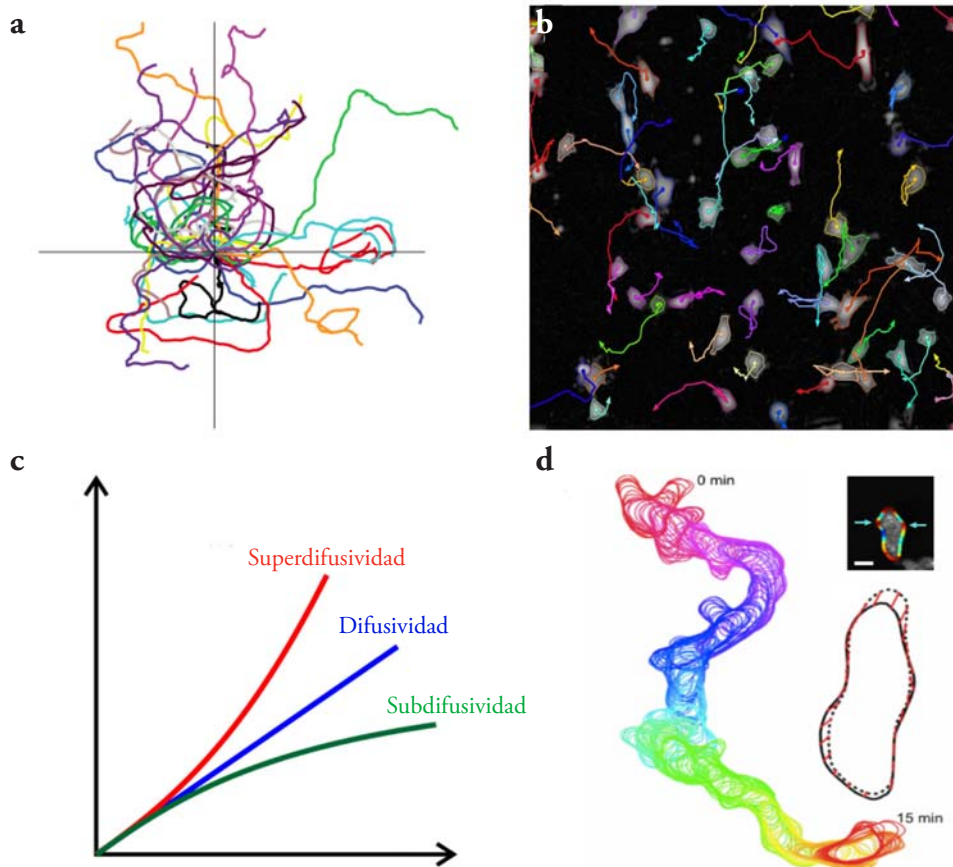
## Análisis microscópico de migración celular.

Conceptualmente, el direccionamiento celular durante el proceso migratorio tiene dos focos inductores de generación, por un lado, una direccionalidad intrínseca que se observa, por ejemplo, cuando las células responden a una señal motogénica no-direccional como en el caso de la aplicación uniforme de PDGF que activa la maquinaria de motilidad celular en ausencia de factor(es) externo(s) que determinen la orientación de migración (Seppa et al., 1982) y, por otro lado, una direccionalidad dirigida si el estímulo motogénico se presenta como un gradiente químico, un campo eléctrico, una topografía extracelular o una orientación mecánica predeterminada, y con ello, el desplazamiento está inducido por señales asimétricas en el medio externo generando una migración dirigida (Arriemerlou and Meyer, 2005). Así, si la señal es espacialmente homogénea, la migración es al azar (del inglés, Random

Migration), mientras si es espacialmente localizada, la migración puede ser dirigida (del inglés, Directional Migration) (Petrie et al., 2009).

La comprensión de cualquier sistema vivo, tanto en condiciones normales como patológicas, necesariamente nos conlleva a no sólo estudiar sus propiedades estructurales (espaciales), sino también sus propiedades dinámicas (temporales) (Meijering et al., 2012). El análisis microscópico de la migración celular permite la cuantificación de diversos tipos de medidas, como: la motilidad, la velocidad, la difusividad y la morfología celular, respectivamente (Beltman et al., 2009).

El análisis de motilidad celular (del inglés, Plot Track) permite la reconstrucción de la trayectoria de los objetos rastreados a partir de coordenadas (x,y) como cambios angulares del objeto durante el movimiento. Su representación gráfica considera un punto inicial común para todas las células en análisis permitiendo determinar la existencia



**Figura 8. Análisis microscópico de migración celular.** Técnicas de microscopia en tiempo real permiten la cuantificación de la dinámica celular a lo largo del tiempo mediante diversos análisis, tales como: (a) motilidad celular, (b) seguimiento celular, (c) difusividad celular y (d) morfología celular.

de alguna orientación preferencial en el comportamiento migratorio de las células (Beltman et al., 2009).

El análisis de velocidad celular (del inglés, Velocity Measure) es uno de los parámetros migratorios más estudiados. La velocidad media corresponde a la distancia recorrida por la célula en un intervalo de tiempo entre dos fotogramas (del inglés, Frames) secuenciales (Meijering et al., 2009).

El análisis de difusividad viene dada por el desplazamiento medio cuadrático (MSD) que corresponde a la medición más comúnmente utilizada para aleatoriedad migratoria (del inglés, Random Motion) en un objeto. (Qian, 2000) (i) Un M.S.D lineal significa que las células se comportan como objetos que se desplazan azarosamente en el tiempo. (ii) Un M.S.D que incrementa en el tiempo (fenómeno superdifusivo) es indicativo de movimiento dirigido. Las células exhiben movimientos dirigidos, generalmente durante corto tiempo, lo que significa que estadios de tiempo breves las células tienden a moverse en línea recta (en una dirección persistente), no obstante, si se observa movimiento dirigido en escalas de tiempo prolongadas es indicativo de pérdida de aleatoriedad en el movimiento debido a quizás algún tipo de gradiente mecánico y/o químico. (iii) Un M.S.D que decrece en el tiempo (fenómeno subdifusivo) es indicativo de que las células están limitadas por alguna variable extracelular, por ejemplo, interacciones inhibitorias célula-célula o célula-sustrato (Saxton and Jacobson, 1997).

El análisis de morfología se basa en algoritmos que obtienen información mediante registro seriado de imágenes de la forma celular. La forma celular viene otorgada, en gran medida, por los filamentos de actina que se encuentran en la zona periférica de la membrana plasmática denominada córtex celular (Salbreux et al., 2012). La visualización de la actina filamentosa (F-actina), a nivel celular, es crucial para estudios de procesos morfogenético, como: la migración, la polarización y la división celular. Para ello, se puede utilizar diversos marcadores, como por ejemplo, LifeAct que es una cadena pequeña peptídica (17 AA) de F-actina con marcaje fluorescente que no genera efectos adversos sobre la dinámica de la actina en células y estructuras tisulares eucariotas eucariotas (Riedl et al., 2008).

## Biomecánica celular.

Conceptualmente, la atención ha sido enfocada en la comprensión de cómo señales bioquímicas difusibles asociadas a la matriz extracelular son transducidas como señalización intracelular permitiendo regular la dinámica del citoesqueleto. No obstante, diversos estudios ponen de relieve la importancia de señales físicas, como la topología o la rigidez del medio extracelular en procesos migratorios (Lara Rodriguez and Schneider, 2013). Así es como las células requieren de elementos celulares capaces de identificar la variabilidad del microambiente extracelular mediante integrinas y sus proteínas asociadas (p.e vinculina, paxilina, FAK) que actúan como sensores de la matriz extracelular con el objetivo de emprender rutas migratorias a través de espacios fisiológicos con topografía y rigidez bien definidos (Plotnikov and Waterman, 2013).

Entonces, ¿por qué estudiar las fuerzas mecánicas celulares? Es sabido que actualmente una amplia variedad de procesos biológicos son regulados por fuerzas mecánicas a nivel tisular, como: la diferenciación de células madres, transición epitelio-mesenquimática, inmunidad innata, desarrollo del sistema nervioso y diseminación metastásica (Lee and Lim, 2007).

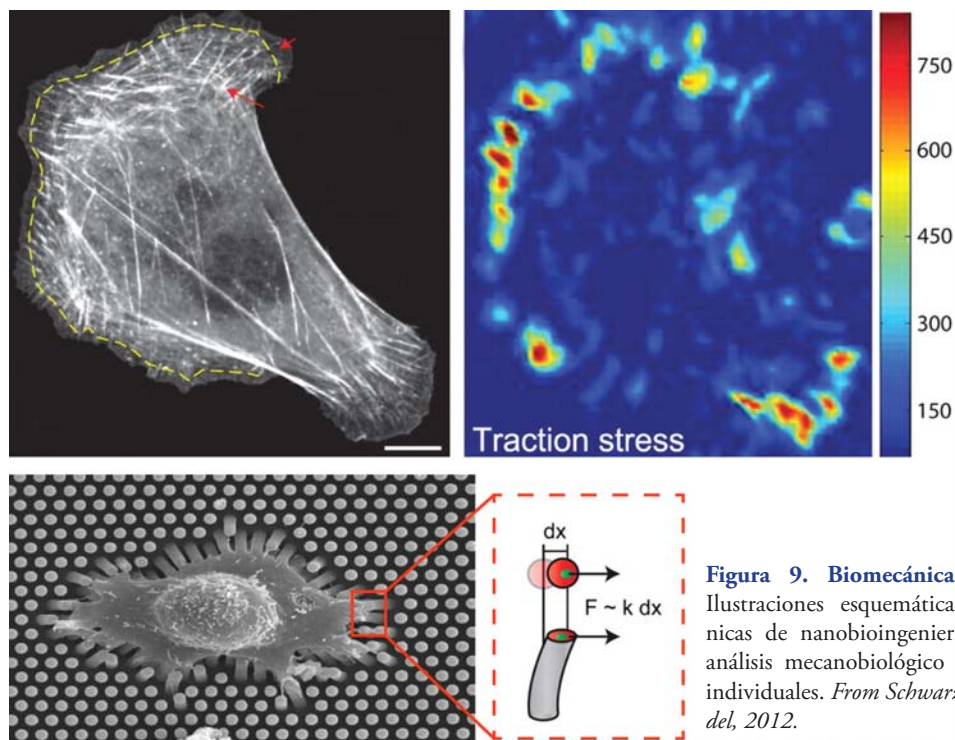
Desde el punto de vista biomecánico, la generación de fuerzas en la unidad célula-ECM genera la formación de deformaciones estructurales y reordenamiento de la ECM, transmisión de fuerzas a través de las FA y deformación en casi todos los aspectos intracelulares, incluyendo posicionamiento de las mitocondrias, retículo endoplasmático y núcleo. Sin embargo, la transmisión de fuerzas "de fuera hacia a dentro" es sólo la mitad del proceso, de la generación de fuerzas. Paralelamente, los microtúbulos se están polimerizando y despolimerizando (Dogterom et al., 2005), conduciendo a la activación de miosina II que genera fuerzas de tracción sobre los filamentos de actina que transmiten la señal a contactos focales que son capaces de inducir cambios en la membrana celular, y con ello, deformar la microarquitectura de la matriz extracelular (Vicente-Manzanares et al., 2009), en un sentido inverso y complementario, mediante transmisión de fuerzas de "adentro hacia fuera" .

El desarrollo de la mecanobiología se encuentra estrechamente conectado con la presencia de nuevas herramientas para la medición y manipulación de fuerzas de tracción del orden de la nanoescala en células. Para la identificación de las fuerzas involucradas en la dinámica celular se han desarrollado diversos enfoques que permiten la medición cuantitativa de las fuerzas de tracción celular. Así es como producto de la evolución de la bioquímica de polímeros y programación avanzada ha permitido la vinculación entre sustratos blandos y la matriz extracelular en la medición de fuerzas generadas por las células individuales (Eyckmans et al., 2011).

El concepto básico fue incorporado por Harris y cols., en donde fibroblastos causaban deformación en una delgada membrana de silicón que actuaba como sustrato elástico para las células (Harris et al., 1981; Harris et al., 1980). No obstante, la no linealidad inherente de las deformaciones y la complejidad generada por el campo de desplazamiento celular fueron indicativos de que esta técnica no era aplicable para una cuantificación precisa de la biomecánica celular. Esto fue así, hasta que Dembo y Wang desarrollan la microscopía de fuerza de tracción (TFM) (Dembo and Wang, 1999). En este método se usan microesferas fluorescentes embebidas en un gel de

poliacrilamida como marcadores de seguimiento de la deformación del gel producto de las fuerzas ejercidas por las células adherentes. Luego, de la obtención del vector de desplazamiento para cada microesfera, se resuelve mediante algoritmos matemáticos la fuerza realizada por la célula (Butler et al., 2002; Dembo and Wang, 1999), la TFM asume las fuerzas en el plano horizontal presumiendo que las fuerzas normales o perpendiculares al plano focal analizado son insignificantes (Hersén, 2010). Interesantemente, se han realizado investigaciones con células embebidas en hidrogeles 3D que sugieren que el mecanismo de mecanotransducción puede ser conservado en la dinámica 2D y 3D (Legant et al., 2010).

Otro método para estudiar fuerzas de tracción consiste en utilizar un conjunto de nanopilares aislados que consiste en un arreglo discreto de sensores de fuerza. Estos pilares son desviados por las células y su magnitud de deflexión depende de la direccionalidad en que la célula se desplaza. Dado que las adhesiones están unidas a lugares discretos específicos del arreglo de sensores, la resolución espacial de la medida de la fuerza está bien definida por la geometría de la matricial de los nanopilares (Kuo et al., 2010). Sin embargo, esta geometría también pone restricciones geométricas en las adherencias celulares y presenta se-



**Figura 9. Biomecánica Celular.** Ilustraciones esquemáticas de técnicas de nanobioingeniería para el análisis mecanobiológico en células individuales. *From Schwarz and Gardel, 2012.*

ñales topográficas que pueden alterar la fisiología celular nativa.

Además, de la rigidez del sustrato se debe considerar también la topografía de la superficie y las moléculas extracelular asociadas. Un método in vitro denominado ensayo de banda (del inglés, Stripe Assay) que consiste en la generación de un sustrato con un patrón geométrico binario, es decir, que consta de dos franjas dispuestas de manera alterna asociadas a dos señales moleculares específicas que permiten determinar el comportamiento y la adherencia celular frente a determinadas señales moleculares (Knoll et al., 2007).



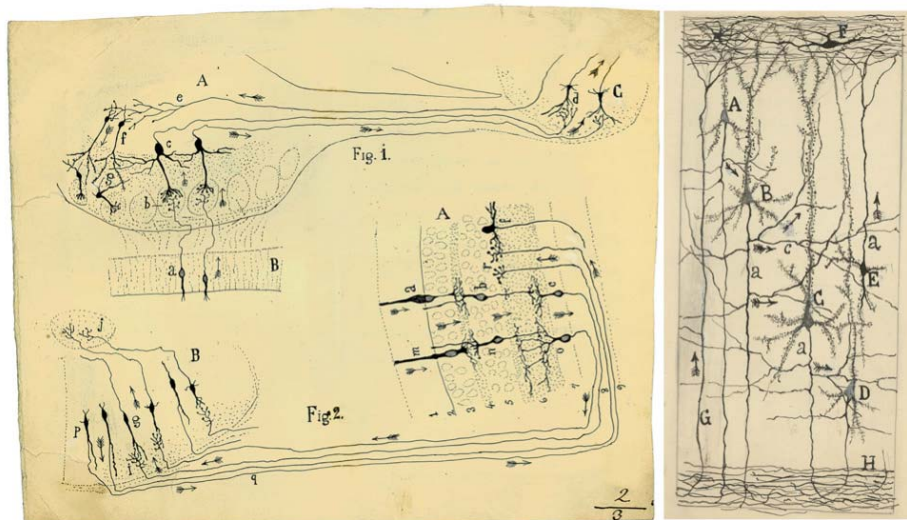
# Neurobiología Celular

## Morfofisiología neuronal.

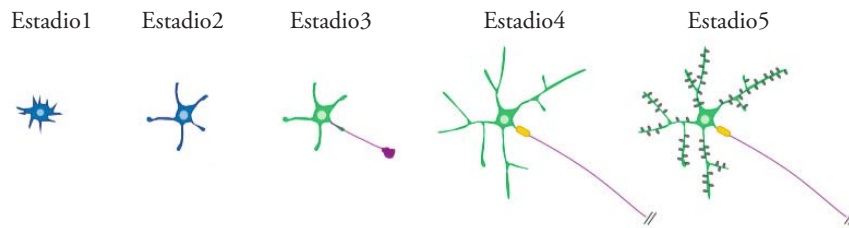
En la formación de redes neuronales funcionales durante el desarrollo, las neuronas elaboran estructuras altamente dinámicas que son cruciales en los procesos de migración, polarización inicial, guía axonal y formación sináptica. La neurona es una célula extraordinariamente especializada que posee una compleja organización morfológica y funcional (Goldman and Kennedy, 2011). Interdependiente de la morfología neuronal, o de la función de la misma, casi todas las neuronas contenidas en el sistema nervioso se ajustan a un modelo general, bien descrito por el principio de polarización dinámica de Cajal (Cajal, 1891), donde una neurona presenta una zona receptora de mensajes (dendrita), una zona integradora de los mismos (soma neuronal), una zona conductora (axón) y, en su extremo terminal, otra que se encarga de codificar ese mensaje y trasladar a la siguiente neurona la información procesada; es la zona transmisora (terminal sináptico). Por tanto, la función primordial de la neurona como una estructura aislada del sistema nervioso es recibir información y ofrecer ésta tras ser sometida a un procesamiento básico.

El inicio de la funcionalidad neuronal comienza con la formación del axón, que conlleva la generación de dos dominios funcionales: axonal y somatodendrítico. La secuencia de diferenciación de las neuronas, como el establecimiento de sus dominios celulares, se puede dividir en una secuencia estereotipada de 5 estadios diferenciables (Dotti et al., 1988). Los mecanismos intracelulares que regulan la especificidad del axón y su posterior crecimiento se ha indicado implicarían al menos dos rutas de señalización, la ruta de PI3-quinasa (Bradke and Dotti, 1999; Shi et al., 2003) y una ruta menos conocida en la que juega un papel importante la proteína LKB1 (Shelly et al., 2007).

Cada dominio neuronal tiene características bioquímicas y morfológicas propias que le otorgan una determinada polaridad dinámica en cuanto a su disposición estructural y funcional, y por ello, cada dominio tiene características morfofuncionales propias. Esto es indicativo de que cada dominio neuronal debe ser comprendido en aspectos estructurales, funcionales e interaccionales por separado (Horton and Ehlers, 2003; Lasiecka et al., 2009).



**Figura 10. Polarización neuronal.** Esquema de Cajal que expone el flujo de información (flechas) en los sistemas (a) olfativos, visuales y (b) cortex cerebral como soporte a la Ley de Polarización Dinámica. From Cajal, 1891.



**Figura 11. Polarización de neuronas corticales *in vitro*.** En cultivos de neuronas corticales postmitóticas se observan las transiciones clásicas descritas. *Estadio 1*, las neuronas postmitóticas inmaduras presentan protrusiones de membrana; *Estadio 2*, se observa la aparición de extensiones neuríticas inmaduras; *Estadio 3*, se produce ruptura de la simetría neuronal y una neurona se diferencia en axón (color morado), mientras que otras adquieren actividad dendrítica; *Estadio 4*, se caracteriza por un rápido crecimiento axonal y dendrítico; por último, *Estadio 5* se observa neuronas diferenciadas terminales. *From Barnes and Polleux, 2009.*

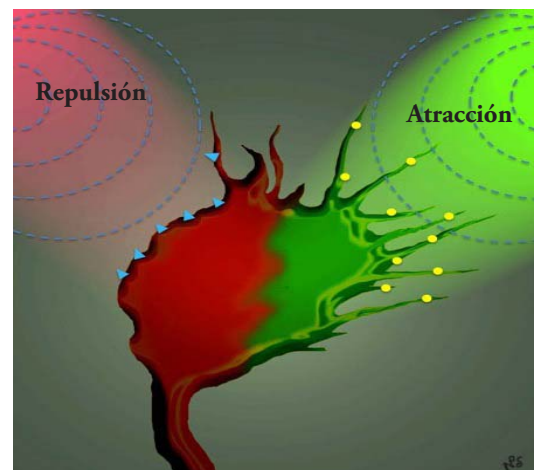
Para que la maquinaria neuronal funcione correctamente cada dominio debe cumplir sus funciones de manera específica y para ello necesitan de un conjunto propio y específico de proteínas funcionales (p.e. receptores de neurotransmisores, canales iónicos y proteínas de reciclaje) que se posicionan en lugares bien definidos de la membrana celular. Por lo tanto, la desregularización a cualquier nivel de señalización del citoesqueleto, la ausencia de funcionalidad de las proteínas de membrana, como también su localización imprecisa, asociada a cada dominio neuronal puede generar disfunción de la red de neuronas generando diversas enfermedades neurodegenerativas (Garrido and Díaz, 2009).

Las neuronas no son las únicas células reguladoras del funcionamiento del sistema nervioso sino que se encuentran acompañadas de células que durante mucho tiempo fueron ignoradas, las denominadas células gliales (Barres, 2008). Durante décadas, neurofisiólogos han dirigido su centro de atención hacia la neurona dejando a las glías relegadas a funciones de soporte neural, no obstante, en la actualidad se ha determinado que las células gliales cumplen funciones indispensables tanto en el desarrollo, como en la función normal de un organismo maduro; así como también son los principales protagonistas en diversas enfermedades y procesos traumáticos del sistema nervioso (Allen and Barres, 2009).

A nivel morfofuncional, las células de la glía no son iguales entre sí, en razón de su estructura, localización y función se distinguen varios subtipos. Las funciones establecidas por la glía incluyen: soporte en la neurotransmisión, mantención del balance iónico en el espacio extracelular y el aislamiento axonal.

## Comunicación neuronal: unión neuromuscular.

La migración y el posicionamiento apropiado de las neuronas durante el desarrollo es esencial para la construcción de circuitos sinápticos funcionales en el cerebro (Ghashghaei et al., 2007). La mayor parte de las neuronas nacen en lugares distintos a los que finalmente ocupan en el CNS (p.e. cerebro adulto). Durante el desarrollo y la formación del sistema nervioso, las neuronas son capaces de viajar a través del mismo para alcanzar su posición final. En este proceso que se denomina migración neuronal, las neuronas responden a diferentes tipos de factores guía que actúan como semáforos dirigiendo el tráfico de forma controlada. Estos factores proceden en su mayoría de otras neuronas que ya han alcanzado su posición definitiva, lo que ilustra la exquisita precisión que



**Figura 12. Migración neuronal y señalización.** En el sistema nervioso en desarrollo, las células migran y sus axones son guiados a sus blancos por quimiotaxis. La combinación de señales quimioattractivas y quimiorepulsivas es capaz de generar el avance del cono de crecimiento *From Arakawa, H; 2004.*

requiere este proceso para completarse de forma adecuada (Marin et al., 2010; Valiente and Marin, 2010).

Durante el proceso de migración neuronal por delante del cuerpo neuronal, se extiende una prolongación neurítica (proceso guía) que puede realizar maniobras exploratorias complejas en el medio extracelular dando lugar a la formación del cono de crecimiento (Martini et al., 2009). El cono de crecimiento es una estructura sumamente activa que recibe señales de distinta índole, que al ser integradas permiten interpretar y decidir sobre el direccionamiento migratorio neuronal. Estas señales denominadas moléculas de guía axonal tienen una actividad quimiotáctica induciendo el movimiento del axón neuronal hacia la fuente del factor guía (quimioatracción) o lejos de ella (quimiorepulsión) y que se expresan in vivo en un momento y un lugar adecuado para influir sobre la migración axonal de una población neuronal concreta mediante generación de estímulos tanto atractivos, como repulsivos (Vitriol and Zheng, 2012). Una vez alcanzada su posición definitiva, o incluso antes de llegar a ella, las neuronas empiezan a emitir un conjunto de dendritas característico de su fenotipo, y un axón que se extiende a través de rutas determinadas para contactar específicamente con su diana respectiva (Song and Poo, 2001).

La actividad del sistema nervioso es posible gracias a la sinapsis, contactos formados ya sea entre neuronas o entre una neurona y determinada célula diana. Las sinapsis son estructuras asimétricas en las que diversos neurotransmisores se liberan de la membrana presináptica y activan receptores de la membrana postsináptica, estableciendo la comunicación neuronal. Así, es como las sinapsis son las unidades fundamentales de los circuitos neuronales y permiten el desarrollo de comportamientos altamente complejos (Wu et al., 2010).

En el caso de las neuronas motoras inferiores forman una población única de células debido a su disposición espacial distintiva, su interacción con diferentes poblaciones no neuronales y su capacidad de formar sinapsis excitatorias con el músculo esquelético. Cada rama axonal al aproximarse a su fibra diana, pierde su vaina de mielina, y se ramifica aún más, hasta que el nervio alcan-

za el músculo formando la unión neuromuscular (NMJ) (Sanes and Lichtman, 1999). A este nivel, los terminales motores liberan el neurotransmisor acetilcolina (ACh) que difunde a través de la hendidura sináptica y se une a los receptores de acetilcolina (AChRs) en la membrana del músculo que conlleva la apertura de canales iónicos regulados por ligando (LGICs) y la despolarización de la membrana del músculo que da inicio a un potencial de acción que estimula la contracción muscular (Naya et al., 2000). Los AChRs se concentran en la membrana postsináptica a una alta densidad, mayor a 10.000 AChRs/ $\mu\text{m}^2$ , con tal de asegurar que la ACh provoque una despolarización suficiente en la membrana muscular activando el mecanismo de potencial de acción.

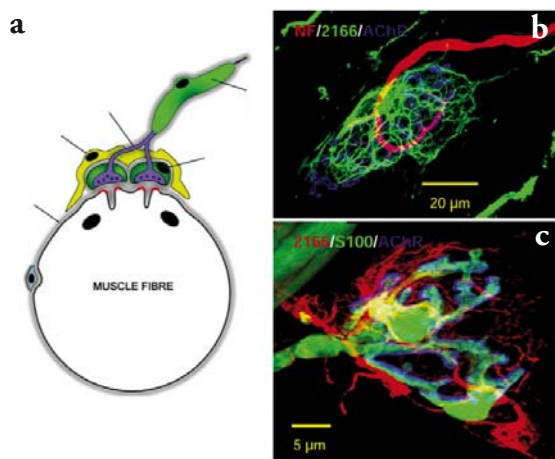
La fiabilidad del proceso se logra debido a dos mecanismos generales (Arber et al., 2002): (i) la presencia de AChRs y de otras proteínas críticas derivadas del músculo en la membrana postsináptica, y (ii) el aumento de manera selectiva de la expresión de estos genes en los núcleos de las miofibras, posicionándose cerca del lugar sináptico, mediante un proceso llamado transcripción sinapsis-específica (Engel et al., 2003; Schaeffer et al., 2001). La organización de los subdominios presinápticos y postsinápticos es conseguido debido a la presencia de factores llamados organizadores sinápticos (Gautam et al., 1996; Umemori et al., 2004), donde trabajos pioneros en NMJ identificaron dos factores secretados, agrina y laminina, como críticos para la diferenciación presináptica y postsináptica, respectivamente (Sanes and Lichtman, 1999), no obstante, estudios recientes sugiere la presencia de nuevos factores que de manera cooperativa son secretados en la formación de la NMJ (Fox et al., 2007).

Los co-cultivos tradicionales de neuronas motoras y miotubos forman NMJs, simples en organización, evidenciadas por la co-localización de los AChRs en la superficie del miotubo con vesículas presinápticas (p.e. sinaptofisina) (Guo et al., 2011), sin embargo, no permiten el aislamiento espacio-temporal de los constituyentes de la unión neuromuscular; considerando que los cuerpos neuronales están situados a metros de las células musculares en microambientes fisiológicos diferentes. Por ende, en un co-cultivo tradicional de NMJ los factores de crecimiento y los componentes de la matriz extracelular típicamente pre-

sentes en localizaciones específicas in vivo, como también, los tratamientos experimentales se encuentran con una distribución inexacta (p.e. soma / axón-NMJ) (Southam et al., 2013).

Los mecanismos moleculares que dirigen la formación y el mantenimiento de la sinapsis neuromuscular son probablemente similares a las sinapsis en el CNS, donde estos mecanismos de señalización son menos conocidos, y sus defectos son capaces de conducir a enfermedades neuromusculares llamadas miastenias congénitas, tipificadas por debilidad muscular y fatiga. Por ello, la comprensión de cómo se forman y funcionan las sinapsis neuromusculares sigue siendo un paradigma para elucidar los principios fisiológicos de las sinapsis del CNS (Burden, 2011).

La NMJ también es un modelo eficaz para el estudio de la interacción glía-axón. En este modelo, la NMJ consiste en el terminal presináptico del terminal nervioso, la fibra muscular postsináptica y células de Schwann perisinápticas (PSC) (Sanes and Lichtman, 1999), donde los PSCs juegan un papel significativo en el desarrollo, la función, el mantenimiento y la regeneración de la NMJ (Auld and Robitaille, 2003). Es más, existe evidencia de la presencia de un cuarto tipo celular asociado a la NMJ denominado kranocito que corresponde a un tipo de fibroblasto perisináptico (Court et al., 2008).



**Figura 13. Unión neuromuscular.** (a) Constitución interna celular asociada a la NMJ: fibra muscular, el terminal del nervio motor, las células de Schwann terminales y kranocito perisináptico. (b-c) Inmunofluorescencia NMJ, (b) bungarotoxina para receptores postsinápticos (azul), neurofilamento (rojo) y 2166, un antígeno característico para kranocito (verde) (c) bungarotoxina (azul), GFP-Schwann terminales (verde) y 2166 (rojo). *From Court et al. 2007.*

Por lo tanto, es adecuado la búsqueda de nuevas estrategias que permitan analizar los dominios neuronales de forma diferencial y reproducir las condiciones in vivo de la NMJ. Por ello, se recurre a herramientas nanotecnológicas basadas en principios de microfluídica para determinar los dominios neuronales de forma aislado, como también sus interacciones específicas (Wang et al., 2009). Así, la microfluídica aplicada surge como un nuevo enfoque para permitir el análisis de alta resolución de procesos neuronales que no pueden ser abordados por técnicas de biología celular y molecular convencionales.

### Sistemas de cultivo neuronal compartimentalizado.

El movimiento de un fluido se describe por la ecuación de Navier-Stokes:

$$\rho \left( \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right) = \mathbf{f}_{\text{ext}} - \nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{v},$$

donde  $\rho$  es la densidad del fluido,  $\mathbf{v}$  la velocidad del fluido,  $\mathbf{f}_{\text{ext}}$  es la fuerza externa que actúa sobre el fluido,  $p$  la presión del fluido y  $\mu$  es la viscosidad cinética del fluido. De su forma adimensional se obtiene el número de Reynolds definido:

$$Re \equiv \frac{vL}{\mu},$$

donde  $v$  es la velocidad característica del flujo,  $L$  es la longitud característica de la geometría. Número de Reynolds se puede interpretar como la relación de la fuerza de inercia a la fuerza viscosa (Squires, 2005). El número de Reynolds permite predecir la dinámica del flujo, ya sea: laminar ( $Re < 500$ ) o turbulento ( $Re > 2100$ ) en ciertos casos. La microfluídica se define como la ciencia que estudia a los sistemas para manipular cantidades muy pequeñas de fluido ( $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  l.) empleando canales con dimensiones desde unos pocos micrómetros hasta los cientos de micras siendo capaz de explotar ciertas diferencias fundamentales entre las propiedades físicas de los fluidos que se mueven en canales del orden macrométrico respecto aquellos que se mueven a través de canales en la escala micrométrica (Beebe et al., 2002; Squires, 2005). De estas diferencias la más importante es



la turbulencia (p.e.  $Re > 2000$ ).

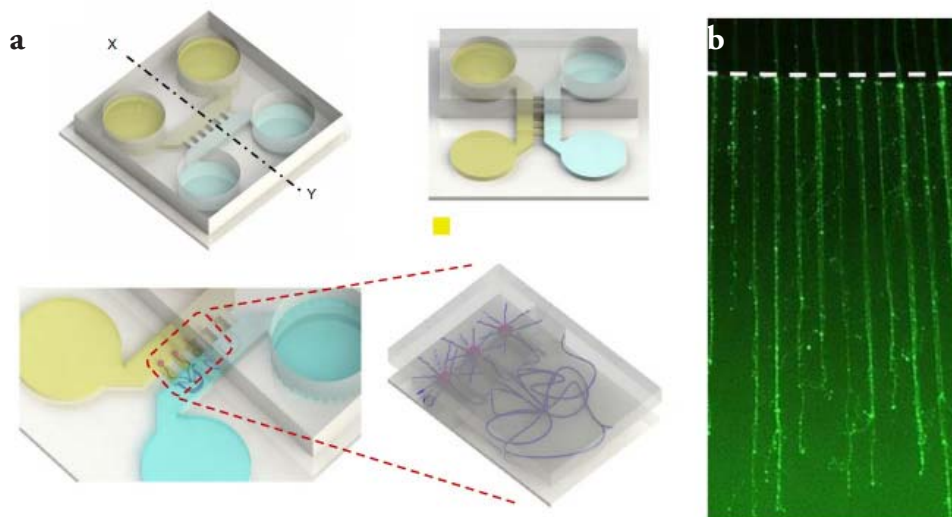
En grandes escalas, los fluidos se mezclan por convección (p.e. leche con café, humo de la chimenea con aire atmosférico). Este tipo de mezcla refleja el hecho de que en los fluidos macroscópicos, la inercia es a menudo más importante que la viscosidad. En cambio, en sistemas microfluídicos, con agua como fluido por ejemplo y cumpliéndose ciertos parámetros de entrada, los fluidos no se mezclan por convección, y por ello, cuando dos flujos fluidicos se unen en un microcanal fluyen paralelamente sin frecuencia de turbulencia (p.e.  $Re < 100$ ) produciéndose solo mezcla como resultado de la difusión de moléculas a través de la interfaz entre ambos fluidos (Whitesides, 2006).

La microfluídica es una herramienta poderosa para crear microambientes específicos (p.e. sistemas compartimentalizados, gradientes de concentración molecular) (Kim et al., 2010). La manipulación, el control preciso y el monitoreo de microambientes celulares usando tecnologías de microfluidos la convierte en una herramienta indispensable en la actualidad para la investigación en neurobiología (Beebe et al., 2002). La interconexión entre la ingeniería y diversas metodologías biológicas permiten el diseño de sistemas basados en propiedades microfluídicas para lograr biomimetizar el microambiente no sólo de células individualizadas, sino que también de los proce-

sos neuronales, mediante un control espacio-temporal en el orden de la micro /nanoescala (Folch, 2007; Millet and Gillette, 2012).

Las plataformas basadas en microfluídica han permitido un control espacio-temporal preciso del microambiente celular de tal manera que se pueda explorar con mayor detalle diversos eventos celulares que no pueden ser abordados por técnicas convencionales de biología celular y molecular (Meyvantsson and Beebe, 2008). La microfluídica presenta múltiples ventajas comparativas como: (i) bajo costo, (ii) transparencia óptica, (iii) biocompatibilidad, (iv) estabilidad térmica y permeabilidad gaseosa, (v) la baja cantidad de reactivo y muestra, (vi) posibilidad de experimentación en paralelo, (vii) mejor biomimesis del ambiente tisular (Wang et al., 2009).

El mantenimiento de los dominios neuronales, en particular las funciones axonales, son especialmente cruciales en proyecciones de larga-distancia como las neuronas motoras o neuronas piramidales corticales. Por ello, la correcta comprensión de la dinámica neuronal implica estudiar sus componentes por separado en determinados procesos celulares. Mediante la microfluídica se pueden diseñar plataformas compartimentalizadas que permiten el aislamiento físico de los axones y soma/dendritas permitiendo manipular cada dominio de manera independiente (Taylor et al., 2005).



**Figura 14. Sistemas de microfluídica en neurobiología.** Ilustración esquemática de plataforma compartimentalizada de cultivo de neuronas. (a) Primera generación de plataformas compartimentalizadas a base de microfluidica de cultivo neuronal por Taylor et al. (2005). (b) Los axones aislados son guiados dentro de compartimiento axonal (los axones son marcados con calceína-AM) Las líneas blancas indican el límite del compartimiento axonal. *From Kim et al. 2014.*

Los estudios actuales se han centrado en el uso de sistemas compartimentalizados con la finalidad de investigar el tráfico intra-axonal, la transmisión sináptica, la síntesis proteica axonal, la interacción glía-axón y los mecanismos de control del crecimiento axonal tras lesión (Kim et al., 2012).

Neuroregeneración en el PNS se produce en un grado significativo a diferencia del CNS en que no se registra regeneración extensa (Fenrich and Gordon, 2004) siendo limitada principalmente por la influencia inhibitoria del entorno glial y extracelular (p.e. mielina, proteoglicanos, moléculas de guía axonal) que contribuye al fracaso de la regeneración del CNS (David and Lacroix, 2003). Por ello, los esfuerzos buscan promover a los axones superar la naturaleza inhibitoria de su entorno tras la lesión, por lo tanto, son estrategias atractivas la utilización de tratamientos (p.e. farmacología, terapia celular) que promuevan la regeneración axonal en el CNS adulto, sin embargo, los ensayos *in vitro* están limitados por: (i) la carencia de un método apropiado para inducir lesión axonal de manera controlada, (ii) la imposibilidad de distinguir, de manera aislada, el crecimiento axonal tras la lesión, y (iii) la incapacidad de observar efecto diferencial de la relación tratamiento/dominio neuronal (Wang et al., 2009).

Así mediante plataformas microfluídicas se puede diseñar sistemas compartimentalizados asociados a sus respectivos dominios neuronales aislados, ello permite la simulación de: (i) lesiones puntuales axonales, (ii) microambientes inhibitorios (p.e. proteínas inhibitorias mielina, proteoglicanos) y (iii) la aplicación selectiva de diversos fármacos (p.e. NEP1-40, ChABC) en la región somatodendrítica y/o axonal (Wang et al., 2009). Es más, se pueden realizar sistemas combinatorios mediante plataformas microfluídicas con arreglos de microelectrodos siendo utilizados para análisis de redes cortico-talámicas (Kanagasabapathi et al., 2012) y para evaluar la actividad eléctrica de tractos cortico-corticales (Kanagasabapathi et al., 2009), como también en combinación a puntos cuánticos que son capaces de estimular potenciales de acción (Gomez et al., 2005).

# Regeneración Neural

## Biología Regenerativa del Sistema Nervioso.

A lo largo de la evolución algunos metazoos han ido perdiendo la capacidad de regenerar las partes dañadas de su organismo, debiendo realizar solo procesos reparativos durante su estadio adulto. Este obstáculo evolutivo que impide la regeneración tiene bases moleculares y celulares que son, en gran parte, desconocidas (Agata et al., 2007; Brockes et al., 2001). Actualmente, se han identificado 3 mecanismos regenerativos: la epimorfosis, la morfolaxis y la regeneración intercalar (Scott, 2003). La regeneración epimórfica está caracterizada por la presencia una masa celular indiferenciada denominada blastema que corresponde a un tejido de alta capacidad proliferativa, que se divide y vuelven a diferenciarse para la generación de novo de una estructura anatómica perdida de un organismo adulto (Scott, 2003), este tipo de regeneración es típico de extremidades de uródelos o aletas de peces teleósteos (Simon and Tanaka, 2013); mientras que en la regeneración morfoláctica, a diferencia de la epimorfosis, existe una baja tasa proliferativa y de crecimiento, en este caso un tejido pre-existente es capaz de reorganizar su patrón celular y formar una nueva estructura (Scott, 2003), este tipo de regeneración es típico de hidras (Bode, 2003). La regeneración intercalar puede ser visto como una forma intermedia en el que las células se dividen pero mantienen sus funciones diferenciadas produciendo células similares y por lo tanto no forman masas de células indiferenciadas (Scott, 2003), este tipo de regeneración es característico del hígado de mamíferos (Miyaoaka and Miyajima, 2013). Así, la dinámica de la regeneración depende de ya sea la disponibilidad de células madres pluripotenciales y/o la plasticidad de células diferenciadas para reponer la estructura faltante (Galliot and Ghila, 2010). Así es como en base a estas investigaciones, se obtiene la importancia de estudiar la regeneración en diferentes especies y contextos tisulares, ya que cada

sistema contribuye aspectos conceptuales diferenciales para la comprensión de la biología regenerativa (Tanaka and Reddien, 2011).

En términos generales, a nivel del sistema nervioso, Tuszynski y Steward proponen que la regeneración axonal se refiere a la capacidad de crecimiento de un axón lesionado y su extensión dentro o más allá de la zona de lesión; donde los axones regenerativos pueden tener una terminación abortiva (funcionalmente irrelevantes), formar conexiones ectópicas (podrían ser beneficiosas o perjudiciales para el restablecimiento de funcionalidad) o formar conexiones con sus diana respectiva (probablemente conllevando restauración funcional) (Tuszynski and Steward, 2012). La regeneración axonal involucra dos conceptos cruciales: en primer lugar, el recrecimiento axonal a partir de neuronas preexistentes a través de la zona de la lesión y el restablecimiento de sus conexiones neuronales (proceso de axogénesis) (Pollen and Snider, 2010; Quinn and Wadsworth, 2008) y en segundo lugar, la formación de nuevas neuronas a partir de poblaciones celulares precursoras que son capaces del restablecimiento de los contactos con sus respectivas dianas (Gotz and Huttner, 2005; Lledo et al., 2006).

En el sistema nervioso cuando se produce una lesión, en vertebrados superiores, que secciona el axón (axotomía) la respuesta neural es distinta dependiendo del lugar y el momento en el cual se produce (Bradke et al., 2012). Cuando la lesión tiene lugar en estadios neonatales, tanto en el sistema nervioso central (CNS) como en el sistema nervioso periférico (PNS) se puede observar capacidad regenerativa a nivel axonal, como es el caso de la recuperación funcional completa tras una transección total de la médula espinal en embriones de pollo (Shimizu et al., 1990). Pero conforme el individuo madura, se produce una disminución de esta capacidad en el CNS, mientras que el PNS sigue conservando esta caracterís-

tica en un grado importante durante toda la vida del organismo (Fawcett and Keynes, 1990). Los vertebrados inferiores como peces y anfibios son capaces de restaurar la conectividad y la función de los axones dañados, tanto en el CNS como en el PNS (Tanaka and Ferretti, 2009), esto se observa, por ejemplo, cuando la médula espinal de goldfish es transectada, ésta es capaz de recuperar su funcionalidad aunque anatómicamente los tractos regenerados son imperfectos y sólo algunos axones son capaces de regenerar eficientemente (Coggeshall and Youngblood, 1983). En aves y vertebrados superiores, como los seres humanos, la capacidad de regenerar de las neuronas en lesiones traumáticas en el CNS adulto es extremadamente limitada y podría ser correlativa con la noción de que la regeneración se ha ido disminuyendo, pérdida y/o bloqueada con el grado de especialización evolutiva de las especies a lo largo del tiempo (Filoni and Bosco, 1981). En contraste, el PNS presenta regeneración parcial tanto en los mamíferos adultos como en todos los vertebrados (Gordon and Gordon, 2010).

En el ser humano las lesiones del CNS, tanto cerebrales como medulares, son de origen variable e irreversibles. Las lesiones de médula espinal (SCI) se deben a una lesión traumática, a nivel medular, que es capaz de comprometer funciones vitales corporales (motoras, sensoriales, autonómicas y reflejas) (Furlan et al., 2013). Así, en función de la ubicación y la severidad de la lesión se pueden causar daños que desencadenan déficits neurológicos permanentes, como: paraplejías o tetraplejías. La lesión medular es un problema clínico crucial en la sociedad moderna, sin em-

bargo, a pesar de las numerosas intervenciones terapéuticas que se han intentado, la mayoría tiene un éxito limitado hasta la fecha de hoy (Varma et al., 2013).

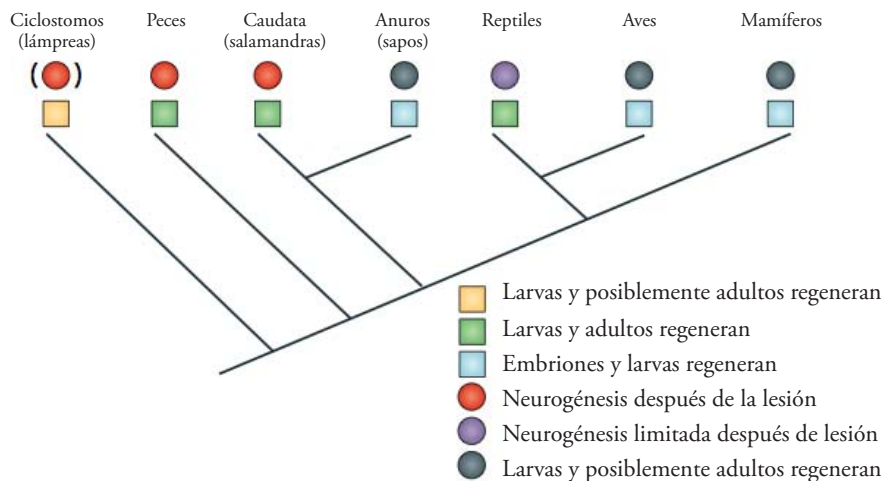
Los procesos degenerativos que ocurren en lesiones nerviosas periféricas y centrales son similares en muchos aspectos, pero tienen notorias diferencias en aspectos intrínsecos neuronales y su microambiente no permisivo que los distinguen a cada proceso (Fenrich and Gordon, 2004).

### Lesión traumática en el Sistema Nervioso Central.

La comprensión de la fisiopatología de una lesión en la médula espinal adquiere gran importancia debido a que en el CNS ocurren una serie de cambios irreversibles que obstaculizan la regeneración nerviosa. La secuencia temporal de cambios anatomopatológicos tras haber ocurrido una lesión medular se divide en tres etapas: fase aguda, fase subaguda y fase crónica (Hyun and Kim, 2010; James et al., 2011).

#### i) Lesión Primaria (Fase Aguda).

La lesión medular es capaz de destruir la frontera entre el CNS con respecto del resto del organismo, así como la barrera hematoencefálica y sus vasos vasculares locales. La destrucción de los vasos sanguíneos causa isquemia, como también anoxia e hipoglicemia conllevando la muerte neuronal y la degeneración de la mielina en los axones dañados ( $t = 8-24$  hrs), que luego fagocitos locales sanguíneos se encargaran de eliminar ( $t = 48$  hrs)



**Figura 15. Resumen filogenético de la capacidad de regeneración del CNS.** Los cuadros representan el estadio y la capacidad de regeneración. Los círculos representan la neurogénesis en la médula espinal durante la regeneración. From Tanaka and Ferretti, 2009.

(Dusart and Schwab, 1994; Tator and Fehlings, 1991). Los cambios metabólicos tempranos causados por el decremento lineal en la presión parcial de oxígeno en el sitio de lesión persisten horas después de ésta, generando: la formación de edema producto de la acumulación de fluido extracelular ( $t = 24-48$  horas) y un detrimento del rango metabólico que genera que el ambiente medular se torne predominantemente anaeróbico durante las primeras horas post-trauma (Tator and Fehlings, 1991).

Paralelamente, se observa variaciones leves en las concentraciones de los iones extracelulares (p.e.  $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) que provocan perturbaciones en la transmisión sináptica y la excitabilidad, produciendo la acumulación de  $Ca^{+2}$  intra-axonal ( $t = 30-40$  minutos) tras el traumatismo conllevando la activación de rutas de muerte neuronal (Balentine and Spector, 1977; Young and Koreh, 1986); además, la elevación de calcio intracelular estimula la liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato y aspartato, que resultan altamente nocivos para las neuronas que no han sufrido daño (Balentine and Spector, 1977; Lotan et al., 1994).

La respuesta inflamatoria iniciada pocas horas después del traumatismo medular, se mantiene por varios días. Esta respuesta incluye daño endotelial y la liberación de mediadores proinflamatorios, como: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y MIP (Alexander and Popovich, 2009). La cascada de acontecimientos iniciados por el trauma incluye cambios en la permeabilidad vascular, liberación de radicales libres, desarrollo de edema, infiltración de células inflamatorias y la pérdida progresiva de la mielina en los axones lesionados (Caballero, 2005).

Todos estos efectos se traducen en un fallo general del funcionamiento del CNS ocasionando el shock medular que se prolonga durante algunos días en animales experimentales y durante semanas en humanos (Ahn et al., 2006).

## ii) Lesión Secundaria (Fase Subaguda).

Después de la lesión sobreviene un proceso de reactivación glial como consecuencia de la necrosis, la hemorragia y la isquemia. A partir de las 24-48 hrs. el tejido cercano al área lesionada o conectado físicamente a éste presenta actividad eléctrica

y funcional deprimida, conformando la denominada zona de penumbra en la que se tendrá lugar la muerte neuronal secundaria o retrasada (Reier et al., 1983), considerando que el número de pérdidas como consecuencia de la muerte neuronal secundaria es bastante mayor que el atribuible a la muerte neuronal primaria tras la lesión.

Esta fase se caracteriza por la presencia de diferentes poblaciones celulares que van acudiendo a la zona de lesión, se observa que ocurren eventos de infiltración de células inflamatorias. En primer lugar, ocurre la infiltración de leucocitos polimorfonucleares que son capaces de migrar hacia la zona lesionada inducidos por mecanismos quimioattractivos, para luego desarrollar procesos de neurofagia y astrofagia en dicha zona (Means and Anderson, 1983; Moreno-Flores et al., 1993). En segundo lugar, monocitos-macrófagos ingresan a fagocitar el tejido muerto, proceso que puede durar desde semanas hasta meses (Ginhoux and Jung, 2014; Perry et al., 1993).

Los macrófagos, al igual que la microglía, se encargan de fagocitar la mielina, como también oligodendrocitos necróticos y apoptóticos, dando inicio al proceso de degeneración walleriana que corresponde al proceso por el cual la parte distal del axón lesionado, degenera completamente, definiendo así los cambios morfológicos que desarrolla el segmento distal axonal tras la lesión (Bruck et al., 1995). También, ocurre reactivación de la microglía que provoca que estas células adquieran morfología ameboide y carácter fagocítico (Andersson et al., 1991). La activación microglial es un proceso graduado que depende de la severidad de la lesión, y como en el resto de las lesiones, comienza en la zona central de la lesión para ir extendiéndose a través de la materia gris y blanca adyacente (Dusart and Schwab, 1994).

En la fase subaguda se inician procesos de reactividad glial, específicamente, en astrocitos y microglías. La activación astrocitaria tiene lugar varios días después de la lesión. Los astrocitos sufren cambios sucesivos a nivel molecular, celular y funcional como respuesta al daño, produciéndose hipertrofia tanto del cuerpo nuclear como de los procesos astrocitarios, como también la sobreexpresión de GFAP y vimentina (Cregg et al., 2014). En esta etapa, los astrocitos hipertrofiados proliferan y elaboran una malla extensa y gruesa



llamada cicatriz meningo-glial que es capaz de cubrir la lesión.

La cicatriz meningo-glial, es una estructura compleja a nivel molecular, ya que es capaz de producir un importante número de factores inhibitorios, tales como: CSPGs, tenascinas, semaforinas secretables y efrinas (Fitch and Silver, 2008) que son capaces de reprimir el crecimiento axonal en la zona de lesión. La formación de la cicatriz glial es partir de los 12 días post-lesión, en el caso de ratas, y alcanza su pico el día 14 y conservándose por más de un mes después de la lesión. A la cicatriz glial se asocian otros diversos tipos celulares dependiendo de la naturaleza de la lesión, de su severidad y de su localización en el CNS (Silver and Miller, 2004). Entre los subtipos celulares que se agregan a la cicatriz glial, destacan: microglía, precursores de oligodendrocitos y, en algunos casos células meníngeas, que se reclutan en la zona de lesión y participan a diferentes tiempos en la zona de lesión generando una barrera mecánica obstructiva para el crecimiento axonal (Windle and Chambers, 1950); actualmente, se ha observado que también se agregan pericitos, células perivasculares, promoviendo el sellado hermético en el tejido cicatricial (Goritz et al., 2011).

El efecto de sellado de la cicatriz glial es capaz de impedir que las fibras nerviosas crezcan nuevamente, como consecuencia de que se forma una barrera física infranqueable al crecimiento de los axones (Sofroniew, 2005). Sin embargo, diversos estudios demuestran que la eliminación de la cicatriz glial de la zona de lesión conduce a lesiones más extensas y desmielinizaciones severas (Bush et al., 1999). Así es como, la cicatriz glial tiene una función dual por una parte, como inhibidor del crecimiento axonal al actuar de barrera física y bioquímica, como por otro lado, de aislamiento protector de la zona de lesión previniendo la extensión del daño neural (Pekny et al., 2014).

Durante el daño secundario diversas células inmunes periféricas, al igual que la glía reactiva, se acumulan en la zona de lesión liberando diversas citoquinas que incluyen TNF- $\alpha$  y citoquinas que son capaces de mediar la respuesta inflamatoria (Yan et al., 2001). Así, en el caso del TNF- $\alpha$  se ha demostrado que tiene propiedades neurotóxicas como neuroprotectoras (Cheng et al., 1994; Yan et al., 2001), reflejando la gran complejidad de

la respuesta inflamatoria producida tras la lesión debido a que tiende a aceptarse que las fases tempranas de la inflamación son de naturaleza deletérea, mientras que sus eventos que tienen lugar de forma más tardía parecen ser protectores (Kwon et al., 2004).

También, tras la lesión se observa la presencia de degeneración walleriana consolidada ( $t = 21$  días) (Blight and Decrescito, 1986) que consiste en la degeneración neuronal secundaria del sistema nervioso que es capaz de causar disrupción entre el dominio somatodendrítico y axonal (Neukomm and Freeman, 2014). Esta pérdida progresiva de mielina se puede prolongar durante semanas hasta meses (Griffiths and McCulloch, 1983). No obstante, en lesiones centrales con degeneración walleriana extensiva se ha reportado regeneración axonal endógena debido a que células de Schwann, invasoras desde PNS, son capaces de liberar factores y, además, remielinizar algunos axones dañados (Beattie et al., 1997; Li and Raisman, 1994). Esto indica que la presencia de factores tróficos asociados a células gliales son capaces de inducir supervivencia y crecimiento axonal (Houle and Ye, 1997).

Es de vital importancia considerar que la barrera física y química formada por la cicatriz glial tarda en formarse entre 7 - 12 días, acorde a la especie, tiempo previo durante el cual no hay regeneración axonal en las lesiones del CNS. Por ello, se ha indicado que la presencia de moléculas asociadas a la mielina como uno de las principales limitantes para la regeneración axonal de la fisiopatología medular (Caroni et al., 1988). Por ello, considerable atención se ha dirigido al hecho de que la mielina contiene inhibidores que contribuyen a la pérdida de regeneración conforme el SNC madura (Grados-Munro and Fournier, 2003). Estudios realizados por Schwab y cols. mostraron la primera evidencia de que la acción inhibitoria de la mielina residía en su composición.

Hasta la fecha se han identificado tres proteínas inhibitorias involucradas: Nogo-A, MAG y OMgp (Schwab et al., 2005) que son capaces de interactuar en forma independiente con un mismo receptor llamado: complejo Nogo Receptor 1 o NgR1, que está formado por NgR1 y sus correceptores: Lingo1 y p75 o TROY (Zhang et al., 2008). A pesar, que las MAIs constituyen el

mayor componente inhibitorio de la mielina, se ha encontrado que los oligodendrocitos también expresan diversos proteoglicanos (p.e brevicana, versican y tenascina R) y moléculas de guía axonal (p.e semaforina 4D, efrina B3) que participarían en el proceso inhibitorio (Sandvig et al., 2004) haciendo más complejo el panorama respecto a las moléculas involucradas en el proceso inhibitorio de la regeneración del CNS.

El rol de las moléculas inhibitorias es tema de debate, ya que diversas investigaciones indican que la función de estas moléculas inhibitorias sería el de un estabilizador del sistema, y por tanto, la expresión de las moléculas inhibitorias en el adulto, más allá de impedir la regeneración axonal en el contexto de daño axonal correspondería a un mecanismo protector para preservar las complejas redes neurales formadas durante el desarrollo (Yiu and He, 2006).

### iii) Fase Crónica.

Tanto la fase aguda como la subaguda son etapas muy inestables, en las que suceden cambios de forma continuada en la composición celular y molecular de la zona lesionada. La fase crónica es el estado de la lesión más estable, a partir del cual ya no se espera observar grandes cambios histológicos ni funcionales en la especie lesionada. El intervalo de tiempo a partir del cual una lesión alcanza su estado crónico depende del tipo de lesión y de la especie asociada. En animales en experimentación, aproximadamente a partir del tercer mes, las células inflamatorias han desaparecido, dejando una cavidad cística centromedular, carente de células, rellena de líquido cefalorraquídeo y rodeada por la glía reactiva cicatricial (Hill et al., 2001).

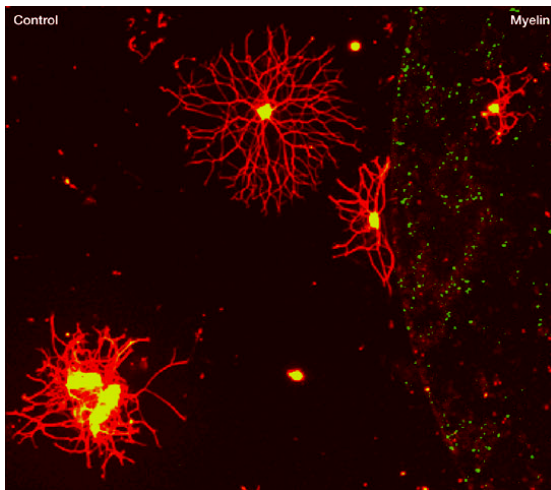
Paralelamente, a lo largo de la lesión medular el CNS presenta cambios endógenos en la neuronas que a medida que maduran pueden contribuir en la pérdida gradual de la regeneración (Horner and Gage, 2000). Estos cambios se pueden resumir en tres grupos: (i) una disminución en la expresión de los niveles de moléculas promotoras del crecimiento (GAP), como: GAP-43 y CAP-23; (ii) la expresión de inhibidores del crecimiento axonal (p.e. PTEN); y (iii) cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares (Mar et al., 2014; Selzer, 2003).

Por ello, la sistematización temporal de los efectos moleculares y celulares tras una lesión del CNS, tanto factores intrínsecos como extrínsecos, es crucial en la comprensión de las lesiones del CNS debido a que permite tener noción espacio-temporal de en que momento se deben aplicar los diversos tratamientos moleculares/celulares (p.e terapia celular, fármacos específicos, agentes antioxidantes y antiinflamatorios) en pos de impedir la represión regenerativa del CNS (Bovolenta et al., 1993).

# Inhibidores de la regeneración en el CNS

## Inhibidores Asociados a la Mielina.

La mielina se postuló como el primer factor que podría estar involucrado en la inhibición axonal, tras observar que las neuronas del CNS podían crecer ampliamente sólo en las regiones de materia gris cerebral (Carbonetto et al., 1987), aunque esta diferencia podría ser producto de la falta de sustratos permisivos en la materia blanca. Posteriormente, investigaciones realizadas por Schwab y Caroni utilizando neuronas de la raíz dorsal (DRGs) cultivadas con oligodendrocitos maduros o mielina purificada extraída de cerebros observaron que las neuronas no eran capaces de promover extensión de sus procesos neuríticos (Schwab and Caroni, 1988). Es más, otros estudios complementaban la hipótesis del posible rol inhibidor de la mielina en el proceso regenerativo al identificar que si se retrasa la mielinización en etapas post-natales se observa que una extensión del período en el cual los axones jóvenes son capaces de regenerar (Keirstead et al., 1992).



**Figura 16. Mielina inhibidor del CNS.** Bajo condiciones de cultivo favorable, DRGs extienden sus neuritas (en rojo). En el mismo cultivo, las neuronas sembradas sobre la mielina marcada con microesferas (en verde) presentan alteraciones en la morfología de sus neuritas. *From Lee et al. 2003.*

Así es como a finales de los años 80s se planteó que la mielina contenía inhibidores capaces de contribuir a la pérdida de regeneración en el CNS maduro. Schwab y cols. desarrollaron trabajos pioneros que establecen las primeras evidencias de que la mielina presenta fuertes propiedades inhibitorias debido a la presencia de proteínas específicas que serían parte de su composición estructural (Caroni and Schwab, 1988).

Estos investigadores generaron un anticuerpo monoclonal, denominado IN-1, obtenido contra una proteína de la mielina desconocida en aquel momento (que inhibe el crecimiento axonal) el cual fue capaz de bloquear, en parte, la inhibición inducida por la mielina. La clonación del epítipo reconocido por IN-1 condujo a la identificación de la primera proteína inhibitoria asociada a la mielina: Nogo-A y su homólogo Nogo-B (Spillmann et al., 1998).

Actualmente, se ha encontrado en preparaciones de mielina que su acción inhibitoria se debe a tres proteínas asociadas a la mielina: Nogo-A, MAG y OMgp (Schwab et al., 2005), como también debido a la presencia de lípidos asociados a la mielina del CNS (Winzeler et al., 2011).

## Proteínas inhibitorias asociadas a la mielina.

**Nogo-A** también conocida como reticulón 4, es el transcrito de mayor tamaño del gen nogo (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000). Este gen codifica putativamente para siete proteínas por corte y empalme alternativo (del inglés, Alternative Splicing), aunque sólo tres son finalmente transcritas en el SNC: Nogo-A, Nogo-B y Nogo-C (Dodd et al., 2005; Hunt et al., 2003; Oertle et al., 2003).

Nogo-A, -B y -C pertenecen a una familia de proteínas que se localizan en el retículo endoplasmático (ER), por lo que reciben el nombre de



familia Reticulón (RTN). Las proteínas RTN se expresan de forma ubicua en vertebrados (Oertle and Schwab, 2003). Nogo-A se expresa principalmente en el SNC, pero también en testículos y en el corazón en niveles más bajos. Nogo-B tiene una amplia distribución, tanto en SNC como en SNP, y Nogo-C se expresa fundamentalmente en músculo esquelético, aunque también en cerebro y corazón (Huber et al., 2002). Estructuralmente, las tres proteínas comparten de un extremo amino terminal y dos dominios transmembrana (Oertle et al., 2003) que están separados por un fragmento de 66 aminoácidos (AA) conocido como Nogo-66 (loop-66 AA).

Nogo-A es una proteína transmembrana presente en oligodendrocitos, neuronas y fibroblastos (Dodd et al., 2005). En el sistema nervioso, Nogo-A se expresa en oligodendrocitos, pero no en células de Schwann (Chen et al., 2000), en diversos tipos neuronales del sistema nervioso en desarrollo y adulto (Gil et al., 2006; Mingorance et al., 2004; Tozaki et al., 2002). Se ha descrito la presencia de Nogo-A en neuronas adultas de médula espinal, de ganglios de la raíz dorsal, hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, corteza piriforme, núcleo oculomotor y núcleo trigeminal pontino (Huber et al., 2002; Hunt et al., 2003). Su patrón de expresión aumenta desde estadios embrionarios hasta estadios adultos (Mingorance et al., 2004).

Se han propuesto varias funciones para el pool intracelular de Nogo-A, que incluyen: una función reguladora de en la formación y distribución del retículo endoplasmático (Voeltz et al., 2006), una función inhibitoria del crecimiento axonal en el CNS adulto (Fournier et al., 2001), su participación en la migración neuronal y neuritogénesis durante el desarrollo (Tozaki et al., 2002), la regulación del tráfico vesicular (Dodd et al., 2005; Oertle et al., 2003; Steiner et al., 2004), su actuación, como canales iónicos, poros y transportadores de membrana (Dodd et al., 2005) y la regulación de la apoptosis (Watari and Yutsudo, 2003). Sin embargo, se debe considerar que la expresión de Nogo-A, ya sea en el retículo como en la membrana plasmática (tan sólo el 1% con respecto su expresión total celular) podría ejercer funciones diferentes según el tipo celular y su localización subcelular (Dodd et al., 2005; Oertle et al., 2003).

La expresión de Nogo-A en oligodendrocitos en el CNS adulto inhibe el crecimiento neurítico y la regeneración mediante la exposición de sus dominios inhibitorios (Dodd et al., 2005; Oertle et al., 2003). La función inhibitoria de Nogo-A viene determinada por dominios específicos capaces de inhibir el crecimiento neurítico: el dominio Nogo-66 que se encuentra en el dominio extracelular y diversos dominios inhibitorios de amino-Nogo (NiG) que se localizan en la parte intracelular de la membrana plasmática. Nogo-66 es una región de 66 aminoácidos flanqueada por las dos regiones transmembrana. Puesto que esta región está presente en las tres isoformas, Nogo-A, -B y -C, las tres isoformas de Nogo tienen potencialmente propiedades inhibitorias para el crecimiento axonal. El dominio Nogo-66 inhibe el crecimiento axonal mediante la unión a NgR1, mientras que el dominio NiG supuestamente lo haría mediante su unión a distintas integrinas (Hu and Strittmatter, 2008). También, se ha determinado un tercer dominio inhibitorio, localizado en la región N-terminal común para Nogo-A/B que puede inhibir la dispersión de células 3T3, pero que carece de efecto en neuronas (Oertle et al., 2003).

**Glucoproteína glial asociada a la mielina (MAG)** se localiza en la superficie de células mielinizantes: oligodendrocitos del SNC y células de Schwann del SNP (McKerracher et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1994). Sin embargo, aunque MAG sólo representa el 0,1% de las proteínas de la mielina periférica, en la mielina del SNC constituye uno de sus principales componentes (1% de la proteína total) (Trapp, 1990).

MAG es miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulinas. Existen dos isoformas de MAG, generadas por corte y empalme alternativo, S-MAG y L-MAG, que aparecen con un peso molecular de 67 y 71 kDa respectivamente, tras ser deglicosiladas. Ambas moléculas comparten la región N-terminal formada por 5 dominios Ig extracelulares y un dominio transmembrana, pero difieren en su dominio intracelular.

MAG es una proteína bifuncional, cuyo efecto en el crecimiento neurítico depende del tipo celular con el que contacta y de la edad de las células. Por ejemplo, en neuronas neonatales de DRGs promueve el crecimiento neurítico, mien-

tras que en estadios adultos inhibe su crecimiento (Mukhopadhyay et al., 1994). Sin embargo, aunque se desconocen las bases moleculares que expliquen este cambio de función promotora a función inhibitoria del crecimiento neurítico, algunos estudios señalan que el efecto inhibitorio de MAG se encontraría mediado por un mecanismo regulador de los niveles de AMPc en las neuronas (Cai et al., 2002). Experimentalmente, cultivos primarios de neuronas sobre extractos de mielina central MAG-inmunodepletada (McKerracher et al., 1994) o MAG desnaturizada (Li et al., 1996) se ha observado recuperación parcial del efecto inhibitorio del crecimiento y el colapso axonal.

La actividad inhibitoria de MAG sobre el crecimiento axonal es a través de la interacción con el complejo receptor Nogo1 (NgR1), no obstante, también se ha demostrado que es capaz de interactuar con NgR2, los gangliósidos GT1b e integrina  $\beta 1$  (Venkatesh et al., 2005; Vinson et al., 2001; Vyas et al., 2002). La unión de MAG a la superficie neuronal es de manera dependiente del ácido neuramínico y, por ello, es sensible a neuraminidasa (DeBellard et al., 1996) para los receptores NgR2 y GT1b (Venkatesh et al., 2005; Vyas and Schnaar, 2001), pero no así para NgR1.

Una característica que diferencia MAG de las otras proteínas inhibitorias de la mielina (Nogo-A y OMgp) es un fragmento proteolítico, denominado dMAG, que se libera a partir de la mielina *in vivo* (Yim and Quarles, 1992). Este fragmento, que consiste en el dominio extracelular completo de MAG, inhibe la regeneración axonal *in vitro* (Tang et al., 1997). Interesantemente, se ha demostrado que factores secretados a partir de la materia blanca dañada inhiben el crecimiento axonal en ensayos de colágeno, como también que el uso de anticuerpos contra MAG en estos ensayos neutralizan esta inhibición (Tang et al., 2001).

También se ha sugerido que funcionalmente ejerce un papel clave en los estadios iniciales de la mielinización y en el mantenimiento de las vainas de mielina, especialmente en el PNS (Schachner and Bartsch, 2000) localizándose de manera restringida en la región periaxonal, en contacto con los axones mielinizados, como en la región paranodal de las vainas de mielina. Debido a esta localización se ha propuesto que MAG participa en la

estabilización de los contactos entre los axones y los procesos gliales, siendo necesaria para el mantenimiento y supervivencia de algunos axones ya que los ratones MAG-deficientes muestran atrofia axonal (Quarles, 2009).

**Glucoproteína mielínica oligodendrocítica (OMgp)** es la proteína menos conocida de las tres inhibitorias asociadas a mielina, a pesar de que fue la primera en ser descrita (Mikol and Stefansson, 1988). Fue identificada en extractos de sustancia blanca humana y cultivos de oligodendrocitos de oveja y recibe su nombre por su localización específica en la mielina del SNC.

OMgp se describió inicialmente en oligodendrocitos, pero posteriormente se mostró que su localización mayoritaria se daba en neuronas (Gil et al., 2010; Habib et al., 1998). En concreto, se ha descrito que en el adulto esta presente en neuronas de proyección como en neuronas piramidales del hipocampo, neuronas de Purkinje del cerebelo, neuronas del hipotálamo y motoneuronas del tronco cerebral. El patrón temporal de expresión de OMgp ha sido caracterizado durante el desarrollo postnatal del SNC y muestra un aumento progresivo desde el nacimiento hasta el adulto (Habib et al., 1998; Vourc'h and Andres, 2004).

La proteína madura consiste en un polipéptido de 401 aminoácidos (aunque la forma inmadura consta de 440), distribuidos en cuatro dominios: un dominio N-terminal rico en residuos Cisteína, seguido de un dominio rico en residuos de Leucina (LRR), un dominio rico en residuos Serina-Treonina y un grupo glucosilfosfatidil inositol (GPI) por el cual se ancla a membrana plasmática (Mikol et al., 1990). El dominio más importante para su función es el dominio LRR, que consiste en 8 repeticiones en tándem de residuos leucina (Vourc'h and Andres, 2004) y que se caracteriza por ser la región que permite que OMgp interactúe con NgR1 iniciando la transducción de señal en el proceso de inhibición del proceso de crecimiento axonal (Wang et al., 2002a).

OMgp se sugiere que funcionalmente también se encuentra implicada en procesos de inhibición de la proliferación celular (Habib et al., 1998), la formación de nodos de Ranvier y en el proceso de mielinización (Huang et al., 2005).

### Lípidos inhibitorios asociados a la mielina.

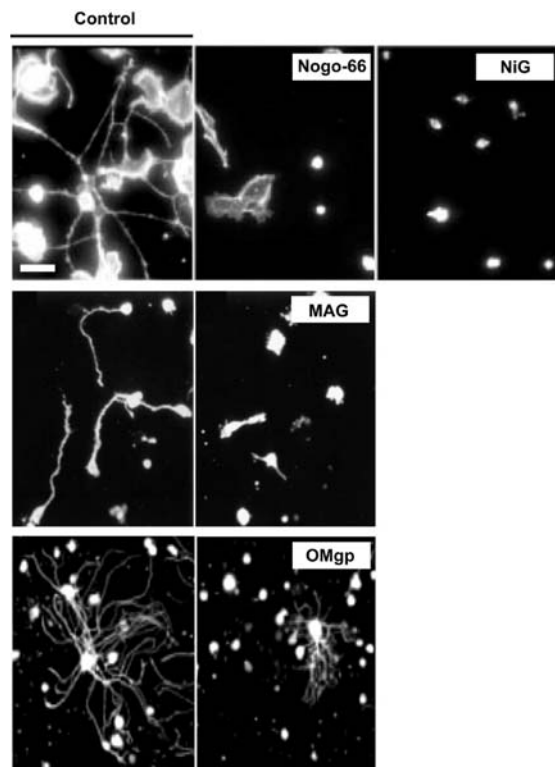
Aunque ya ha sido identificado un triplete de proteínas presentes en la mielina (p.e Nogo-A, MAG, OMgp) como inhibidores de la regeneración axonal, los estudios con ratones KO para éstos sugieren la presencia de inhibidores adicionales en la mielina del CNS (Cafferty et al., 2010; Lee et al., 2010). A pesar de que la búsqueda se ha realizado en las proteínas, el componente mayoritario de la mielina en el CNS, con un 70-75% del peso seco, son lípidos (Norton and Poduslo, 1973).

Wizeler y cols. han descrito que los sulfátidos, glicoesfingolípidos de la mielina del CNS, son inhibidores del crecimiento de neuritas en DRGs (Winzeler et al., 2011), como también, han observado que la transferasa C3 es capaz de inhibir el efecto de los sulfátidos (Winzeler et al., 2011). Aunque, los lípidos más abundantes de la mielina (p.e. los cerebrósidos) no son inhibitorios, sigue

siendo probable que otros lípidos también contribuyan a las propiedades inhibitorias de la mielina (Winzeler et al., 2011).

### Receptores de las proteínas inhibitorias de la mielina.

A pesar de que Nogo-A, MAG y OMgp poseen diferencias drásticas estructurales es altamente llamativo que todas son capaces de interactuar con el mismo complejo receptor, complejo NgR1 y desencadenar su efecto inhibitor del proceso regenerativo en el SNC. El hecho de que las tres proteínas desencadenen su mayor cascada de señalización a través de un receptor común, ha llevado a los investigadores a desarrollar la hipótesis de que MAG, Nogo-A y OMgp juegan un papeles redundantes en la restricción de la regeneración axonal (Filbin, 2003). No obstante, paralelamente se debe considerar que existen otros receptores capaces de interactuar con las MAIs, entre los que destacan hasta la fecha: PirB, diversas integrinas y gangliósidos.



**Figura 17. Proteínas inhibitorias asociadas a la mielina.** (a) DRGs E12 pollo sobre superficie con diferentes sustratos (control, Nogo-66, Amino-Nogo); (b) Neuronas cerebelares disociadas sobre diferentes sustratos (control, MAG); (c) DRGs de 25 días post-natal sobre diferentes sustratos (control, OMgp). From Fournier et al. 2001; Tang et al. 1997; Chivatakarn et al, 2007.

### Complejo Receptor NgR1.

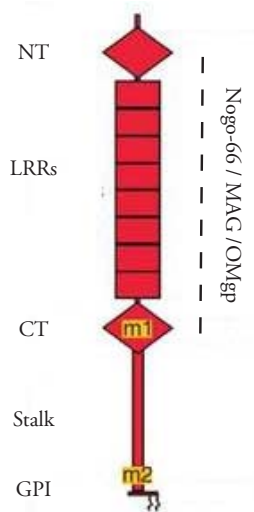
NgR1 es una proteína de 473 aminoácidos (AA), codificada por el gen ngr, se encuentra anclada a la membrana mediante un dominio GPI asociada a balsas lipídicas (del inglés, Lipids Rafts) (Fournier et al., 2001). Está estructuralmente conformada por: un dominio N-terminal rico en leucina (LRR-NT), ocho dominios LRR, un dominio C-terminal rico en cisteína (LRR-CT) y un dominio C-terminal de unión a GPI (Barton et al., 2003).

Adicionalmente, se sabe existen dos homólogos, NgR2 y NgR3, para NgR1 en ratón y humano que muestran homología entre ellos en un 55% y un 45% de identidad con respecto a NgR1 (Pignot et al., 2003). Aunque comparten propiedades estructurales y un patrón de expresión similar, se ha descrito que NgR2 puede interactuar con MAG, pero no así con Nogo-A ni OMgp; mientras que NgR3 puede interactuar con los proteoglicanos del tipo condroitín sulfato.

Los niveles de expresión de NgR1 van aumentando con el desarrollo siendo preferencial en las regiones del axón y el terminal sináptico (Wang

et al., 2002b); observándose expresión diferencial para cada población neuronal del CNS (Josephson et al., 2002). En el adulto, está presente en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, el cerebelo y la médula espinal tanto en ratones como humanos (Funahashi et al., 2008; Josephson et al., 2002). El hecho de que NgR1 no se exprese idénticamente en todas las poblaciones neuronales del SNC adulto es indicativo de la existencia de otros receptores para las MAIs (Hunt et al., 2002).

Se han llevado a cabo diversos análisis de mutagénesis funcional para identificar aquellos dominios implicados en la unión a ligandos y correceptores. En primer lugar, se describió que todos los dominios LRR eran necesarios para la unión a Nogo-66 (Fournier et al., 2001), sin embargo, Wang demostró que para la unión a Nogo-66 se requiere el dominio LRR-CT. Para la unión a OMgp se necesita a los dominios LRR y LRR-CT (Wang et al., 2002a), mientras que para el caso de MAG al competir con Nogo-66 por la unión a NgR1, se ha sugerido que MAG se une también al dominio LRR-CT (Domeniconi et al., 2002). Por otro lado, el grupo GPI permite que NgR1 se localice en balsas lipídicas y proporciona una zona de escisión, por la cual se libera el fragmento NgR soluble denominado NgR1(Ecto). Este fragmento soluble puede antagonizar los efectos inhibitorios de Nogo-66 o de la mielina y tiene afinidad por NgR1 de superficie celular, debido a que puede formar homodímeros in vivo (Fournier et al., 2002).



**Figura 18. Esquema de NgR1.** Estructura de NgR1 y sus regiones de interacción con las proteínas inhibitorias de la mielina. From Dickendesher et al., 2011.

Actualmente, se han caracterizado nuevos ligandos endógenos para NgR1, además de las proteínas inhibitorias de la mielina (Nogo-A, MAG y OMgp), tales como: la proteína BlyS, la proteína LGI1 y la proteína LOTUS.

- (i) La proteína BlyS interactúa con NgR1 e inhibe el crecimiento neurítico en DRG, esta proteína se expresa en la zona de lesión medular en astrocitos, microglías y macrófagos (Zhang et al., 2009).
- (ii) La proteína LGI1 es capaz de unirse a NgR1 y posee homología con los miembros de la familia Slits. Esta proteína tiene un efecto regulador indirecto y opuesto a las MAIs debido a que incrementa el crecimiento axonal y evita su colapso en neuronas procedentes de los ganglios de la raíz dorsal sobre substratos de mielina (Thomas et al., 2010).
- (iii) La proteína LOTUS interacciona con NgR1 y actúa como un antagonista de NgR pudiendo ser crucial en la formación del tracto lateral olfatorio. Se ha observado que LOTUS suprime la interacción Nogo-NgR1 atenuando el colapso de los conos de crecimiento en neuronas de DRGs (Sato et al., 2011).

La falta de un dominio intracelular de NgR1 capaz de transducir la señal desencadenada por su unión a diferentes ligandos, sugería la existencia de otras moléculas correceptoras. Así como se identificaron como correceptores para NgR1 tres diferentes proteínas: Lingo-1, TROY o p75<sup>NTR</sup>.

p75<sup>NTR</sup> es una proteína receptora perteneciente a la superfamilia TNFR. La proteína p75<sup>NTR</sup> (75 kDa) consiste en una región extracelular con cuatro dominios IgG ricos en cisteína, una región transmembrana y una región intracelular con dominio de muerte (DD). Esta región intracelular no presenta actividad enzimática intrínseca, por lo que contiene motivos de unión a otros receptores o proteínas efectoras (Gruss and Dower, 1995).

p75<sup>NTR</sup> se expresa ampliamente durante el desarrollo del CNS y PNS, pero sus niveles de expresión disminuyen dramáticamente con la edad, también se expresa en diversas poblaciones gliales, como oligodendrocitos y células de Schwann, especialmente durante el desarrollo y tras lesión, y aunque son pocos los estudios focalizados en la función glial de esta proteína se piensa que puede, quizás, ejercer algún papel en la mielinización (Chen et al., 2009).



**TROY** también conocida como TAJ, es miembro de la familia TNFR. Es una proteína transmembrana (45 kDa) de 416 AA con dominios ricos en cisteína en la región extracelular, en su región citoplasmática posee una secuencia de unión a TRAF2, pero a diferencia de p75NTR no contiene dominio de muerte (Kojima et al., 2000). En el SNC en desarrollo, TROY se expresa fuertemente regiones de corteza cerebral, tálamo e hipocampo, pero disminuye hacia estadios más tardíos de la neurogénesis (Hisaoka et al., 2003). Además, a diferencia de p75NTR, la cual se expresa sólo en determinadas poblaciones neuronales, TROY se expresa ampliamente en diversos tipos celulares del cerebro incluyendo neuronas, astrocitos, microglía y células de la glía envolvente (Hisaoka et al., 2006).

TROY fue identificado como un co-receptor de NgR, éste puede funcionalmente sustituir a p75 durante la señalización en el proceso de inhibición del crecimiento neurítico y la regulación de Rho tras la activación por MAIs (Park et al., 2005; Shao et al., 2005). TROY también podría estar actuando en procesos de proliferación y diferenciación astrogliol (Hisaoka et al., 2006).

**Lingo-1** es una proteína transmembrana codificada por el gen *lrrn6a*. Diversos estudios han mostrado que el mRNA de Lingo-1 se expresa exclusivamente en el CNS, durante el desarrollo y en estadios adultos de rata y ratón (Mi et al., 2005). Es una proteína con un dominio extracelular que contiene un dominio Ig y LRR, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que está involucrado en eventos de señalización, río abajo, para las MAIs. Hasta la fecha, la función de Lingo-1 no está bien definida, pero su presencia en el complejo NgR es necesaria para la inhibición del crecimiento de neuritas y la regulación de las GTPasas Rho (Mi et al., 2004).

Sin embargo, el patrón de expresión de Lingo-1 después de la lesión es inconsistente con su función propuesta debido a que no aumenta hasta 14 días después de la lesión (Mi et al., 2004). Es probable que otro(s) correceptores se expresen en la etapa aguda de lesión; se ha demostrado que los niveles de expresión son significativamente mayores en AMIGO-3 con respecto Lingo-1 en las lesiones espinales en la etapa aguda (Ahmed et al., 2013). Así es como, AMIGO-3 posible-

mente interactuaría funcionalmente con NgR1 como sustituto de Lingo-1 inmediatamente después de una lesión medular formando un complejo NgR1-p75/TROY-AMIGO3 (Ahmed et al., 2013).

### **PirB**

PirB es una proteína transmembrana de la familia PIR, receptores asociados al sistema inmune, compuesto por seis dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y un polipéptido intracelular que alberga cuatro ITIMs (Atwal et al., 2008). Se expresa en neuronas de diversas regiones cerebrales y su expresión es coincidente con períodos de alta plasticidad sináptica durante el desarrollo (Boulanger, 2009). PirB se ha demostrado que es capaz de unirse a MAG, Nogo-66 y OMgp con gran afinidad, se ha observado que la supresión de la actividad endógena de PirB mediante anticuerpos bloqueantes es capaz de rescatar parcialmente el efecto inhibitorio del crecimiento neurítico provocado por extractos de mielina o MAIs en neuronas granulares del cerebelo (Atwal et al., 2008).

### **Integrina $\beta 1$ .**

Las integrinas forman la principal familia de receptores de adhesión celular. Se encuentran en la superficie celular y son el principal recurso que tienen las células para interactuar con la matriz extracelular o entre las mismas células. Las integrinas son receptores proteínicos que consisten en dos subunidades, una glicoproteína transmembrana  $\alpha$  y otra  $\beta$  que forman un complejo no covalente. Cada subunidad contiene un gran dominio extracelular y otro pequeño citoplasmático. Actualmente se conoce 16 tipos de subunidades  $\alpha$  y 8 tipos de tipo  $\beta$ , la combinación de las cuales genera las 22 integrinas conocidas.

Las integrinas  $\beta 1$  tienen receptores para varios componentes matriciales, que incluyen fibronectina, colágeno II y VI interactuando en la adhesión de la célula con la matriz. Estudios de Goh y cols. han demostrado que integrina  $\beta 1$  actúa como receptor para MAG mediante la respuesta de conos de crecimiento en neuronas de mamíferos, independiente de NgR, tanto en etapas embrionarias como adultas mediante la activación de FAK (Goh et al., 2008).

## LRP1.

LRP1 es un tipo de receptor transmembrana que se une más de 40 ligandos estructural y funcionalmente distintos, proceso que es mediado por endocitosis y entrega al lisosoma (Strickland et al., 2002). LRP1 también está asociado a funciones macrofagocíticas, como por ejemplo, en la caso de los restos de mielina (Gaultier et al., 2009). Se expresa en neuronas del CNS y PNS estando parcialmente localizado en los axones y conos de crecimiento (Bu et al., 1994; Steuble et al., 2010). LRP1 regula mediante señalización celular, en conjunto, a diversos correceptores, que incluyen los receptores para PDGF, uroquinasa (uPAR), Trk, Frizzled-1 y TNFR1. Dada la diversidad de los correceptores es razonable la hipótesis de que la actividad de LRP1 en la señalización celular puede ser ligando-específica o célula-específica (Gonias and Campana, 2014). Stiles y cols. demostraron que la mielina fagocitada por la vía LRP1, probablemente, estaría involucrada en nuevo proceso de inhibición axonal mediado por mielina (Stiles et al., 2013). En este estudio se demuestra que LRP1 podría ser esencial en la inhibición del crecimiento axonal de neuritas mediante activación por mielina o MAG, y posiblemente también, a través de Nogo-A y OMgp (Stiles et al., 2013).

## Gangliósido GT1b.

Los gangliósidos son glicoproteínas complejas que contienen un grupo oligosacárido que tiene uno o varios residuos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); son compuestos anfipáticos con una carga negativa a pH fisiológico. Los gangliósidos constituyen el 6% de los lípidos de membrana de la materia gris del cerebro en humanos. Se presentan en la zona externa de la membrana plasmática y sirven para reconocimiento celular, y por ello, se les considera como receptores de membrana.

El hecho que MAG, sea una proteína de membrana que se ancle a ácido siálico sugirió que los gangliósidos podrían servir como receptores mediando la respuesta axonal. Vinson y cols. demostraron que GT1b, uno de los gangliósidos más expresados en el cerebro, era capaz de bloquear la capacidad de dMAG para inhibir el crecimiento

de neuritas cuando era agregado al medio extracelular (Vinson et al., 2001), pudiendo interpretarse que GTb1 es un posible receptor del mecanismo para la inhibición mediada por MAG.

## Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PG) son glicoproteínas, exclusivos de células animales (Wilson, 2004), altamente glucosiladas que forman parte de la matriz extracelular. Son sintetizados, a nivel nervioso, por los astrocitos, las células meníngeas y los oligodendrocitos (Shearer et al., 2003; Silver and Miller, 2004). Los PGs son producidos por células de mamíferos superiores siendo capaces de actuar a tres niveles: secretados hacia la matriz extracelular, anclados en las membranas celulares o acumulados en gránulos intracelulares para su posterior secreción al medio extracelular (Sandvig et al., 2004). Estructuralmente, constan de una estructura central proteica denominada proteína núcleo que se encuentra unida covalentemente a cadenas repetidas de glicosaminoglicanos (GAGs) (Esko et al., 2009; Mikami and Kitagawa, 2013). Los GAGs no se unen indiscriminadamente a cualquier proteína núcleo, de lo que se deduce que debe existir un mecanismo biosintético que permita a las células discriminar entre los diferentes tipos de GAGs. El mecanismo exacto de control permanece desconocido (Zhang and Esko, 1994).

Los GAGs son cadenas largas de polisacáridos lineales que están constituidos por la repetición de un disacárido compuesto a su vez por un aminoazúcar (N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina) y ácido urónico (ácido glucurónico y/o ácido idurónico), de carga negativa, capaz de interactuar con diferentes ligando (Linhardt and Toi-da, 2004), aunque existen PGs en que la proteína núcleo es la encargada de participar en el proceso (Ruoslahti and Yamaguchi, 1991). Los GAGs se pueden ilustrar esquemáticamente de la manera siguiente, A-B-A-B-A donde A y B representan un sacárido diferente (Iozzo, 1998). El grado y la distribución de sulfatado de la molécula, junto con la longitud del polímero, determina las propiedades físicas, químicas y biológicas del glicosaminoglicano (Volpi and Tarugi, 1999). Estructuralmente, existen cuatro clases de disacáridos que son capaces de interactuar con la proteína núcleo: condroitín sulfato (CS), heparán sulfato (HS), dermatán

sulfato (DS) y queratán sulfato (KS) (Bandtlow and Zimmermann, 2000).

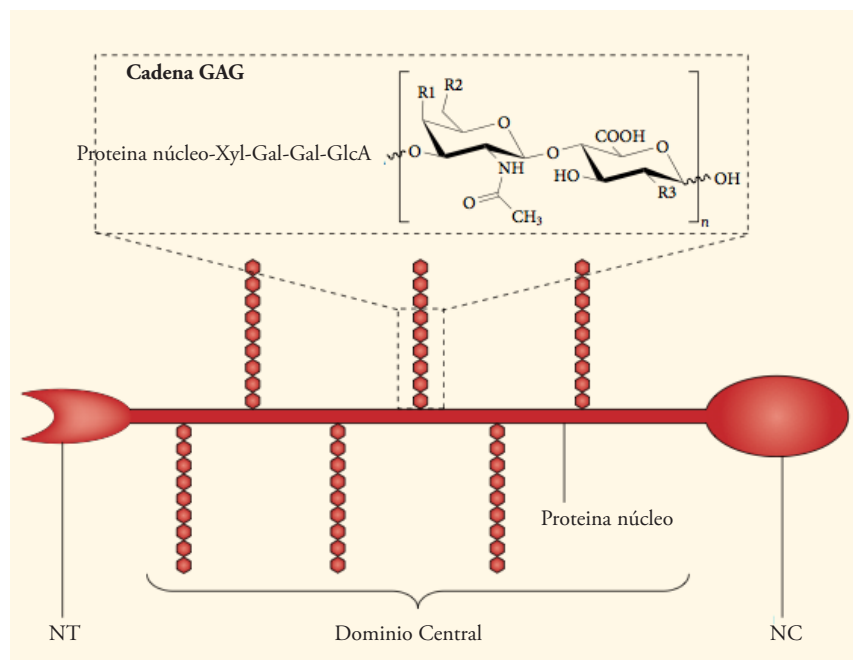
Los proteoglicanos, del tipo CSPG, en el sistema nervioso, participan en diversos eventos celulares como la migración, la diferenciación, la proliferación, el crecimiento axonal, la sinaptogénesis y la polaridad neuronal (Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000; Galtrey and Fawcett, 2007; Schwartz and Domowicz, 2004) desarrollando un papel fundamental en la morfogénesis, la citoarquitectura y el mantenimiento del SNC tanto en etapas de desarrollo, como en el organismo adulto (Kwok et al., 2012).

Durante el desarrollo del CNS, los CSPG participan en la modulación de la migración neuronal, tanto promoviéndola como inhibiéndola, dependiendo del tipo neuronal con el que interactúan, de su concentración y la presencia de otras moléculas (Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000). Los CSPGs en el sistema nervioso se expresan como: moléculas secretables (p.e. neurocano, fosfocano), moléculas ancladas a la membrana mediante un dominio GPI (p.e. brevicano) y moléculas transmembrana (p.e. NG2) (Sandvig et al., 2004).

La respuesta del CNS adulto al daño neuronal produce, durante las primeras 24 hrs., una o-

breexpresión de los niveles de CSPG, particularmente neurocano, versicano y brevicano que son producidos por los astrocitos reactivos, las células precursoras de los oligodendrocitos, como además, por células meníngeas si es que el daño compromete zona superficial (Shearer et al., 2003), donde la presencia de estas glicoproteínas puede persistir durante meses, produciendo inhibición del crecimiento axonal (Carulli et al., 2005; Morgenstern et al., 2002) debido al efecto repulsivo de éstos ya sea mediante sus cadenas sulfatadas o su núcleo proteico (Bartus et al., 2012).

Aunque el efecto inhibitor del CSPG en la regeneración neuronal y plasticidad se conoce desde hace años (McKeon et al., 1991; Snow et al., 1990), los mecanismos moleculares subyacentes todavía no son bien comprendidos. Se han propuesto varios mecanismos generales, que incluyen: (i) la unión a receptores funcionales en la membrana de la neurona, hasta el momento se han reportado varios receptores para los CSPG, que incluyen: PTP $\sigma$ , LAR fosfatasa, NgR1 y NgR3 (Dickendesher et al., 2012; Fisher et al., 2011; Shen et al., 2009), (ii) formación de una red perineuronal no-permisiva que causa un obstáculo estérico en las moléculas promotoras de crecimiento, como: laminina e integrinas y (iii) la facilitación de los efectos inhibitorios en algunas moléculas quimiorepulsivas (Sharma et al., 2012).



**Figura 19. Composición del CSPG.** Los CSPGs están estructuralmente formados por una proteína núcleo unida a cadenas laterales de GAGs. Los CSPGs en el CNS se dividen en tres familias: lectinas (agrecan, brevicano, neurocano y versicano), fosfocano y NG2. *From Lau et al, 2013.*

## Moléculas de guía axonal.

Estudios bioquímicos y genéticos han conducido a la identificación de una muy conservada familia de moléculas de guía axonal, entre las que destacan: semaforinas, netrinas, slits y efrinas. No obstante, estas no son las únicas moléculas de guía axonal conocidas, pero son las más comprendidas hasta la fecha (Dickson, 2002).

### Semaforinas.

Corresponden a una gran familia de proteínas secretables y transmembrana que participan en funciones de migración celular, direccionamiento axonal, formación sináptica, el crecimiento vascular, la regulación de células inmunes y la progresión tumoral (Kruger et al., 2005) En el sistema nervioso, las semaforinas secretadas actúan de forma inhibitoria sobre el axón al rodear la trayectoria del axón suprimiendo que este tenga acceso a zonas específicas. Estas funciones no sólo son cruciales durante el desarrollo del embrión sino también en el adulto, controlando la trayectoria del axón después de una lesión (Artigiani et al., 1999). Las semaforinas transmembranas (asociadas a glicoproteínas), pueden también enviar señales al dominio extracelular o viceversa al recibir diversas señales funcionando como receptores.

En SCI en adultos, se ha observado que Sema3A es secretada por células meníngeas y fibroblastos en la cicatriz glial y que se podría ver incrementada por la presencia de la cicatriz glial de una manera CSPG-dependiente (Pasterkamp and Verhaagen, 2006); también se sobreexpresa en lesiones del sistema olfativo, corteza cerebral y vía perforante produciendo colapso axonal (Pasterkamp et al., 1999). Por lo tanto, en lesiones en edad adulta la presencia de sema3A probablemente contribuye al ambiente inhibitorio de la zona de lesión impidiendo el recrecimiento de axones dañados (Sandvig et al., 2004).

Además, de sema3A se ha observado que otras semaforinas están asociadas a lesiones del tejido nervioso, así por ejemplo, la sema4D es transitoriamente sobreexpresada en las proximidades de la lesión en el caso de daño en medula espinal siendo capaz de inhibir el crecimiento de neuritas postnatales cerebelares y sensoriales en estudios *in vitro* (Moreau-Fauvarque et al., 2003), la Sema7A

es expresada en la sustancia blanca de la medula espinal (Pasterkamp et al., 1999), la sema5A, en lesiones del nervio óptico, se expresa en oligodendrocitos después de axotomía, produciendo el colapso y la inhibición del crecimiento de axones retinales (Goldberg et al., 2004) y la Sema6B se sobreexpresa cerca del lugar de la lesión después de transección en ratas adultas (Kury et al., 2004).

### Netrinas.

La familia de las netrinas está compuesta por un conjunto de proteínas secretables tradicionalmente relacionadas con la guía de axones durante el desarrollo del sistema nervioso (Lai Wing Sun et al., 2011). El miembro que da nombre a la familia, netrina-1, fue identificada en el cerebro de pollo como una molécula de actividad quimiotáctica y promotora del crecimiento axonal a nivel de la placa de suelo de la médula espinal (Kennedy et al., 1994). Este ligando bifuncional es capaz de atraer como repeler el crecimiento axonal en el SNC mediante la interacción con el receptor DDC durante el proceso de atracción axonal (Finger et al., 2002; Tessier-Lavigne et al., 1988) y mediante la interacción con el receptor UNC5 en el proceso de repulsión axonal (Leonardo et al., 1997).

La repulsión mediada por netrina-1 no solo requiere de la expresión en el axón de un receptor UNC5 sino, que en muchos casos, también requiere de la formación de un complejo receptor entre DCC y UNC5 (Hedgecock et al., 1990). El hecho de que Netrina-1 sea expresada por los oligodendrocitos maduros en la médula espinal en adulto (Manitt et al., 2001), considerando el efecto negativo de los oligodendrocitos en procesos regenerativos en el CNS, ha conllevado a obtener actualmente evidencias funcionales de su función como inhibidor de la regeneración axonal en la médula (Low et al., 2008).

### Slits.

Son proteínas difusibles que participan en múltiples aspectos del desarrollo neural, como los procesos de guía axonal (Brose et al., 1999; Plump et al., 2002) y migración neuronal (Lopez-Bendito et al., 2007; Marin et al., 2003). Sus receptores son las familia de proteínas roundabout (Robo) que forman parte de la superfamilia de las



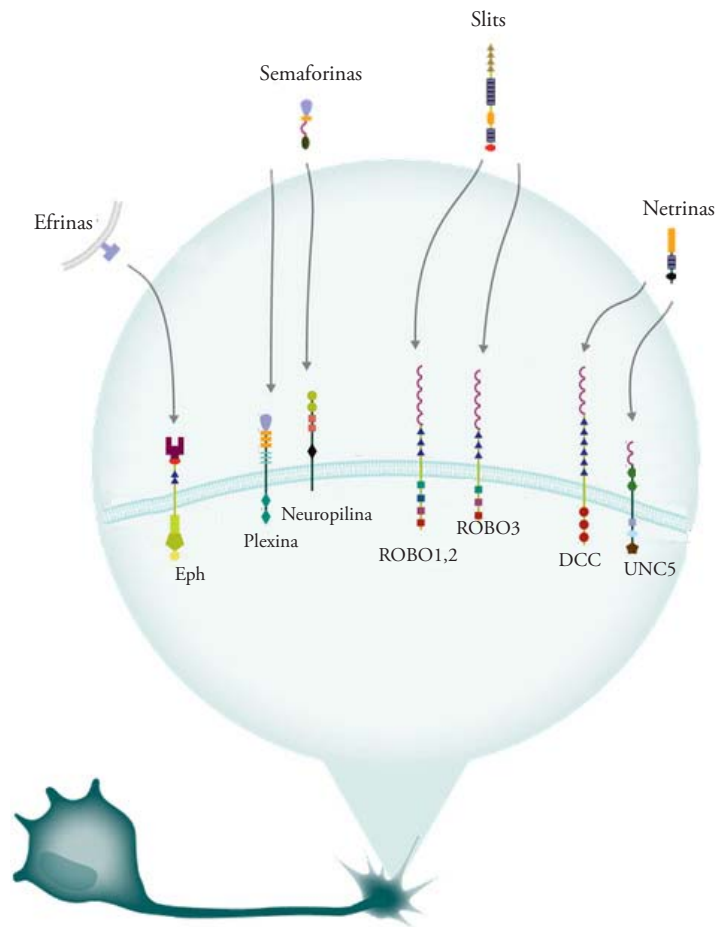
inmunoglobulinas (Kidd et al., 1998). La familia Slits incluye miembros en drosophila, pollo y mamíferos que se expresan en la línea media del CNS (Ypsilanti et al., 2010). Junto a netrina-1, están relacionadas en el proceso de guía axonal en la línea media, descrito por primera vez en drosophila, que se conserva evolutivamente hasta los vertebrados (Brose et al., 1999).

Las slits también actúa como factor repulsivo en la proyección de los axones de la línea media, en el desarrollo de conexiones de diversas regiones del CNS, que incluyen: el tracto olfatorio lateral y la formación hipocampal (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999).

Se ha descrito la expresión de todos los miembros de la familia Slit y de su receptor en la zona de lesión en el CNS. De todos ellos, Slit2 muestra la expresión más intensa, localizada en astrocitos reactivos que rodean el tejido necrótico, lo que sugiere que Slits podrían formar parte del ambiente inhibitorio creado en la zona lesionada (Hagino et al., 2003).

### Efrinas.

Las efrinas pueden ser de clase A, unidas a membrana mediante una molécula GPI o de clase B, proteínas transmembranas hidrofóbicas con un dominio citoplasmático; mientras que sus receptores Eph, a su vez, se dividen en EphA y EphB, acorde a su preferencia por unirse a efrinas A y B, respectivamente (Martinez and Soriano, 2005). Efrinas y los receptores Eph en etapas embrionarias del desarrollo del SNC se expresan en forma complementaria en el cerebro posterior y la médula espinal generando una acción repulsiva bilateral producto de la interacción efrina/Eph que origina una distribución espacial de las células entre compartimientos contiguos al impedir su entremezclado celular (Mellitzer et al., 1999; Xu and Henkemeyer, 2009; Xu et al., 1999). Las efrinas, y sus receptores, son conocidas por su implicancia en migración celular y guía axonal durante el desarrollo, y también son sobreexpresadas en la zona de lesión (Sandvig et al., 2004). Así, Efrina-2 y su receptor EphB2 se expresan en fibroblastos meníngeos y astrocitos reactivos, respectivamente,



**Figura 20. Moléculas de guía axonal.**

El cono de crecimiento es altamente sensible a señales de orientación repulsivas y atractivas de su entorno. Estas señales incluyen: efrinas, semaforinas, slits y netrinas. *From R & B Systems, a biotech brand.*

sugiriendo que estas moléculas pueden ser importantes en la formación de la cicatriz meningo-glial (Bundesen et al., 2003), mientras que Efrina-B3 es expresada en oligodendrocitos siendo considerada como un miembro más de las proteínas inhibitorias asociadas a la mielina (MAIs) teniendo implicancia en los procesos de regeneración neural y plasticidad sináptica (Benson et al., 2005).

# Estrategias regenerativas

Existen diferentes causas de daño en el CNS, pero generalmente para el estudio de la regeneración axonal se observan dos tipos de lesión. Estos tipos de lesión se diferencian entre sí por la región que se ve afectada, de esta manera se pueden diferenciar en lesiones medulares (SCI) y traumáticas cerebrales (TBI) (Perry et al., 2014). La lesión medular traumática puede ser producida por diversos mecanismos de lesión primaria, los tres principales son: (i) contusión, que corresponde a una compresión aguda y transitoria de la médula espinal (ii) maceración, también llamada compresión masiva y que corresponde cuando la presión sobre la médula persiste a lo largo del tiempo y (iii) laceración, que es debido a la intrusión en la médula de cuerpos extraños o fragmentos óseos. Las lesiones en la médula espinal varían desde diferentes grados de sección desde incompletas o parciales hasta lesiones completas (Jennett and Lindsay, 1994).

La búsqueda de nuevas terapias para resolver las lesiones del CNS nos lleva a abordar la problemática de dos formas complementarias, en primer lugar, mediante la utilización de modelos animales que permitan la simulación de situaciones de daño neuronal y, en segundo lugar, la confección de estrategias que busquen mejorar la regeneración del tejido dañado. A lo largo del tiempo se han desarrollado varios modelos animales de lesión medular para reproducir los diferentes tipos de lesión traumática que tienen lugar en humanos. Para ello, la mayoría los estudios se realizan en ratas adultas debido a que se trata de una especie de fácil manejo y que posee una respuesta histológica neuronal tras la lesión similar a la que ocurre en otros mamíferos superiores como lo son los humanos (Akhtar et al., 2008).

Basado en el mecanismo de daño, los modelos de SCI se pueden clasificar en: (i) contusión, en los que se aplica fuerzas transitorias para desplazar y dañar la médula espinal, influyen: caída de peso (p.e varilla de hierro), dispositivos electro-

magnéticos y presión de aire. Este modelo es el que más simula una lesión medular típica humana y este hecho la hace mejor para realizar estudios experimentales, (ii) distracción, se aplican fuerzas de tracción opuestas para estirar la médula espinal, (iii) dislocación, provocan daño por desplazamiento lateral de la vértebra, (iv) transección, implica ruptura parcial o completa de la médula espinal en algún nivel particular, y (v) modelos químicos, que investigan aspectos específicos como consecuencia de la lesión secundaria (Cheriyian et al., 2014).

Existen variables estrategias moleculares y celulares, compatibles con las terapias animales, que buscan la mejora funcional después de SCI; muchas de estas estrategias han alcanzado, o están próximas, a los ensayos clínicos. Cada una de las terapias potenciales que se describen a continuación podrían producir pequeñas mejoras, y por ello, la aproximación mediante terapias combinadas podrían ser necesarias para mejorar los tratamientos reparativos del CNS (Thuret et al., 2006).

## **Administración de factores neuroprotectores y promotores de la regeneración neural.**

Los factores de crecimiento y neurotróficos son importantes reguladores del SNC cumpliendo funciones en la supervivencia neuronal, el crecimiento axonal, la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. Se conocen actualmente diversos factores neurotróficos, que incluyen: NGF, BDNF, NT-3, NT-4, GDNF, LIF, CNTF y NTN (Gordon, 2009; Hefti, 1997; Levi-Montalcini, 1987). El uso de factores de crecimiento y neurotrofinas en modelos de lesión medular induce la regeneración de axones en varios tractos espinales; son ejemplos de ello, la utilización de nervios periféricos impregnados con FGF en médulas transectadas completamente en ratas adultas en que se

ha observado regeneración axonal y recuperación conductual limitada (Cheng et al., 1996), la inyección de NGF en axones de los haces espinales en la promoción de la regeneración de tractos espinales (Ramer et al., 2000) o la incorporación de liposomas con GDNF a nivel del tracto espinal que deriva en una recuperación parcial del crecimiento axonal (Lu et al., 2002). La diferencia en la efectividad de las diferentes neurotrofinas se puede explicar a partir de los diferentes niveles de densidad de los receptores correspondientes para los factores neurotróficos en las neuronas lesiones en la médula espinal (Markus et al., 2002; Schwab et al., 2006), como también, la concentración óptima del factor neurotrófico para el eficaz crecimiento axonal. Actualmente, se sabe que está terapia por sí sola es insuficiente debido a que no es capaz de contrarrestar el efecto inhibitor del entorno de la zona de lesión. Por lo tanto, los experimentos apuestan a la combinación con moléculas capaces de bloquear los inhibidores presentes en la cicatriz meningo-glial.

### **Factores de potenciación de la capacidad regenerativa intrínseca neuronal.**

Una forma de abordaje para reducir el efecto de las moléculas inhibitorias es alterando el estado de crecimiento intrínseco de las neuronas adultas para que ya no respondan ante estos inhibidores. Se ha indicado, por ejemplo, que el efecto de las neurotrofinas permite el crecimiento de neuritas en mielina (Song et al., 1998) tiene por efecto un aumento de los niveles intracelulares de AMPc, que a su vez, conducen la activación de PKA que activa río abajo a CREB y la regulación de la expresión de Arginasa I (ArgI) pareciera ser esencial para el bloqueo del efecto inhibitorio de la mielina y MAG (Gao et al., 2003; Neumann et al., 2002). Esta vía puede ser reforzada de muchas maneras llevando todas al bloqueo de la inhibición inducida por mielina, ya sea: (i) elevación de los niveles de AMPc mediante neurotrofinas o forskolina (Song et al., 1998); (ii) la utilización de rolipram que es un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa 4 que es capaz de degradar el AMPc aumentando su concentración intracelular (Costa et al., 2013; Nikulina et al., 2004); (iii) administración de dosis única de dibutil AMPc (db-AMPc) que es un análogo del AMPc (Neumann et al., 2002) y (iv) la utilización de adenovirus que expresen CREB

activado.

Paralelamente, diversos estudios indican que la manipulación del estado de la actividad de las Rho GTPasas puede modular el colapso del cono de crecimiento. En primer lugar, la introducción de Rac in vitro es capaz de bloquear el colapso del crecimiento en respuesta de Sema 3A (Jin and Strittmatter, 1997) y mielina (Kuhn et al., 1999). En segundo lugar, el bloqueo in vivo de RhoA mediante los inhibidores Y27623 (Chan et al., 2005) y TAT-C3, una transferasa bacteriana (Jalink et al., 1994), promueve la inhibición de ROCK y el crecimiento de neuritas, in vitro, como in vivo en presencia de sustratos inhibitorios (Jin and Strittmatter, 1997; Winton et al., 2002).

### **Bloqueo de moléculas inhibitorias de la regeneración neuronal.**

#### **Bloqueo inhibitorio en Proteínas Inhibitorias de la Mielina (MAIs).**

Se han utilizado ratones modificados KO para Nogo-A y se observaron tres resultados diferentes que van desde regeneración robusta (Simonen et al., 2003), regeneración sugerente (Dimou et al., 2006) hasta la no presencia de regeneración (Lee et al., 2009). Esta observación dio lugar a una gran controversia en relación al papel de NogoA en la regeneración axonal. Los animales KO para MAG no demuestran regeneración mejorada (Bartsch et al., 1995), mientras que los resultados KO para OMgp son controversiales (Ji et al., 2008a). Todos estos resultados plantearon la cuestionante de si alguna de las MAIs (Nogo-A, MAG, OMgp) por sí sola es un inhibidor significativo para la regeneración axonal. Por ello, quizás un bloqueo simultáneo de las tres podría promover una regeneración consistente. Está hipótesis del triple KO para las MAIs fue generada por Cafferty y cols. observando una mejora significativa de la regeneración axonal en el CST y una mejora del aparato locomotor después de la lesión en el triple mutante en comparación con la cepa control o el KO-Nogo (Cafferty et al., 2010). Este resultado indica un posible efecto sinérgico de las tres MAIs, no obstante, Lee y cols. no encontraron ninguna mejora significativa después de una lesión en un modelo similar de hemisección de médula espinal utilizando el mismo modelo de triple KO (Lee et al., 2010). Además, ratones KO para

Nogo-A muestran una mejora en el crecimiento regenerativo in vivo, que es menos pronunciada que los tratamientos basados en anticuerpos que son capaces de neutralizar el efecto inhibitorio de Nogo-A (Kempf et al., 2013). No obstante, se ha observado que esta inhibición residual compensatoria en ratones KO para Nogo-A pudiese estar asociada a un aumento de la expresión de otras moléculas inhibitorias del crecimiento axonal en el CNS, como el caso de moléculas de guía axonal (p.e efrina3) (Kempf et al., 2013), siendo un indicativo que la presencia de mecanismos compensatorios podrían ser capaces de explicar el aumento de la inhibición residual para los ratones KO para las diversas MAIs.

Se han desarrollado varias terapias tomando como diana estos inhibidores del crecimiento axonal, por ejemplo, se generaron anticuerpos contra los componentes inhibitorios de la mielina, como el caso IN-1, que es capaz de reconocer el dominio N-terminal de Nogo-A (amino-Nogo) (Fiedler et al., 2002; Hu and Strittmatter, 2008) al ejercer su efecto inhibitorio al interactuar con ciertas integrinas (Hu and Strittmatter, 2008) e inducir sprouting colateral in vivo en algunos axones del haz corticoespinal en la médula lesionada, ello sí, sin obtención de regeneración funcional robusta (Schnell and Schwab, 1990).

En otros estudios han utilizado péptidos agonistas, como NEP1-40 que consta de los primeros 40 AA del loop de Nogo-66 (sector inhibitorio de Nogo-A) que constituye de dominio de interacción con el complejo Nogo-Receptor. Estos 40 AA tienen la capacidad de unirse a NgR1 pero no activarlo, por tanto, actúa como un bloqueante de Nogo-A, pero no así para MAG y OMgp (GrandPre et al., 2002). NEP1-40 promueve el crecimiento axonal en el tracto corticoespinal (GrandPre et al., 2002), sin embargo, su efecto regenerativo no ha podido ser reproducido exitosamente en otros modelos experimentales (Steward et al., 2008). También, se ha utilizado el ectodominio NgR(310), fragmento soluble de NgR1, que consiste en los residuos 1-310 de NgR1 que incluye por completo el segmento LBD, pero que carece de la región terminal de NgR1 que es requerida para la señalización y de la región de anclaje GPI del receptor (Fournier et al., 2002). Este ectodominio ejerce su acción sobre las MAIs y previene su unión al NgR1 en la superficie neuronal,

y también interactúa a lo largo de toda la longitud de NgR1 previniendo su oligomerización o la interacción con otros componentes del complejo NgR bloqueando su señalización intracelular. Los estudios in vitro de NgR(Ecto) presentan propiedades antagónicas a las proteínas inhibitorias de la mielina; de hecho, tras lesión NgR(Ecto) es capaz de promover sprouting y crecimiento axonal en fibras de CST y rafe espinal asociado a recuperación funcional. De ello, se debe considerar que ratones KO para NgR1 no presentan regeneración del tracto corticoespinal (CST), indicando que tener por blanco único a NgR no es suficiente para promover una regeneración robusta (Li et al., 2004a).

Paralelamente, MAG que es capaz de interactuar con los receptores NgR2 y gangliósidos de manera dependiente de ácido siálico (DeBellard et al., 1996). La enzima neuraminidasa (NANasa) en estudios in vitro es capaz de liberar los ácidos siálicos de la membrana neuronal reduciendo la inhibición de MAG (Tang et al., 1997). Sin embargo, la degradación enzimática de un residuo tan ampliamente utilizado a nivel fisiológico, como el ácido siálico, es considerado como un tratamiento demasiado inespecífico para ser considerado como una herramienta terapéutica.

### **Bloqueo inhibitorio de Condroitín Sulfato Proteoglicano (CSPG).**

El CSPG es sobreexpresado en la cicatriz meníngeo-glial, apareciendo en los primeros días después de la lesión y persistiendo durante meses (Properzi et al., 2003). La principal estrategia para bloquear el efecto del CSPG ha sido la aplicación de la enzima bacteriana condroitinasa ABC (ChABC) que es capaz de cortar las cadenas laterales de los carbohidratos asociados al proteoglicano (Yamagata et al., 1968) incrementando la permisividad regenerativa de los axones en lesiones de médula espinal (Zuo et al., 1998). Es más, la administración de la enzima ChABC, inmediatamente después de haber sido lesionada parcialmente la médula espinal en ratas, se traduce en una degradación de los PGs en la zona de lesión, permitiendo que los nervios motores de la zona lesionada pueden regenerar, conllevando a que las ratas tratadas con ChABC presenten recuperación motora, aunque diversas funciones sensoriales no son recuperadas (Bradbury et al., 2002). Sin embargo, la cicatriz meníngeo-glial no sólo contiene

moléculas inhibitorias, sino que también actúa como barrera mecánica en la difusión de moléculas generando que el proceso difusivo se vea reducido en las zonas con astrocitos hipertróficos que se encuentren asociados a elevados niveles de CSPG (Roitbak and Sykova, 1999).

## Trasplante celular y biomateriales.

En muchos casos de trauma del CNS, tanto las neuronas como la glía pierden su funcionalidad. El reemplazo celular es un paso vital en este tipo de lesiones, en donde el sistema no puede reemplazar la función de las células perdidas (Dent, 2003). Tras la lesión medular se observa pérdida severa del tejido lesionado y la formación de cavidades císticas, que imposibilitan la reconstrucción tisular. Por ello, es imprescindible generar mecanismos terapéuticos que ayuden a la reconstrucción de la organización intrínseca del tejido lesionado (Thuret et al., 2006).

El trasplante celular después de SCI tiene varios objetivos: (i) actuar de puente para cavidades císticas, (ii) reemplazar células muertas para proporcionar nuevas neuronas o células mielinizantes, y (iii) para crear un entorno favorable para la recuperación axonal (Thuret et al., 2006). Con este fin se han trasplantado diversos tipos celulares: células de la glía envolvente olfatoria (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Ramon-Cueto et al., 1998), células de Schwann (Li and Raisman, 1994; Oudega and Xu, 2006), astrocitos (Wang et al., 1995), células endoteliales (Kitada et al., 2001), tanicitos (Prieto et al., 2000), células in-

flamatorias (macrófagos y linfocitos) (Rapalino et al., 1998) y células madres (Brustle et al., 1999).

Paralelamente, la ingeniería tisular ha conducido al desarrollo de una amplia gama de biomateriales que permiten la sustitución o reconstrucción de diversos tejidos. En aplicaciones neuroregenerativas, el diseño debe considerar como parámetros: las propiedades mecánicas equivalentes al tejido neural, una permeabilidad controlada que permita la infiltración de células, la biocompatibilidad, la porosidad y la esterilizabilidad, y complementariamente, que permita el anclaje, crecimiento y diferenciación celular (Thuret et al., 2006). Es decir, es necesario la presencia de estructuras a modo de andamios (del inglés, Scaffolds) que permitan la organización del trasplante celular en el tejido medular.

En general, los biomateriales utilizados en SCI proporcionan un apoyo estructural pasivo y/o apoyan el crecimiento activo de los axones lesionados; es más, algunos materiales son funcionalizados mediante secuencias peptídicas biológicamente activas (Straley et al., 2010). Actualmente, una de las técnicas más utilizadas en la fabricación de materiales biomiméticos para aplicaciones en neurobiología es el electrospinning. Esta técnica permite obtener fibras, del orden micro/nanométrico, por medio de estiramiento coaxial de una solución viscoelástica procedente de una solución polimérica mediante iteración de cargas eléctricas (Xie et al., 2010). Así nuevos biomateriales proporcionan un sustrato fisiológico para el estudio y la comprensión de los mecanismos de reparación neural en el CNS.

Material	Tipo		Dominio interacción celular	
	Natural	Sintético	Inherente	Funcionalizado
Agarosa	x			x
Alginato	x			x
Quitosano	x			x
Colágeno	x		x	x
Fibrina	x		x	
Fibronectina	x		x	
Matrigel	x		x	
PLA/PLGA		x		x

**Figura 21. Esquema de los biomateriales utilizados en lesiones medulares.** Los biomateriales utilizados en lesiones del CNS poseen distintas propiedades: naturales, sintéticos, funcionalizados y biodegradabilidad como se muestran en el cuadro esquemático. From Sakiyama-Elbert et al. 2012.



# Células de la glía envolvente olfatoria

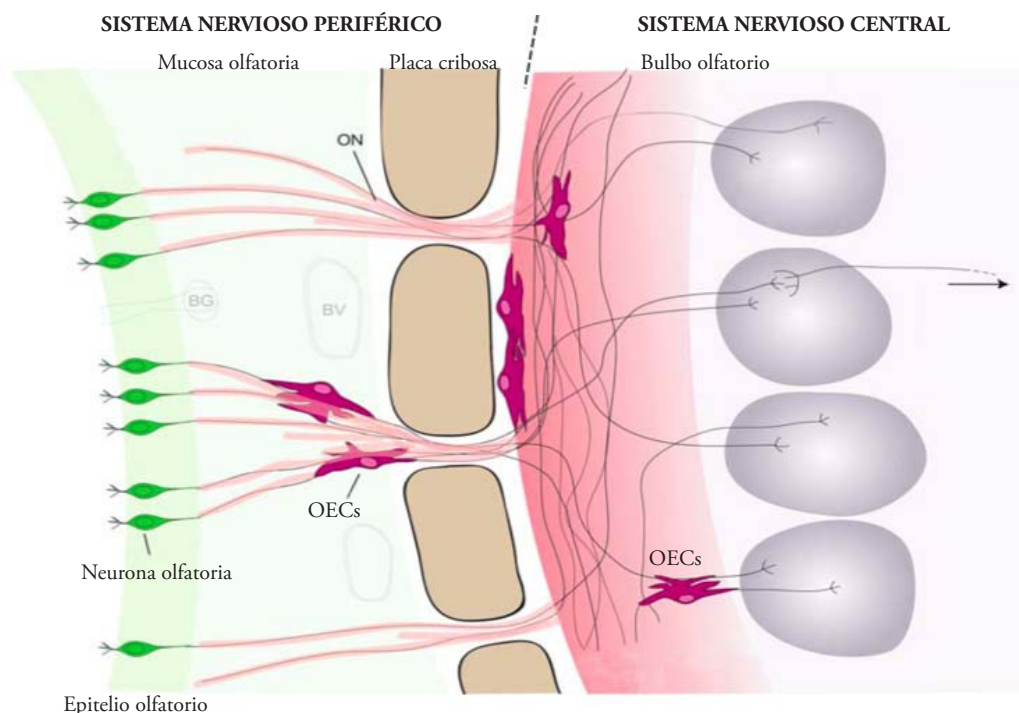
## Neuroanatomía Olfatoria.

El sistema olfatorio de vertebrados está compuesto por una parte que reside en el PNS, la mucosa olfatoria, situada en la cavidad nasal y su tejido diana, el bulbo olfatorio, que se alberga en el CNS (Barber, 1982). El bulbo olfatorio (OB) una estructura cilíndrica en la parte más rostral del cerebro cuya superficie ventral se encuentra apoyada sobre la lámina cribosa del etmoides. Este órgano constituye la primera estación sináptica de la vía olfatoria. El OB recibe información aferente a partir de una zona bien delimitada de la cavidad nasal: el epitelio olfatorio (OE) y el órgano vomeronasal. La parte del bulbo olfatorio que recibe las aferencias provenientes del epitelio olfatorio constituyen el OB principal y la que recibe aferencias del órgano vomeronasal constituye el OB accesorio (Eisthen, 1997).

La vía olfatoria, como caso excepcional en el sistema nervioso central, se caracteriza por tener la capacidad de regenerar continuamente las neuronas sensoriales olfatorias (ORN) en la periferia de la mucosa olfatoria, no sólo en etapas tempranas del desarrollo sino que también a lo largo de la toda la vida (Brann and Firestein, 2014). Diversos estudios clásicos utilizando marcaje con timidina tritiada y análisis cuantitativo han demostrado que las ORNs poseen una vida media corta, permaneciendo en el epitelio olfatorio durante aproximadamente 30 días, sin embargo, recientes estudios indican que pueden sobrevivir durante meses (Graziadei and Graziadei, 1979b; Mackay-Sim and Kittel, 1991) siendo estas sustituidas por nuevas neuronas continuamente a lo largo de la vida adulta a partir de células madres que se encuentran en la mucosa del epitelio olfatorio. Independientemente de la causa de la muerte, los axones de las nuevas neuronas olfatorias tienen que crecer en la dirección correcta, y extenderse a través del epitelio olfatorio (en el PNS), atravesar la lámina cribosa del etmoides, entrar en el OB (en el CNS)

atravesando la glía limitante y hacer sinapsis con las dendritas de las segundas neuronas de la vía olfatoria y restablecer la conductividad (Doucette, 1991; Fraher, 2000). El sistema olfativo se renueva toda la vida en el sistema nervioso adulto ello debido a la presencia de células que acompañan y envuelven a estos axones en todo su recorrido, las células de la glía envolvente olfatoria (OECs), por ello, este tipo glial es crucial para la supervivencia y el crecimiento de las ORNs (Chuah and Zheng, 1992). Las OECs se localizan tanto en el sistema nervioso central (CNS), distribuidas en las dos capas más externas del bulbo olfatorio, como en el sistema nervioso periférico (PNS), a lo largo del trayecto de la vía olfatoria, desde la mucosa olfatoria hasta el bulbo olfatorio (Doucette, 1984), por lo tanto, los axones olfatorios están en constante contacto con las OECs durante casi toda su ruta hacia el bulbo olfatorio.

Los axones de las ORNs salen desde el epitelio olfatorio en dirección la lámina propia, a este nivel anatómico, las OECs son capaces de envolver dichos axones, en fascículos no mielinizados (0,1-0,7  $\mu\text{m}$ . de diámetro en mamíferos) y acompañarlos a través de la lámina propia, la placa cribosa y llevarlos hasta su destino final en el OB (Boyd et al., 2005). Las OECs se asocian a estos fascículos axonales extendiendo procesos citoplasmáticos laminares alrededor de estos grupos fasciculares que se organizan en estructuras, de tipo-túnel, que ayuda en la elongación axonal durante la transición entre el CNS-PNS (Nedelec et al., 2005). Una vez en el CNS, los axones son desfasciculados, re-clasificados, y posteriormente, refasciculados para que los axones que expresen el mismo receptor odorante se reagrupen, y por convergencia topográfica sean capaces de asociarse a estructuras esférica denominadas glomérulos donde hacen sinapsis con neuronas de segundo orden (células mitrales y células en penacho) (Mombaerts et al., 1996). De hecho, una vez en el OB, las OECs son capaces de interactuar con



**Figura 22. Diagrama esquemático del sistema olfatorio de rata adulta.** Células de la glía envolvente olfatoria (OECs) envuelven los axones de los receptores olfatorios a lo largo de su recorrido a través de la lámina propia en el Sistema Nervioso Periférico. Las neuronas olfatorias son acompañadas por las OECs al cruzar la placa cribosa del cráneo hasta llegar al bulbo olfatorio en el Sistema Nervioso Central. *From Vincent et al. 2005.*

astrocitos, a nivel del CNS, ayudando a dirigir los axones hasta su diana sináptica (Doucette, 1984). Así es como, las OECs permiten la elongación de los nuevos axones de los receptores olfatorios desde el PNS hasta el CNS debido a que son capaces de promover la fasciculación de los axones olfatorios durante su recorrido hacia el BO, y también, evitar el contacto con factores inhibitorios propios del sistema nervioso central que, de otra forma, restringirían el crecimiento axonal (Barber, 1982; Doucette, 1990; Zurn et al., 1988).

## Desarrollo y morfofisiología de las OECs.

Diversos reportes han proporcionado pruebas convincentes del origen a partir de la cresta neural de las OECs (Barraud et al., 2010; Forni and Wray, 2012). Barraud y cols. usando elaboración de mapas de destino en pollo y trazado de linaje en ratones, demostraron que las OECs se originan de la cresta neural y que comparten herencia común en su desarrollo con las células de Schwann (Barraud et al., 2010), explicando así ciertas similitudes morfológicas y antigénicas entre las células

de Schwann y las OECs.

Las OECs fueron descritas por Blanes (Blanes, 1898) y se caracterizan por que pueden coexistir en el PNS y CNS lo cual ha dificultado su definición como glía central o periférica (Doucette, 1984). Estas células se consideran únicas, puesto que poseen características fenotípicas que las diferencian del resto de tipos de células gliales (Ramon-Cueto and Valverde, 1995). Las OECs tanto en los nervios olfatorios periféricos como en la capa nerviosa olfatoria del bulbo olfatorio, expresan diferentes antígenos que pueden detectarse mediante técnicas moleculares. Sin embargo, se ha visto que la expresión de estos antígenos no es constante ni regular y que depende de la etapa del desarrollo de las células y de su localización (Franssen et al., 2007).

Varios estudios han informado que existen distintas subpoblaciones de OECs en el sistema olfatorio, en base a su morfofología, distribución topográfica, arquitectura del citoesqueleto y expresión antigénica y/o génica (Guerout et al., 2010; Windus et al., 2010). Actualmente, no existe un marcador universal para las OECs, pero se ha



observado que son capaces de expresar marcadores tanto centrales: GFAP (Barber and Lindsay, 1982), como periféricos: S-100 y p75 (Chuah and Au, 1993; Ramon-Cueto et al., 1993). Morfológicamente, se han descrito 2 subpoblaciones: las OECs tipo-Schwann (sOECs) con morfología fusiforme bipolar y las OECs tipo-Astrocito (aOECs) con morfología estrellada planar (Franceschini and Barnett, 1996; Kumar et al., 2005). La existencia de estas subpoblaciones de OECs se ha determinado tanto in vitro, como in vivo (Pixley, 1992). Se ha demostrado una elevada plasticidad morfológica de las OECs (van den Pol and Santarelli, 2003) mediante experimentos de microscopia en tiempo real al observarse transformación espontánea de un subtipo a otro (Huang et al., 2008). Es más, se ha indicado que su morfología podría ser fuertemente dependiente del medio de cultivo (Higginson and Barnett, 2011). Esto indica que las OECs poseen fenotipo funcional altamente maleable. De hecho, sOECs se ha demostrado pueden migrar 3 veces más que las aOECs (Huang et al., 2008) de manera que la morfología podría reflejar estados funcionales diferentes.

Se ha descrito que las subpoblaciones de OECs presentan diferentes propiedades migratorias (Huang et al., 2008; Kumar et al., 2005). De hecho, sOECs presentan características morfológicas bipolares con un extremo de avance, con un lamelipodio estructurado y filopodios altamente dinámicos que se extienden en la dirección del desplazamiento celular, mientras que el extremo posterior, en dirección opuesta, presenta procesos de membrana poco dinámicos. Así, a medida que la célula avanza se observa translocación nuclear, de forma simultánea, y retracción del extremo posterior (Huang et al., 2008). En cambio, las aOECs presentan morfología aplanada, sin expresión de extremos anteroposterior definidos, que se visualiza como una estructura celular no fusiforme cuya dinámica migratoria se basa en un gran lamelipodio exploratorio (Huang et al., 2008).

Sin embargo, se ha observado que la migración de las OECs presenta también una alta dinámica de movimientos lamelipodiales laterales a lo largo del cuerpo celular durante el proceso migratorio (Windus et al., 2007). Estas ondulaciones lamelipodiales laterales inducirían el contacto célula-célula, considerando el hecho que las

OECs migran en estrecho contacto entre sí, como también con los axones olfatorios (Chehrehasa et al., 2010; Windus et al., 2007) conllevando a que el proceso migratorio podría ser inducido por contacto (Windus et al., 2007).

## Potencial Regenerativo.

En contraste con la neurogénesis y el vigoroso crecimiento axonal que se produce después de una lesión del sistema olfatorio primario, las lesiones del CNS y en particular, la médula espinal, los efectos son la pérdida irrevocable de la conectividad neuronal. En el sistema olfatorio un factor importante que determina su potencial regenerativo es la presencia de las OECs. Diversos estudios indican el alto potencial regenerativo de las OECs en lesiones del CNS (García-Alias et al., 2004; Li et al., 1997; Moreno-Flores et al., 2006; Navarro et al., 1999; Ramer et al., 2004a; Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Ruitenberg et al., 2002). No obstante, el mecanismo molecular exacto por el cual las células de la glía envolvente olfatoria favorecen el crecimiento axonal es una interrogante por el momento. Se han postulado diversas hipótesis sobre el mecanismo implicado en la respuesta regenerativa pudiendo ser debido:

i) La elevada *expresión de diversos factores solubles* secretados por las OECs, que incluyen: los factores neurotróficos: NGF, BDNF, NT3/4, CNTF, GDNF y NTN (Boruch et al., 2001; Lipson et al., 2003; Woodhall et al., 2001); y los factores de crecimiento: FGF-1, IGF, LIF, PDGF y péptido Y (Bauer et al., 2003; Key et al., 1996; Kott et al., 1994) que son capaces de promover la supervivencia neuronal cuando son trasplantadas después de una lesión del CNS. Diversos estudios in vitro exponen el efecto promotor de las OECs del crecimiento axonal, ya sea en co-cultivos de neuronas olfatorias y glía envolvente olfatoria en que se observa mayor elongación axonal en presencia de las OECs por sobre los controles (Kafitz and Greer, 1999) o en cultivos neuronales con medios condicionados obtenidos a partir de las OECs que inducen el crecimiento de neuritas en cultivos primarios y/o el crecimiento de fibras adrenérgicas (Au et al., 2007).

ii) La formación de una *estructura aislante*, sustrato físico, capaz de generar un tubo envolvente

te alrededor de los axones y evitar su exposición frente a las moléculas inhibitorias de la zona de lesión (Graziadei and Graziadei, 1979a; Li et al., 2005), como también al ser capaces de entremezclarse con otros tipos gliales (p.e. astrocitos reactivos) (Boruch et al., 2001; Ramon-Cueto et al., 1993). Las OECs en contraste a otras células gliales, como las células de Schwann, no son capaces de mielinizar los axones sino que en su lugar son capaces de envolver numerosos paquetes axonales desmielinizados (Doucette, 1990) y expresar una serie de diversas moléculas extracelulares, que incluyen: laminina, heparán sulfato proteoglicano, fibronectina, colágeno IV, como también moléculas de adhesión células, que incluyen: L1 y N-CAM (Franceschini and Barnett, 1996; Liesi, 1985; Tisay and Key, 1999) que se encuentran involucradas en el crecimiento axonal. Es probable que la actividad promotora de crecimiento axonal dependa de la capacidad de las OECs de conservar un balance relativo entre factores atractivos y repulsivos durante la elongación axonal. Por un lado, las OECs producen moléculas extracelulares de tipo atrayentes e inductores del crecimiento axonal (p.e. laminina, HSPG), paralelamente, son capaces de responder de manera dinámica a la composición extracelular inhibitoria permitiendo delimitar una vía conductiva específica para el crecimiento axonal (Giger et al., 1998; Key et al., 1996; Treloar et al., 1996). Así es como, la combinación de estas características, conjuntamente, a otras características desconocidas serían las propiedades de las OECs que le permitirían promover la regeneración axonal.

De manera complementaria, las propiedades regenerativas de las OECs han sido asociadas a la capacidad migratoria de las OECs que se correlaciona con la distribución y dinámica de citoesqueleto pudiendo esta capacidad migratoria ser modulado por diversos componentes extracelulares (Gudino-Cabrera et al., 2000; Nieto-Sampedro, 2003). Sin embargo, a pesar de que se establece fácilmente que las OECs migran desde el epitelio nasal para poblar el nervio olfatorio, se conoce muy poco acerca de la regulación del proceso migratorio de las OECs. Hasta la fecha, se han identificado sólo unos pocos factores que han sido descritos como capaces de modular funcionalmente la migración de las OECs, que incluyen: GDNF, Nogo-66 y slit-2 (Cao et al., 2006; Huang et al., 2011; Su et al., 2007). Nogo-66 y slit-2 son capa-

ces de disminuir significativamente la tasa migratoria de las OECs, mientras que GDNF es modulador positivo en la dinámica migratoria de las OECs (Ekberg et al., 2012), como también se ha identificado que la molécula de matriz extracelular: fibulina-3 (Vukovic et al., 2009) como modulador migratorio de las OECs.

Las propiedades migratorias de las OECs no se han podido identificar ni caracterizar por completo tras su implante en la médula espinal lesionada (Lee et al., 2004), no obstante, se han reportado estudios de resonancia magnética utilizando análisis de seguimiento celular las OECs presentan limitada capacidad migratoria en la médula espinal lesionada, es más, se ha indicado que las OECs trasplantadas migran preferentemente en la dirección opuesta al sector diana de regeneración fallando así que se promueva la regeneración axonal (Gudino-Cabrera et al., 2000), como también se ha descrito que las OECs disminuyen su potencial migratorio en la médula espinal lesionada en comparación con los controles (Deng et al., 2006). De hecho, las OECs trasplantadas a la médula espinal deben ser trasplantadas en los 2 sitio de lesión, pero no muy lejos de la lesión para mejorar su eficiencia (Pearse et al., 2007).

Las OECs son consideradas importantes reguladores del crecimiento y guiado axonal, existiendo un correlato entre su dinámica migratoria y sus propiedades regenerativas (Chehrehasa et al., 2010). Por ello, la caracterización y comprensión de las propiedades migratorias de las OECs es importantísima para la determinación de sus propiedades regenerativas in vivo. Así es como, distintos grupos de investigación han comenzado a estudiar las propiedades migratorias intrínsecas de las OECs con el fin de mejorar su eficiencia tras el trasplante.

## **Trasplante de glía envolvente olfatoria**

En muchos casos de trauma del CNS, tanto las neuronas como las glías se pierden, siendo el reemplazo celular un paso vital en este tipo de lesiones, en donde el sistema no puede reemplazar la función de las células perdidas. Por ello, una de las estrategias experimentales para la regeneración de las neuronas de la médula espinal consiste en

modificar su entorno celular, introduciendo en la zona dañada células que son capaces de crear un entorno favorable para la regeneración axonal.

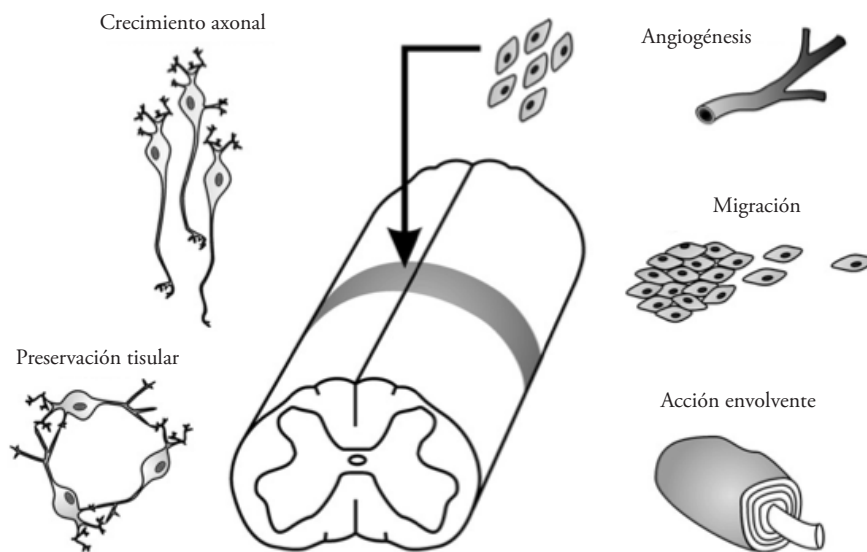
La glía envolvente olfatoria es un ejemplo prometedor de terapia celular en lesiones del CNS (Raisman, 2003). Las OECs tienen ventajas comparativas con respecto a otros tipos celulares al lograr integrarse de manera satisfactoria a la cicatriz meningo-glial y al ser capaces de liberar una serie de factores tróficos que promueven la regeneración neural. Las OECs se pueden obtener a partir de animales adultos, por lo que el mismo animal puede ser su propio donante (Feron et al., 2005), ello es una ventaja importante debido a que los trasplantes autólogos eliminan el riesgo de rechazo tisular, el uso de inmunosupresores durante toda la vida y los dilemas éticos asociados al trasplante de células embrionarias o fetales.

En general, se han notificado cinco efectos beneficiosos de las OECs que son capaces de promover la recuperación funcional: (i) la estimulación de crecimiento axonal; (ii) la preservación tisular y axonal; (iii) la capacidad de las OECs para migrar a través de la cicatriz glial; (iv) la promoción de la angiogénesis; y (v) la formación de un tubo envolvente que permite el aislamiento de los axones (Roet and Verhaagen, 2014).

Las OECs se pueden obtener tanto a partir de las capas superficiales del bulbo olfatorio (OEC-OB) (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1992; Ramon-Cueto et al., 1993), como del epitelio nasal (OEC-OE) (Ramer et al., 2004a). Rubio

y cols. indica que las OECs bulbares son mejor fuente de extracción (Rubio et al., 2008) ya que son capaces de migrar de manera más efectiva en la médula espinal lesionada y promover la regeneración (Lopez-Vales et al., 2006; Ramon-Cueto et al., 1998; Verdu et al., 2003), mientras que las de la mucosa no exhiben estos resultados (Lu et al., 2006a). Comparativamente, el OB es un tejido mucho más aséptico que OE, con lo cual se disminuyen el riesgo de infecciones durante el trasplante; a ello se adiciona que el epitelio nasal presenta mayor dificultad en la eliminación de células de Schwann, considerando que éstas ocasionan mayor reactividad en astrocitos que las OECs, y con ello, mayor expresión de moléculas inhibitorias (Lakatos et al., 2000). Sin embargo, a pesar de ello diversos estudios demuestran efectos negativos en las OEC-OB y efectos beneficiosos por parte de las OEC-OE en la reparación de la médula espinal (Takami et al., 2002).

Ramón y Cueto y cols. fueron los pioneros en demostrar los efectos beneficiosos del trasplante de las OECs después de SCI (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Ramon-Cueto et al., 1998). La mayoría de los estudios asociados a las OECs muestran efectos positivos de las OECs en la regeneración y la recuperación axonal. Sin embargo, hay un número significativo de estudios que contradicen estos resultados exponiendo los efectos beneficiosos de las OECs bastante limitados. Por lo tanto, los efectos de la regeneración de las OECs después de su trasplante en la médula lesionada deben ser comprendidos para determinar el porque de su variabilidad terapéutica (Li



**Figura 23. Efectos promotores de la neuroregeneración de las OECs.** Se han reportado 5 efectos promotores de la recuperación funcional de las OECs tras el trasplante en una médula espinal lesionada que se presentan en el cuadro esquemático. *From Franssen et al. 2007.*

and Lepski, 2013).

Desde entonces, las OECs son utilizadas como estrategia terapéutica en la reparación axonal en diversos modelos animales de SCI, no obstante, las investigaciones han conducido a resultados variables. Existe una serie de razones técnicas y diferencias biológicas que complican la interpretación de los resultados del trasplante de las OECs, entre ellas: la fuente de las OECs (lamina propia / bulbo olfatorio); la edad de los animales de los que se obtienen las células, el método de cultivo (purificación, adición de mitógenos, tiempo de cultivo, células frescas/congeladas) y la estrategia de trasplante (células individuales, asociadas a matriz, fase de aplicación: aguda / crónica, tracto axonal asociado) (Harvey and Plant, 2006).

Algunos estudios han modificado genéticamente las células de la glía envolvente olfatoria para que expresen factores neurotróficos para promover la regeneración neuronal (Cao et al., 2006; Ruitenberg et al., 2005). Los factores neurotróficos han sido estudiados ampliamente como mediadores críticos en la supervivencia neuronal y en el crecimiento axonal durante el desarrollo teniendo efectos beneficiosos en la protección neuronal y reparación del CNS ya bien documentados (Jones et al., 2001). Los trasplantes de OECs modificadas genéticamente son capaces de promover la regeneración axonal (Cao et al., 2006; Ruitenberg et al., 2005), y son comparativamente ventajosos por sobre otros tipos celulares que no son de origen neural que pueden adquirir un comportamiento tumorigénico (p.e. fibroblastos), además, de poder integrarse de buena manera a la cicatriz meningo-glial (Lakatos et al., 2000). Considerando, que la viabilidad de las OECs modificadas genéticamente trasplantadas en médulas no lesionada y lesionadas ha sido descrita por diversos autores (Ruitenberg et al., 2002), la generación de OECs modificadas genéticamente, mediante vectores virales, capaces de secretar factores que promuevan la regeneración axonal en el CNS puede ser una estrategia interesante para la recuperación de lesiones de la médula espinal (Blits et al., 2002; Ruitenberg et al., 2002). Por ejemplo, GDNF-OECs son capaces de sobrevivir y expresar el gen foráneo cuando son implantadas en las médulas lesionadas siendo son capaces de estimular un aumento de la regeneración de los axones CST o rubroespinales a lo largo de la zona

de la transección, en ratas adultas, en comparación las OECs no modificadas, como también se observa recuperación funcional estadísticamente significativa con respecto a los controles (Cao et al., 2006) mientras que NT3-OECs son capaces de sobrevivir y producir el factor neurotrófico, y así promover una recuperación locomotora funcional, de significancia estadística, al ser implantadas en médulas espinales lesionadas de ratas (Ma et al., 2010; Ruitenberg et al., 2005).

Actualmente, se busca potenciar el potencial regenerativo de las OECs en combinación de otros tratamientos, por ejemplo: (i) terapia génica para obtener liberación local y continua de factores que mejoren el crecimiento axonal; (ii) factores neutralizantes de la señal inhibitoria presentes en el entorno lesionado y (iii) biomateriales que permitan un direccionamiento guiado y un mejor soporte estructural en la zona de lesión.





# OBJETIVOS





La utilización de las OECs es una de las estrategias celulares más prometedoras de recuperación del SNC lesionado, no obstante, sus propiedades migratorias cuyo rol es crucial en el proceso regenerativo aún no han sido determinado en detalle hasta la fecha. Como se ha indicado antes en regiones adyacentes a la zona de lesión contienen moléculas inhibitorias, tales como: mielina y proteoglicanos durante largos periodos de tiempo y que son capaces de inhibir la capacidad de migración de las OECs (véase introducción).

Por esta razón el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la confección de un estudio de las propiedades migratorias de las OECs en condiciones miméticas de lesión medular, como a su vez, la utilización de herramientas nanobiotecnológicas para la comprensión de modelos neurobiológicos. Los principales objetivos de esta Tesis están desarrollados en 2 módulos :

### **Modulación de las propiedades migratorias de las OECs.**

- I. Caracterizar la línea celular TEG3 para estudiar si expresan la maquinaria molecular requerida para transducir el efecto inhibitorio de las MAIs.
- II. Examinar el efecto de las MAIs sobre las TEG3 en el proceso de migración mediante la utilización de técnicas de seguimiento celular (cell tracking), microscopia de fuerza de tracción (traction force microscopy) e inmunohistoquímica.
- III. Examinar el efecto de OMgp y CSPG sobre el proceso de migración celular mediante técnicas de videomicroscopía en tiempo real, microscopia electrónica, microscopia de fuerza de tracción e inmunohistoquímica.
- IV. La generación y caracterización de una línea celular de TEG3 capaz de liberar el ectodominio NgR1 hacia el medio extracelular.
- V. La confección y caracterización de biomateriales capaces de favorecer el proceso migratorio de las TEG3.

### **Sistema microfluídico para análisis funcional de unión neuromuscular.**

- VI. Confección de un sistema de microfluídica para la generación de un modelo *in vitro* de unión neuromuscular.







# RESULTADOS





Los resultados de esta Tesis se encuentran desarrollado en base a publicaciones científicas:

**Capítulo I: “Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy.”**

Authors: Nocentini S\*, Reginensi D\*, Garcia S, Carulla P, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Trepát X, Bribian A, del Río JA.

Published in: Cellular and Molecular Life Science, 2012 May;69(10):1689-703.

doi: 10.1007/s00018-011-0893-1. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22205212

*Nocentini S. and Reginensi D. contributed equally to this study\**

**Capítulo II: “Increased migratory potential of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord.”**

Authors: Reginensi D, Carulla P, Nocentini S, Seira , Serra-Picamal X, Torres-Espín A, Gavín R, Moreno-Torres M, Wandosell F, Samitier J, Trepát X, Navarro X, Del Río JA.

Accepted in: Cellular and Molecular Life Science (CMLS), 2015.

**Capítulo III: “Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip.”**

Authors: Tong Z, Seira O, Casas C, Reginensi D, Homs A, Samitier J and Del Río JA.

Published in: RSC Adv., 2014,4, 54788-54797

doi: 10.1039/C4RA10219C. Received 11 Sep 2014, Accepted 17 Oct 2014



# Capítulo I

## **Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy.**

Authors: Nocentini Sara\*, Reginensi Diego\*, Garcia Simón, Carulla Patricia, Moreno-Flores María Teresa, Wandosell Francisco, Trepát Xavier, Bribian Ana, del Río José Antonio.

*\* Nocentini, Sara and Reginensi, Diego contributed equally to this study*

Published in: Cellular and Molecular Life Sciences. 2012 May;69(10):1689-703.

### **RESUMEN:**

La implantación de OECs ha surgido como terapia prometedora para lesiones a la médula espinal. Pero las propiedades regenerativas de estas células parecen depender de la presencia de un sustrato permisivo para la migración celular. Los datos de otros estudios demuestran que las OECs migran menores distancias una vez trasplantadas en la médula espinal lesionada respecto a médula espinal no lesionada. Esto sugiere que los inhibidores asociados a mielina (MAIs), que se sobre-expresan después de una lesión, podrían estar modulando la capacidad migración de las OECs. Por lo tanto, en nuestro estudio hemos examinado el efecto de los MAIs sobre la línea clonal de OECs de rata, TEG3. Hemos demostrado que estas células expresan todos los componentes del complejo receptor NgR y que este complejo es activo. De hecho, en respuesta a estímulos agudos de mielina se puede observar un aumento de activación de RhoA y de fosforilación de ERK1-2 en las TEG3. En presencia de mielina como sustrato la capacidad migratoria del las OECs es reducida. Esta disminución de capacidad migratoria córrela con una reducción en fuerza de tracción ejercida por la célula sobre el sustrato, una reducción en número de contactos focales y con la redistribución del citoesqueleto de F-actina. Por último, observamos que la incubación de las TEG3s cultivadas sobre mielina, con el péptido NEP-40, que bloquea NgR1, puede restaurar parcialmente las propiedades enumeradas precedentemente. Estos datos nos sugirieron que, para mejorar las propiedades migratorias del las OECs después de trasplante en lesión espinal, es necesaria una estrategia que tenga en cuenta los efectos inhibitorios de los MAIs sobre estas células.



## Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy

Sara Nocentini · Diego Reginensi · Simón Garcia · Patricia Carulla ·  
María Teresa Moreno-Flores · Francisco Wandosell · Xavier Trepap ·  
Ana Bribian · José A. del Río

Received: 4 August 2011 / Revised: 3 November 2011 / Accepted: 21 November 2011  
© Springer Basel AG 2011

**Abstract** Newly generated olfactory receptor axons grow from the peripheral to the central nervous system aided by olfactory ensheathing cells (OECs). Thus, OEC transplantation has emerged as a promising therapy for spinal cord injuries and for other neural diseases. However, these cells do not present a uniform population, but instead a functionally heterogeneous population that exhibits a variety of responses including adhesion, repulsion, and crossover during cell–cell and cell–matrix interactions. Some studies report that the migratory properties of OECs are

compromised by inhibitory molecules and potentiated by chemical gradients. Here, we demonstrated that rodent OECs express all the components of the Nogo receptor complex and that their migration is blocked by myelin. Next, we used cell tracking and traction force microscopy to analyze OEC migration and its mechanical properties over myelin. Our data relate the decrease of traction force of OEC with lower migratory capacity over myelin, which correlates with changes in the F-actin cytoskeleton and focal adhesion distribution. Lastly, OEC traction force and migratory capacity is enhanced after cell incubation with the Nogo receptor inhibitor NEP1-40.

S. Nocentini and D. Reginensi contribute equally to this study.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00018-011-0893-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Nocentini · D. Reginensi · P. Carulla · A. Bribian (✉) ·  
J. A. del Río (✉)  
Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute for  
Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona Science Park,  
University of Barcelona, Barcelona, Spain  
e-mail: abribian@ibec.pcb.ub.es

J. A. del Río  
e-mail: jadelrio@ibec.pcb.ub.es

S. Nocentini · D. Reginensi · P. Carulla · A. Bribian ·  
J. A. del Río  
Department of Cell Biology, Faculty of Biology,  
University of Barcelona, Barcelona, Spain

S. Nocentini · D. Reginensi · P. Carulla · A. Bribian ·  
J. A. del Río  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades  
Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain

S. Garcia · X. Trepap  
Integrative Cell and Tissue Dynamics, Institute for  
Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona Science Park,  
University of Barcelona, Barcelona, Spain

X. Trepap  
Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA),  
Barcelona, Spain

X. Trepap  
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona,  
Barcelona, Spain

X. Trepap  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades  
Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain

M. T. Moreno-Flores · F. Wandosell  
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Nicolás  
Cabrera, 1, Universidad Autónoma de Madrid (CBM-UAM),  
Madrid, Spain

F. Wandosell  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades  
Neurodegenerativas (CIBERNED), CBM-UAM,  
Madrid, Spain

**Keywords** Ensheathing glia · Traction force microscopy · Migration · Myelin-associated inhibitors

## Introduction

The olfactory system in the adult nervous system is renewed throughout life with the help of olfactory ensheathing cells (OECs). The elongation of newly generated olfactory receptor axons between the peripheral and central nervous system may be largely attributed to the properties of OECs. They ensheath and guide the axons of olfactory neurons that extend from the olfactory epithelium to the olfactory bulb [1–3]. Given their axon growth-promoting properties, natural or genetically modified OECs have been studied extensively, and they have been transplanted into the injured spinal cord to promote axonal regeneration [4–12]. Thus, OEC transplantation has emerged as a promising therapy for spinal cord injuries and other neural diseases [13–17]. Some OEC subpopulations have been identified in the olfactory system on the basis of their topographical distribution, intracellular cytoskeletal distribution, regenerative properties, and antigenic or gene expression profiles [18–24]. In fact, from a morphological point of view, two populations of OECs have been described *in vitro* and *in vivo*: Schwann cell-like OECs (sOECs), with fusiform bipolar form; and astrocyte-like OECs (aOECs), with a more flattened structure [25, 26]. However, the morphology of cultured OECs is strongly dependent on the culture conditions [21, 27, 28]. They transform from a fusiform to a flat-sheet shape spontaneously [29], and both sOECs and aOECs are likely to represent different morphologies of this motile and mitotic cell (see [30] for example).

Although they are useful for spinal cord repair, different OECs migratory properties have been reported after transplantation in lesioned central nervous system (CNS) [31, 32]. Indeed, Lee et al. determined by magnetic resonance tracking that OECs showed limited migration in injured spinal cord [33]. This was also reported in other studies using different techniques (e.g., [12], [34–38] among others). These results suggest that migration of OECs is modulated by specific interactions with the inhibitory substrate [39]. Indeed, in the injured spinal cord, lesioned axons and transplanted cells are confronted with a changing environment with a huge variety of growth inhibitory molecules located in the meningo-glial scar and adjacent spinal cord regions [40, 41]. Among others, the role of myelin-associated inhibitors (MAIs): Nogo-A, the myelin-associated glycoprotein (MAG) and the oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) have been extensively studied after spinal cord

lesions [42, 43]. These molecules block axon regeneration by acting through a common receptor: the Nogo receptor complex. This membrane receptor is formed by the GPI-anchored protein NgR1 and three putative co-receptors (p75, TROY, and Lingo-1) [42, 43]. In addition, new ligands have recently been reported to bind to the Nogo receptor complex (e.g., leucine-rich, glioma-inactivated (LGI) gene product [44], the B lymphocyte stimulator (BLyS) [45], members of the fibroblast growth factor FGF1 and FGF2 [46] and sulfatide [47]). Moreover, new receptors for MAIs have also been described: gangliosides [48], integrins [49], an NgR1 isoform: the NgR2 [50], G protein-coupled receptor 50 (GPR50) [51] and PirB [52].

OEC migration *in vitro* is modulated by neurotrophins, such as the glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), or chemicals such as lysophosphatidic acid (LPA) [53–55]. In addition, other secreted molecules involved in cell and axon migration, such as Slit-2, negatively modulate OEC migration [56]. However, although further studies are needed, it seems that Slit-2 is not over-expressed after spinal cord lesion [57], in contrast to Slit-1 and Slit-3 [57], semaphorins [58], Netrin-1 [59], chondroitin sulphate proteoglycans [60] and MAIs [61]. OECs show changes in their intracellular signaling mechanisms (Cofilin phosphorylation, RhoK activity and changes in  $Ca^{2+}$  stores) after Slit-2 treatment [56] that are shown by other inhibitory molecules [41]. In fact, these observations raised the notion that OECs may respond to a wide range of molecules. For MAIs, it has been reported that Nogo-66 fusion proteins (GST-Nogo-66 and His-Nogo-66) and Nogo-A enhance the adhesion of OECs, thus decreasing their migration *in vitro* [62]. Moreover, OECs increased its migration after PI-PLC treatment (to remove GPI-anchored NgR1) and  $\alpha$ -NgR antibody treatment *in vitro*; or when NgR1-mediated signaling in a spinal cord lesion model is neutralized by  $\alpha$ -NgR antibody infusion [62]. Taken together, these results indicate that Nogo-A/NgR signaling impairs OECs migration *in vitro* as well as *in vivo*. However, as indicated above, lesioned regions of the spinal cord may contain myelin debris as well as other inhibitors for long periods (more than 2 months in rodents [63] and years in humans [64]). Thus, in the present study, we aimed to explore the behavior and the migratory properties of OECs in the presence of myelin extracts by using single-cell tracking imaging on micro-patterned substrates. On the other hand, directed cell migration requires the spatial and temporal coordination of cell adhesion and protrusion with the generation of traction forces at the cell/extra-cellular matrix (ECM) interface [65]. These traction forces are mainly generated by the acto-myosin cytoskeleton and transmitted to the ECM through focal adhesions (FAs) [66–68]. Thus, we

also examined the effects of myelin on rodent OEC migration by traction force microscopy (TFM). First, we found that OECs express all the molecular machinery (Nogo receptor complex) required to transduce the inhibitory effects of MAIs, and that the migratory properties of OECs were blocked by myelin. Moreover, using TFM, we quantitatively demonstrate that OECs strongly decrease their traction stress over myelin, a finding that correlates with decreased focal contacts and redistribution of the F-actin cytoskeleton. Finally, we show that incubation of OEC cultures with the Nogo receptor 1 (NgR1) blocking peptide NEP1-40 [69] partially overcomes myelin-mediated migratory inhibition, thereby restoring the traction forces of the cells that correlate with cytoskeletal re-organization and re-appearance of focal contacts.

## Materials and methods

### Antibodies and biochemical reagents

The following antibodies were used at a dilution of 1:1,000 for Western blotting and/or 1:500 for immunohistochemical staining, unless otherwise indicated. Lingo-1 and actin (dilution 1:10,000) were from Millipore (Billerica, MA, USA). S100 $\beta$  was purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA) and TROY from R&D System (Minneapolis, MN, USA). GFAP was from DAKO (Glostrup, Denmark), p75 was from Promega (Madison, WI, USA). NgR1 was a gift from Prof. B.L. Tang (Singapore). Tubulin (1:5,000), vinculin (1:400), phalloidin-alexa594 and DAPI were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). ERK phospho-threonine 202/phospho-tyrosine 204 (pERK1-2) was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Total ERK antibody was from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA). Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit immunoglobulins were purchased from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). The goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) and rabbit anti-goat-HRP secondary antibodies used in the Western blots were from DAKO. Goat anti-rabbit-HRP was supplied by Sigma. Green fluorescent FITC-beads (0.75  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ ) used to bind myelin were kindly provided by Dr. A. Homs and Prof. J. Samitier (IBEC, Barcelona). In addition, the Nogo-66 (1–40) antagonist peptide (NEP1-40) was purchased from Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA). Myelin was purified from adult Sprague–Dawley rat CNS, as described [70]. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines established by the Spanish Ministry of Science and Technology and the European Community Council Directive 86/609 EEC.

### TEG3 cultures

The immortalized clonal cell line TEG3, which contains the SV40 large T antigen stable transfectant of OEG primary cultures, was prepared from adult rat olfactory bulbs [71]. Cells were maintained in ME10: DMEM–F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% bovine calf serum (SAFC Biosciences, Lanexa, VA, USA), 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pituitary extract (Invitrogen), 2  $\mu\text{M}$  forskolin (Sigma), 1% penicillin–streptomycin and 1% fungizone (Invitrogen). TEG3 cells between passages 4–8 were used for the experiments.

### Western-blot techniques

Cultured TEG3 cells were collected with a scraper and homogenized on ice in a buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM ethylene–glycol–tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100, and 13 protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). The lysate was clarified by centrifugation at  $12,000 \times g$  for 15 min, and the protein content of soluble fractions was determined using the Bio-Rad detergent-compatible assay (BCA) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cell extracts (20  $\mu\text{g}$ ) were boiled in Laemmli sample buffer at 100°C for 10 min, subjected to 8 or 15% SDS-PAGE, and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, United Kingdom). Extracts of mouse brain at postnatal day five were prepared and used as controls (see [70], for technical details). After transfer, membranes were incubated overnight with primary antibodies at 4°C. The following day, they were subsequently incubated with peroxidase-tagged secondary antibodies, and peroxidase activity was detected using the ECL-plus kit (Amersham Biosciences). Active RhoA was determined with a pull-down technique using the GST-Rhotekin-binding domain, as described previously [72], following the manufacturer's instructions (Rho Activation assay kit BK036, Tebu-Bio Barcelona, Spain).

### In vitro experiments and immunocytochemical methods

Glass coverslips (12 mm  $\varnothing$ ) were coated essentially as described [73]. Briefly, coverslips were precoated with poly-L-lysine 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dissolved in 0.1 M PBS (pH 7.3) and then washed. They were then incubated with myelin (0.01–0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), heat-inactivated myelin (0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  heated at 96°C for 1 h) or 0.1 M PBS alone, and then allowed to dry. Next, the coverslips were washed and coated with laminin (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , dissolved in 0.1 M PBS) and washed again with 0.1 M PBS. TEG3 counted cells were seeded onto substrate-coated coverslips in ME10 medium. Some of the cells seeded on coverslips containing myelin were treated with 1  $\mu\text{M}$  NEP1-40 by adding the peptide



directly to the culture media. Cells were cultured for 20 h and then the coverslips were fixed in 4% buffered paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1 M PBS, and blocked with 10% normal serum in 0.1 M PBS. Cells were sequentially incubated overnight with primary antibodies at 4°C and then with Alexa Fluor-tagged secondary antibodies for 1 h. Cells were rinsed in 0.1 M PBS, stained with 0.1  $\mu$ M DAPI diluted in 0.1 M PBS for 10 min, rinsed in 0.1 M PBS, and mounted on Fluoromount™ (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Time course of RhoA activation and ERK1-2 phosphorylation in TEG3 cells after myelin treatment was carried out adding myelin (0.02  $\mu$ g/ $\mu$ l) directly to the cellular media (ME10) at different times.

#### Adhesion stripe assays

Stripe assays were carried out as described previously [74–76]. Briefly, acid-washed coverslips were incubated overnight with poly-L-lysine (10  $\mu$ g/ml; Sigma) at 37°C, and after were rinsed several times with water and then air-dried. They were then inverted onto a silicon matrix provided by Dr. J. Jung (Max Planck Institute, Tübingen, Germany). Myelin (0.02  $\mu$ g/ $\mu$ l) or laminin (2  $\mu$ g/ml; Sigma) were mixed in 0.1 M PBS and the stripes were performed. The first protein was injected into the matrix channels and incubated for 2 h at 37°C. A solution of fluorescent Alexa 594-conjugated bovine serum albumin (2% in laminin; Molecular Probes) was then injected into the channels. After 2 h at 37°C, the channels were rinsed four times by injecting 0.1 M PBS. TEG3 cells were placed on the stripes and cultured for 24 h as indicated above. Stripe-functionalized coverslips were then fixed with 4% buffered paraformaldehyde for 10 min before DAPI staining, mounted in mounted on Fluoromount™ and photo-documented in an Olympus BX61 fluorescence microscope.

#### Time-lapse analysis of TEG3 migration

Fluorodish cell culture dishes (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) were coated with laminin or myelin as described above. We seeded  $5 \times 10^4$  TEG3 cells on the coated dishes and 20–24 h later we performed the time-lapse analysis. To study cell migration, we transferred the culture dishes to an LCI system (Live Cell Instruments, Seoul, Korea) for 20 h. The multi-tracking analysis was performed with the ImageJ™ software using the plugin mTrackJ (Biomedical Imaging Group Rotterdam of the Erasmus MC-University Medical Center Rotterdam, Netherlands). Tracking was performed in an inverted Olympus microscope IX-71 (20 $\times$  or 63 $\times$  objectives) and the images (5 megapixels) were captured by an Olympus XC-50 camera (150 frames, one frame every 8 min). Cell

tracking allows the analysis of the scrolling speed and position frame ( $X_t$ ,  $Y_t$ ). The cell position for each frame (position pixel) was determined with Matlab™ (Math Works, Natick, MA, USA), which provides a 3D graphic ( $x$ – $y$ – $z$ ,  $z$  = time) and the MSD. The same experiments were run over fluorodishes covered with  $\sim 70$ – $100$ - $\mu$ m-thick PAA gels prepared as previously described [77]. Briefly, to obtain a stiff gel of 12-kPa Young's modulus (PAA), 265  $\mu$ l of an acrylamide/bis-acrylamide mixture (15% acrylamide and 6.5% bis-acrylamide, Bio-Rad) was dissolved in ultrapure water containing 0.4% of 0.2  $\mu$ m diameter red fluorescent beads (Invitrogen), 0.5% ammonia persulfate and 0.05% TEMED (Bio-Rad). For multi-tracking, 3D plot, and MSD of the TEG3 migration, the mixture was added to the center of the dish, which was then coated and stored overnight at 4°C. Previous to this procedure, OEC adhesion analyses were performed using 12-, 1.4-, and 0.15-kPa PAA gels. The 12-kPa PAA gels were selected because OECs show greater adherence and migration in these gels.

#### Traction force measurement

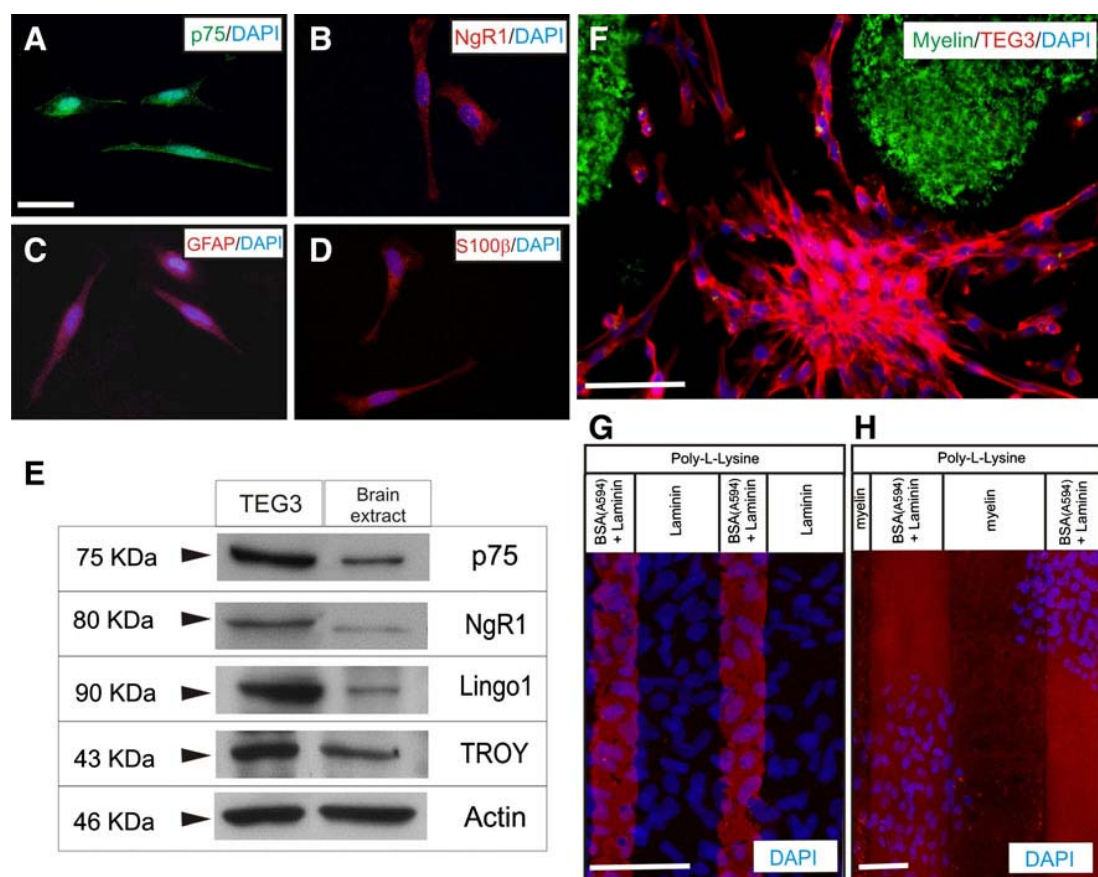
Cell tractions were evaluated using constrained Fourier-transform traction microscopy (FTTM) [78]. Briefly, the displacement field was calculated by comparing fluorescent microbead images obtained during the experiment with a reference image taken at the end of the experiment after the trypsinization and the consequent detachment of OECs from the underlying substrate. The projected cell area was calculated with Matlab™, based on the manual tracing of the OEC contours determined by a phase contrast image obtained at the start of the experiment. A particle imaging velocimetry algorithm [79] was used to determine the deformation of the substrate caused by the traction forces.

#### Statistical analysis

Summary data are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) of at least three independent experiments. Means were compared by one-way ANOVA test. A value of  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

TEG3 is a clonal OEC line that shows similar growth-promoting capacity to non-modified OECs [71]. In addition, this cell line shows all the types of morphology described for primary OECs in culture [11, 80]. In a first set of experiments, we characterized the TEG3 cell line in our culture conditions (Fig. 1). In these conditions, fusiform forms were predominant over flat-shaped ones (Fig. 1a–d).

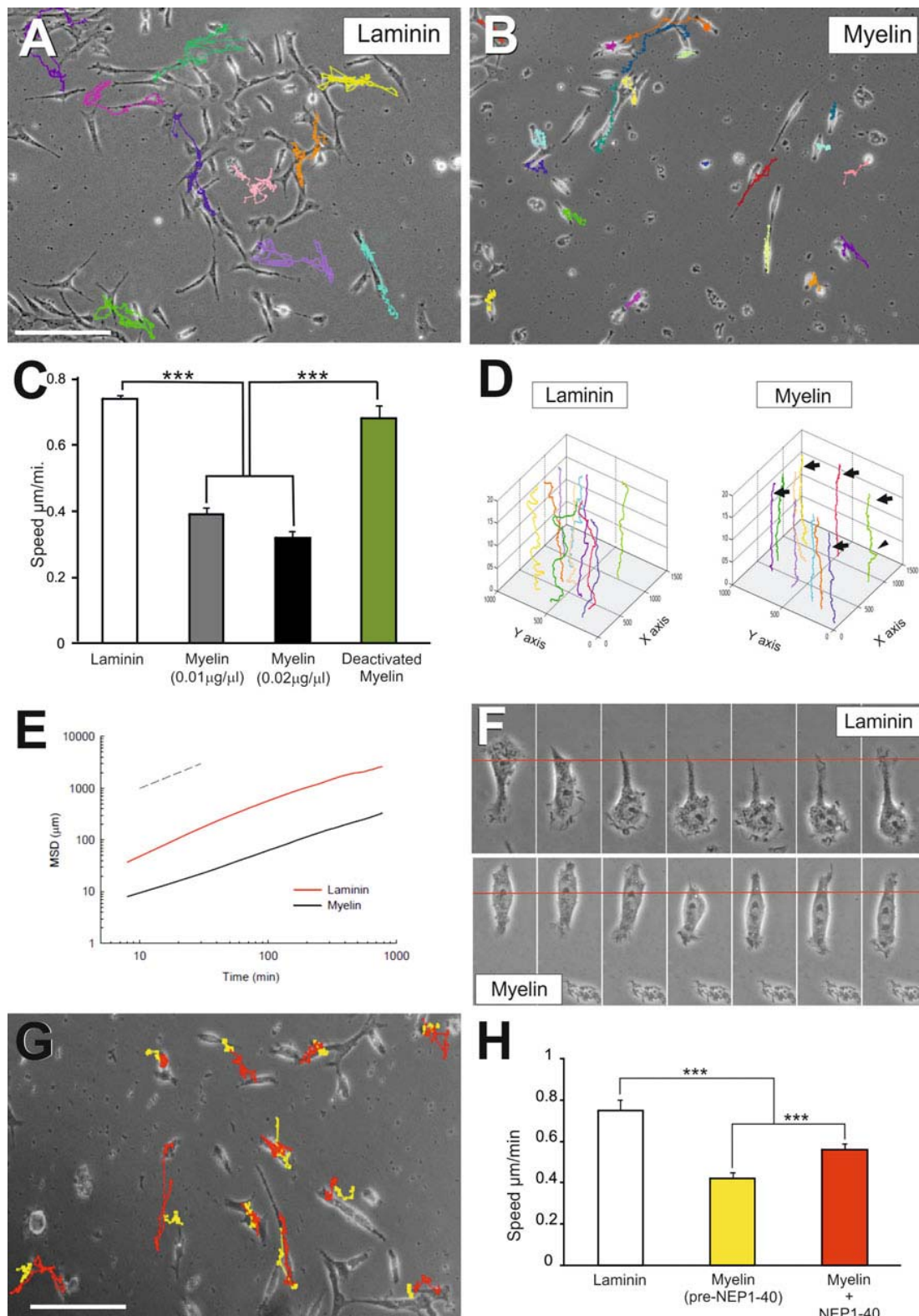


**Fig. 1** Expression of Nogo receptor complex elements and effects of myelin in TEG3 cell adhesion. **a–d** Photomicrographs illustrating the expression of p75 (**a**), NgR1 (**b**), GFAP (**c**), and S100 $\beta$  (**d**) in cultured TEG3 cells. **e** Western blotting detected the expression of p75, NgR1, Lingo 1, and TROY in cultured TEG3 cells and brain extracts (see the section Materials and methods for details). Actin was blotted as internal control. **f** Photomicrographs illustrating an example of the distribution of TEG3 cells cultured on glass substrates containing spots of Alexa-tagged myelin. Note that TEG3 cells (Phalloidin-

positive, *red*) are not localized on myelin containing regions (*green*). **g, h** Examples of stripe assays using TEG3 cells. In both cases, a coating of poly-L-lysine was uniformly distributed in all the culture area. Alternative stripes containing Alexa594-tagged BSA + laminin and laminin were generated (**g**) or Alexa594-tagged BSA + laminin and myelin (**h**). DAPI-stained TEG3 cells do not adhere in myelin-containing stripes (**h**) (see also Results). *Scale bars: a = 25  $\mu$ m* pertains to **b–d**; *f = 50  $\mu$ m*; *g* and *h = 50  $\mu$ m*

Specific markers of OECs (p75, S100 $\beta$ , or GFAP) were present in our cultured cells (Fig. 1a–d). Next, using Western blotting, we examined whether TEG3 cells express members of the common receptor machinery for MAIs (Nogo receptor complex) [81–83]. Indeed, the revealed blots demonstrated that p75, NgR1, TROY, and Lingo1 were expressed by cultured TEG3 cells (Fig. 1e). This complex was functional since incubation with myelin increased activated RhoA as well as ERK1-2 phosphorylation (supplementary material Fig. S1). In a second set of experiments, we cultured these cells in 35-mm  $\varnothing$  culture dishes patterned with dots of myelin tagged with 0.75  $\mu$ m  $\varnothing$  FITC beads. After Phalloidin-Alexa594 incubation and DAPI counterstaining, cells were exclusively located in regions not containing myelin-FITC (Fig. 1f). To avoid unspecific effects produced by FITC-tagged microbeads on

OEC adhesion, we performed a stripe assay using brain myelin extract as substrate (Fig. 1f, h). DAPI-stained TEG3 cells were observed homogeneously distributed in stripes containing poly-L-lysine and either laminin or BSA-Alexa594-laminin (Fig. 1g). In contrast, cells did not adhere to stripes containing poly-L-lysine/myelin compared to poly-L-lysine/BSA-Alexa594-laminin (Fig. 1h). Next, we performed a multiple cell migration analysis of TEG3 cells growing over poly-L-lysine + laminin- (Fig. 2a) or poly-L-lysine + myelin-coated substrates (Fig. 2b). Low-density TEG3 cultures were monitored for 20 h (20 $\times$  objective; one frame every 8 min) in an inverted Olympus IX-71 microscope equipped with a cooled fluorescence camera and a cell culture incubation chamber (see the section Materials and methods for details). The migration speed of OECs grown on myelin-coated substrates



(0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) showed a decrease of 46.7% and 57.1%, respectively, compared to those on laminin-coated substrates (Fig. 2c) ( $0.77 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$  (laminin);

$0.41 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$  (myelin; 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ );  $0.33 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$  (myelin; 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Fig. 2c). In contrast, cell migratory capacity was restored (up to 92.2%,  $0.71 \pm 0.04$



◀ **Fig. 2** Analysis of the migratory properties of TEG3 cells on coated glass substrates. **a, b** Examples of TEG3 cell migration on laminin (**a**) or myelin (**b**) coated glass substrates. Each cell trajectory is labeled with a different color line after the software analysis (ImageJ™). **c** Histogram showing the speed (*Y* axis) of cultured TEG3 cells on laminin, two different myelin concentrations and heat-denatured myelin. **d** Examples of three-axis representation of the trajectories of identified TEG3 cells in the focal plane (*x,y*) along time (*z*-axis, **h**). Note that identified TEG3 cells do not modify its (*x,y*) position over time (*arrows*) with few of them showing small displacements (*arrowhead*) compared to laminin. **e** Plot analysis of the MSD of TEG3 cells growing on laminin (*red*) or myelin (*black*). **f** Photomicrographs illustrating images of TEG3 cells behavior when cultured on laminin (*upper panels*) or myelin (*lower panels*). Each picture was obtained after 8 min. Note the small displacement and nuclear translocation of TEG3 cells on myelin compared to the clear nuclear translocation of parallel cultures on laminin. **g** Example of the NEP1-40 effects of individual TEG3 migration on myelin-coated glass substrate. The trajectory of selected TEG3 cells without treatment is labeled in *yellow*. *Red lines* show the changes observed after the incubation with NEP1-40 in the selected cells. **h** Histogram showing the results of the time lapse analysis and the effect of the NEP1-40 incubation. Data are represented by mean  $\pm$  SEM of three different experiments and ten identified cells per experiment. *Scale bars*: **a** = 200  $\mu$ m pertains to **b**; **g** = 200  $\mu$ m. *Asterisks* in **c** and **h** indicate statistical differences ( $p < 0.05$ , ANOVA test)

of the laminin migration value) by culture cells in heat-denatured myelin-coated substrate (Fig. 2c, green bar). A three-axis plot [*x/y* position vs. time (**h**)] revealed higher motile persistence on laminin-coated than on myelin-coated substrate (Fig. 2d).

To systematically analyze cell migration, we computed the mean square displacement (MSD) of cell trajectories. We then fitted the MSD to a power law expression:  $MSD = D \times \Delta t^\beta$ , where  $D$  is a scaling parameter and  $\beta$  indicates the degree of persistence. When  $\beta = 1$  the motion is random, when  $\beta < 1$  the motion is subdiffusive (anti-persistent), and when  $\beta > 1$  the motion is superdiffusive (persistent) [84]. For each time interval studied, cells on laminin-coated substrates migrated further than those on myelin-coated substrates (Fig. 2e). To assess the degree of persistence as a function of the time interval, we calculated the local value of  $\beta$  as:  $\beta = \partial \log(MSD) / \partial \log(\Delta t)$  [84]. Cells growing on myelin-coated substrates exhibited a slightly subdiffuse behavior regardless of the time interval studied. In contrast, those on laminin-coated substrates moved in a slightly superdiffusive manner at short time intervals but their trajectories became progressively subdiffusive with increasing time (Fig. 2e). Taken together, these data indicate that while cells seeded on laminin-coated substrates were more motile than those on myelin-coated, they oscillated around their initial position over long intervals (Fig. 2d).

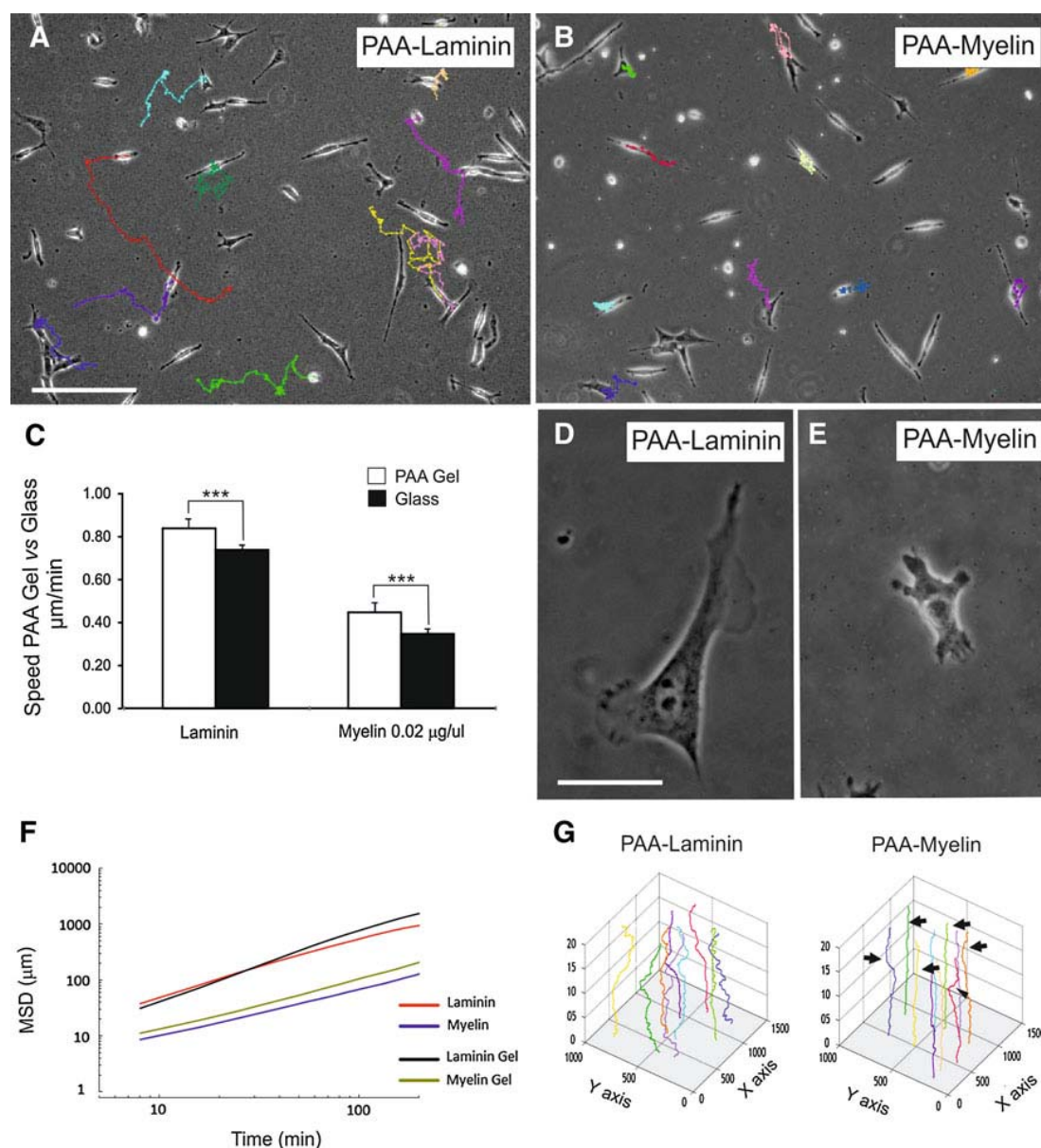
High-power microscopic observation of cells growing on laminin and myelin showed the specific details of their migration (Fig. 2f). Cells growing on laminin-coated substrate migrated in a similar manner to a fibroblast-like

cell with dynamic lamellipodia and further nuclear translocation to the cell leading edge, leaving a tail process (Fig. 2f, upper panels). In fact, the cells translocated the nuclei between caudal to rostral cell locations following the largest lamellipodia. However, cells growing on myelin displayed decreased lamellipodia dynamics and motile small lamellipodia were observed in several cell domains (Fig. 2f, lower panels). This finding contrasts with the behavior of cells growing on laminin, where two main lamellipodia were located on the opposite sides of the fusiform cell, with few transient lamellipodia that displaced laterally along the cell (see also Fig. 3d, e).

We next analyzed the migration distance of identified cells growing on myelin in the absence or presence of the NgR1 inhibitor peptide NEP1-40, to block MAIs effects (Fig. 2g, h). Non-treated cells migrated shorter distances, showing a decrease of 48% compared to those on laminin-coated substrates ( $0.39 \pm 0.03$  vs.  $0.75 \pm 0.02$   $\mu$ m/min, respectively). These distances increased by around 33% after the addition of the NgR1 blocking peptide ( $0.52 \pm 0.03$   $\mu$ m/min) (Fig. 2h).

Cells generate traction forces against their substrate during adhesion and migration, and traction forces are used, in part, by cells to sense the substrate. Thus, using TFM, we aimed to determine the distribution of traction forces in OECs cultured on a well-characterized polyacrylamide (PAA) gel, which is linearly elastic, optically clear, and amenable to protein conjugation [85] (Fig. 3). First we cultured OECs in PAA gels containing laminin (2  $\mu$ g/ml) or myelin (0.02  $\mu$ g/ $\mu$ l) and performed time-lapse analysis as above for 10 h (Fig. 3a, b). TEG3 cells growing on PAA coated with laminin or myelin displayed slightly higher migration speeds compared to those cultured on coated glass culture plates (Fig. 3c). Cultured cells over PAA containing laminin or myelin showed similar morphologies than those cultured on glass (Fig. 3d, e). MSD analysis indicates that cells on laminin-coated substrates (glass or PAA) showed similar motion properties being more motile than those on myelin-coated substrates (Fig. 3f, g).

Using TFM, we observed that TEG3 cells seeded on laminin-coated substrates transferred higher strain energy ( $0.037 \pm 0.0061$  pJ) to their underlying substrate than those seeded on myelin-coated substrates ( $0.0033 \pm 0.0007$  pJ) (Fig. 4). Treatment with NEP1-40 induced a significant increase (2.75-fold increase) in strain energy ( $0.0091 \pm 0.0016$  pJ) (Fig. 4b). These findings suggest that increased traction force generation provides OECs with greater migratory capacity. To study the mechanisms underlying changes in traction force generation in laminin versus myelin substrates as well as the effect of Nogo receptor complex blockage by NEP1-40, we examined the



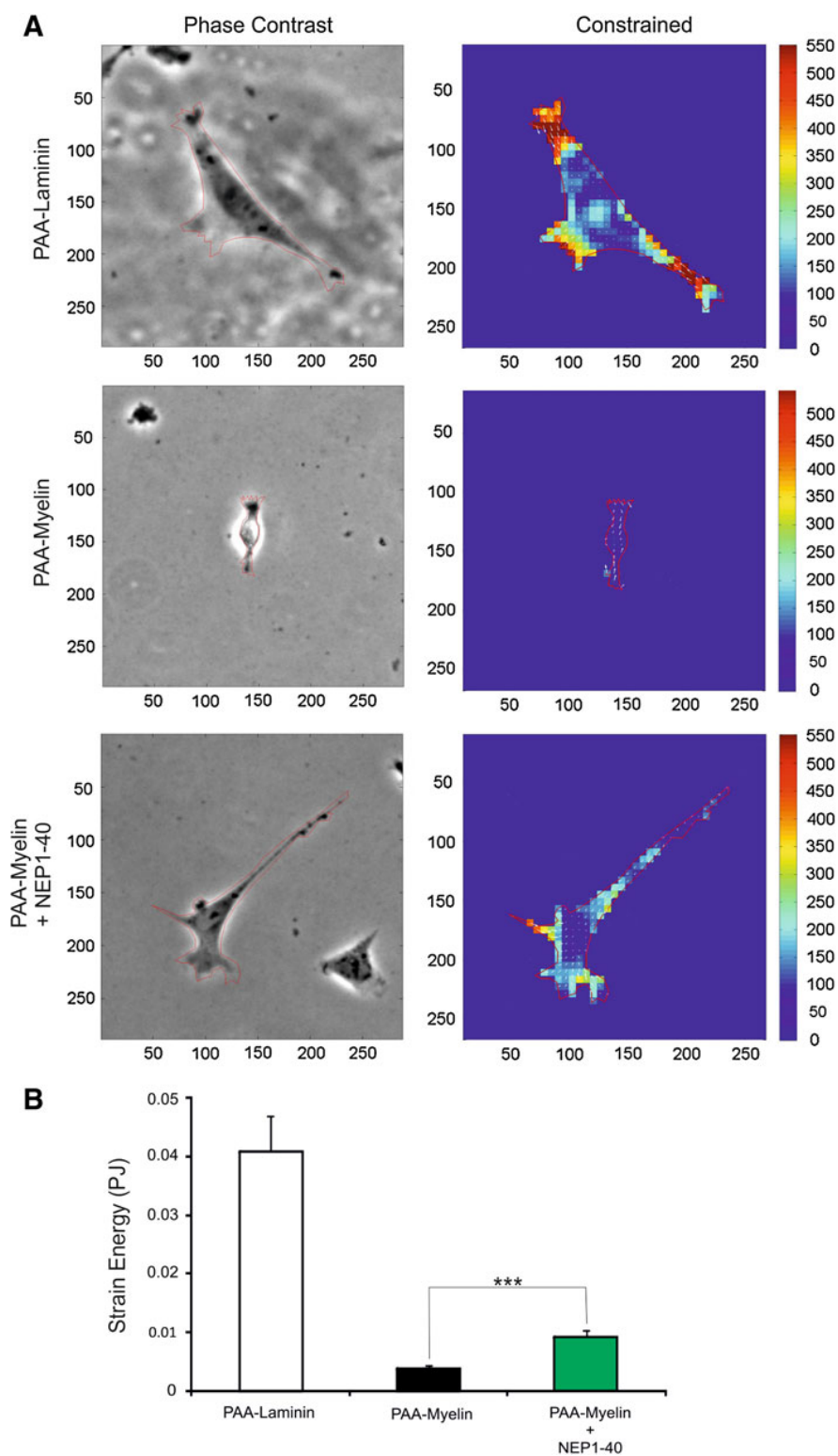
**Fig. 3** Analysis of the migratory properties of TEG3 cells on coated PAA gels. **a, b** Examples of TEG3 cell migration on PAA-laminin (**a**) or PAA-Myelin (**b**) gels. Each cell trajectory is labeled with a different color line after the software analysis (ImageJ<sup>TM</sup>). **c** Histograms illustrating the quantitative results of the migration assays. Notice that TEG3 cells, irrespective of the coating (laminin or myelin), showed increased speed on PAA gels than glass substrates. **d, e** High-power photomicrographs illustrating examples of TEG3 cells growing on PAA-laminin (**d**) and PAA-myelin (**e**). Notice the strong reduction of cell protrusions over PAA-myelin gels. **f** MSD

plot of TEG3 cells growing on PAA (laminin and myelin gel, *black* and *green* lines) or in glass-coated substrates (laminin and myelin, *red* and *blue* lines). See Results for details. **g** Three-axis plots illustrating the migratory trajectories of cultured TEG3 cells in PAA-laminin and PAA-myelin. Notice the decreased number of trajectory changes of identified TEG3 cells on PAA-myelin (*arrows*). Plot scales are of Fig. 2. *Scale bars*: **a** = 200 µm; **d** = 20 µm. Data in (**c**) is represented as mean ± SEM of a three different experiments. *Asterisks* in **c** indicate statistical differences ( $p < 0.05$ , ANOVA test)

intracellular distribution of F-actin (Fig. 5a, b) and FAs (vinculin-positive) (Fig. 5c–f). Results indicate the negligible presence of Phalloidin-Alexa594-positive stress fibers (Fig. 5b) and FAs (Fig. 5e) in TEG3 cells cultured on

myelin substrates in contrast to laminin (Fig. 5a (F-actin) and Fig. 5c, d (FAs)). In addition, the distribution of FAs in cells incubated with NEP1-40 was partially recovered as determined after vinculin labeling (Fig. 5f).

**Fig. 4** TFM analysis of cultured TEG3 cells. **a** Quantitation of cellular traction forces of cultured TEG3 cells in PAA-laminin, PAA-myelin, and PAA-myelin + NEP1-40. A phase-contrast image of examples of cultured cells is shown on the *left side*. The scale in  $\mu\text{m}$  is also displayed in the lower and the *left side* of each image. In addition, the force map of cultured cells is shown on the *right column*. *Arrows* indicate the direction of the bead displacement. The color scale indicates the magnitude of the cellular traction forces (measured in Pa). **b** Histogram illustrating the quantitative results of the TFM analysis. Data in **b** is represented as mean  $\pm$  SEM of the TFM analysis of 61 cells (PAA-laminin), 83 cells (PAA-myelin) and 62 cells (PAA-myelin + NEP1-40). *Asterisks* in **b** indicate statistical differences ( $p < 0.05$ , ANOVA test)



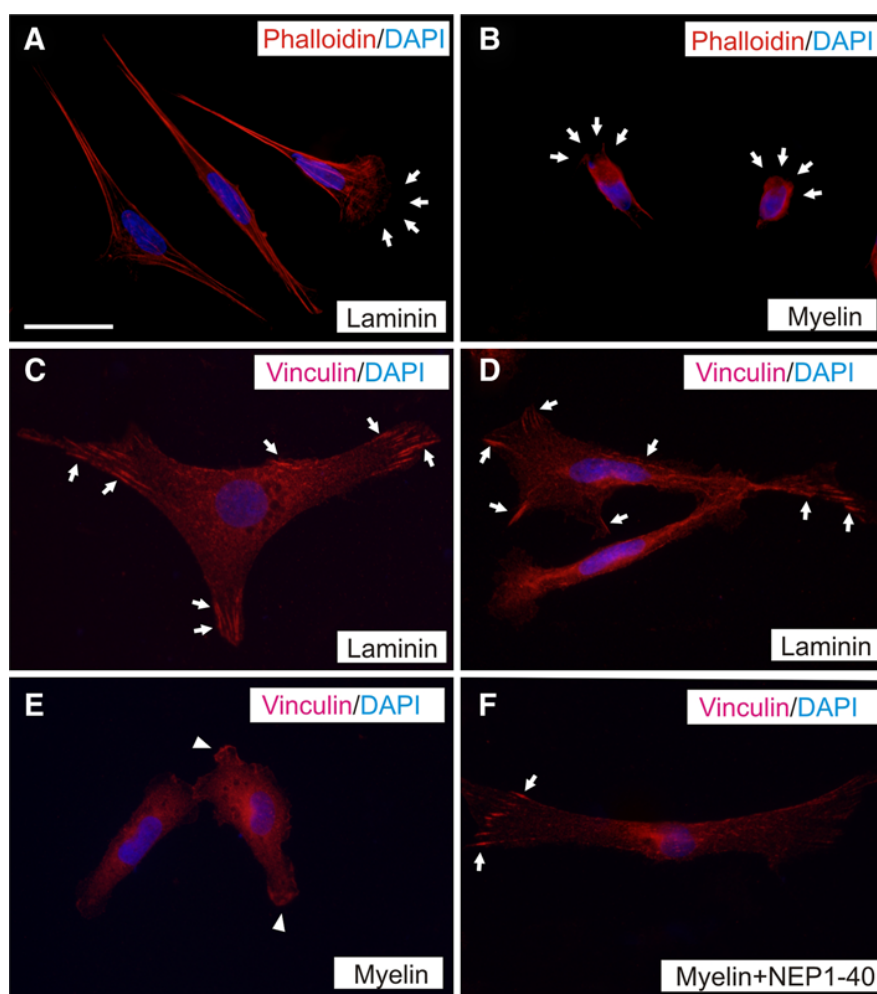
## Discussion

As a result of their intrinsic properties, OECs and genetically modified OECs have been extensively transplanted

into the injured spinal cord to promote axonal regeneration [4–11]. However, several studies failed to find unique migratory properties of OECs when implanted into damaged brain or spinal cord lesion (see Introduction for

**Fig. 5** Changes in stress fibers and FA distribution in cultured TEG3 cells.

**a, b** Photomicrographs illustrating the distribution of F-actin in cultured TEG3 cells growing on laminin (**a**) or myelin (**b**). Stress fibers are clearly identified in **a** and poorly defined in **b**. Arrows in **a** and **b** point to cellular protrusions. **c–f** Distribution of FA (arrows) in cultured TEG3 cells on laminin (**c, d**), myelin (**e**), and myelin + NEP1-40. Notice the loss of FA and the diffuse vinculin-staining in TEG3 cells cultured over myelin (arrowheads in **e**) and the recovery of the FA (vinculin-positive) after incubation with NEP1-40 (arrows in **f**). Scale bars: **a** = 20  $\mu$ m pertains to **b–f**



references). Although several authors examined OEC interaction with growing axons [86, 87], a number of parallel studies began to analyze the intrinsic migratory properties of OECs in order to improve their effectiveness after transplantation. Thus, research into OEC migration and proliferation has recently been performed on over glass surfaces with artificially generated gradients [53, 54, 56, 88], in collagen scaffolds [89, 90], in nanofibers [91], and in biomaterial-coated substrates [92, 93]. It has been demonstrated that TROY [94] and NgR1 are expressed in OECs [62, 95]. However, the present study is the first to report that cultured rodent OECs express all the elements of the Nogo receptor complex. In addition, we demonstrate that this receptor complex is active since OECs activate RhoK and increase ERK1-2 phosphorylation in response to myelin. Indeed, myelin inhibits OEC migration over glass surfaces but also in linearly elastic PAA gels.

From a biophysical point of view, our MSD data analysis indicates that cultured OECs migrate in an anti-persistent (subdiffusive) manner both over laminin and

myelin on glass and PAA. In addition, our results may explain, to some extent, the findings of Gudiño-Cabrera and coworkers, who reported that transplanted OECs migrate preferentially in the opposite direction to the regenerating axon target and thus fail to promote axon regeneration [31]. Furthermore, OECs transplanted into the lesioned spinal cord must be placed on both sides of the lesion and, close to it, in order to be effective (e.g., [35]). On the basis of our MSD data, we propose that additional factors are required to generate a persistent and directed movement of OECs in vivo [96], as reported in vitro [29]. Indeed, a study by Su et al. indicates that TNF- $\alpha$  released by reactive astrocytes in the meningo-glial scar attracts OECs [97]. This result may explain why OECs invade the lesion cavity containing reactive glia when transplanted at shorter distances [35]. In fact, OECs interact and intermingle with astroglial cells in contrast to other cell types (e.g., Schwann cells) [98]. Moreover, OECs transplanted into the lesion cavity only migrate over short distances in adjacent regions [12]. Indeed, these surrounding areas are



rich in myelin debris as well as other inhibitory molecules (e.g., [41]).

OECs show lower migratory potential in lesioned spinal cord than controls [99]. In this regard, anti-NgR-treated OECs show greater migration in spinal cord in white matter tracts than controls [62]. In addition, in the same study, OECs cultured on Nogo-66- or Nogo-His-coated coverslips showed increased adhesion and reduced migration as a result of enhanced formation of paxillin-positive FAs and increased cell spreading, which was overcome by incubation with Y-27632 (a RhoK inhibitor) [62]. In our study, OECs cultured on myelin showed decreased spreading and fewer cell protrusions, stress fibers and FAs (vinculin-positive), and these effects were partially reversed by the NEP1-40 peptide. These data also paralleled those obtained from PAA gels. The differences in cell spreading between our data and those reported by Su and coworkers could be attributed to their use of a recombinant peptide or Nogo-A protein instead of complete myelin extract (containing several inhibitory proteins and lipids; see Introduction for details). The studies show different cell spreading of OECs growing over myelin or Nogo-66 peptides. Although the cell spreading of OECs cultured over Nogo-A is not illustrated by Su et al. we cannot completely rule out that the cell spreading mechanism in OECs could be different from that of other cell types. A study by Oertle et al. reported that Nogo-66, Nogo-C, and Nogo-66 peptide 4 (shown to be the inhibitory regions of Nogo-66 by GrandPre and coworkers [100]) are not inhibitory for fibroblasts spreading in culture (see Fig. 2 of [101]). In fact, two Nogo-A regions (59–172 aa and 544–725 aa) showed the increased inhibition of cell spreading in cultured fibroblasts. Thus, we conclude that specific Nogo-A domains may have a different effect on OECs spreading in a balanced way. On the other hand, in the same study, the authors report that higher concentrations of the cell-spreading inhibitory peptides became anti-adhesive. It has been reported that cell adhesion and migration showed a biphasic distribution and an optimal balance between adhesion and migration must be achieved by cells before they can migrate [102]. Indeed, if adhesion is lower or higher than an optimal level, migration may be decreased.

On the other hand, molecules other than Nogo-A may interact with Nogo receptor complex (e.g., OMgp, MAG, sulfatide) as well as with other undetermined MAIs receptors expressed by cultured OECs. Although further studies for OECs are needed, it has been described that the N-terminal domain inhibits COS-7 or HUVEC adhesion by acting through  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 5$  and  $\alpha 4$  integrins, leading to decreased activity of focal adhesion kinase (FAK) in treated cells [49]. Our data showing a moderate recovery of the migratory properties and strain energy (see below) of

TEG3 after NEP1-40 incubation suggest the presence of parallel inhibitory mechanisms.

Cell migration relies on the interplay between two cycles, one involving extension and contraction of its cytoskeleton, and the other involving formation and retraction of its adhesions. Traction forces come into play in the synchronization of both cycles by causing forced de-adhesion at the trailing edge and by driving the resulting forward motion of the cell body. Therefore, the balance between traction force and adhesion strength can be understood as a direct indicator of cell migration capacity. Using TFM and single-cell tracking, we showed that even if OECs cells on laminin exhibit increased concentration of focal adhesion proteins, the increased traction force is sufficient to tilt the mechanical balance toward a pro-migratory phenotype. The contribution of FAs to cell migration has been widely debated. Su et al. (2007) reported that OECs growing on Nogo-66 resembled flat-sheet cells. This observation could be attributed to a maintenance role of FA with little migration potential, as suggested for flat-shaped OECs. However, although we cannot rule out cell-specific factors for OECs, FA distribution and FA-mediated signaling in several cell types correlates with traction force parameters, nuclear translocation and cell migration (e.g., keratinocytes [103], invasive tumor cells [104], or fibroblasts [105, 106]).

In addition, our data show that OECs cultured on PAA substrates, the mechanical properties of which clearly differ from substrates coated on glass slides, increase their migratory potential. In this regard, recent data report increased proliferation and migration of OECs growing on several scaffolds (see above). Thus, it is feasible that a nanostructured scaffold would serve as a mechanical guide for OEC migration, thereby preventing the interaction of these cells with a putative inhibitory ECM. In this respect, migrating cells sense and respond to external stimuli. In fact, mechanical inputs can also be powerful regulators of cell behavior [103]. In physiological conditions, the migration of most cells occurs in an adhesion-dependent manner and involves the formation of FA at the membrane and the generation of mechanical forces via the actin-myosin network [103]. MAIs and receptors modulate the establishment of this network as well as microtubule dynamics [81, 107]. Indeed, MAI-induced arrest of CNS axon growth is either induced after MAI receptor, the  $Ca^{2+}$ -dependent activation of the epidermal growth factor receptor (EGFr), or induced by sequential RhoA/RhoK/LIM-kinase/cofilin phosphorylation, leading to actin depolymerization [108]. In parallel, microtubule stabilization is also compromised after exposure to MAIs [109]. Our results reinforce the notion that molecules present in myelin extracts act on Nogo receptor complex as well as on other receptors, and may modulate OEC cytoskeleton and



FAs distribution. In conclusion, our data suggest that a cell-based strategy using OECs to overcome the inhibitory action of myelin is required in order to enhance the migratory properties and the persistence of OECs in axon re-growth and their functional recovery in the lesioned CNS.

**Acknowledgments** The authors thank R. Rycroft for linguistic advice and G. Tormen for technical assistance. This work was supported by FP7-PRIORITY, the MICINN (BFU2009-10848) and grants from the *Instituto Carlos III* (PI11/03028) and SGR2009-366 (*Generalitat of Catalunya*) to JADR. SN and PC were supported by the MICINN. DR is supported by a fellowship from the National Commission for Science and Technology (CONICYT, Chile). AB is a Sara Borrell postdoctoral research of the *Instituto Carlos III*. XT acknowledges support of the Spanish Ministry for Science and Innovation (BFU2009-07595) and the European Research Council (Grant Agreement 242993). F. Wandosell was supported by MICINN (SAF2009-12249-C02-01).

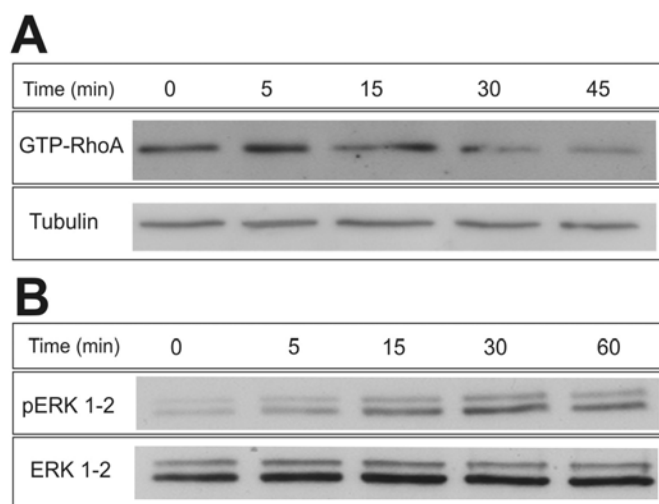
## References

- Ramon-Cueto A, Valverde F (1995) Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* 14(3):163–173
- Doucette R (1995) Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol Histopathol* 10(2):503–507
- Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H (2011) The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Mol Brain* 4(1):34
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25(2):425–435
- Li Y, Field PM, Raisman G (1997) Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277(5334):2000–2002
- Navarro X, Valero A, Gudino G, Fores J, Rodriguez FJ, Verdu E, Pascual R, Cuadras J, Nieto-Sampedro M (1999) Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann Neurol* 45(2):207–215
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1994) Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 127(2):232–244
- Ruitenber MJ, Plant GW, Christensen CL, Blits B, Niclou SP, Harvey AR, Boer GJ, Verhaagen J (2002) Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene Ther* 9(2):135–146
- Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18(10):3803–3815
- Garcia-Alias G, Lopez-Vales R, Fores J, Navarro X, Verdu E (2004) Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 75(5):632–641
- Moreno-Flores MT, Bradbury EJ, Martin-Bermejo MJ, Agudo M, Lim F, Pastrana E, Avila J, Diaz-Nido J, McMahon SB, Wandosell F (2006) A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. *Mol Ther* 13(3):598–608
- Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ (2004) Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 473(1):1–15
- Raisman G (2007) Repair of spinal cord injury by transplantation of olfactory ensheathing cells. *C R Biol* 330(6–7):557–560
- Moreno-Flores MT, Avila J (2006) The quest to repair the damaged spinal cord. *Recent Pat CNS Drug Discov* 1(1):55–63
- Radtke C, Kocsis JD, Vogt PM (2009) Chapter 22: Transplantation of olfactory ensheathing cells for peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* 87:405–415
- Ramon-Cueto A, Munoz-Quiles C (2011) Clinical application of adult olfactory bulb ensheathing glia for nervous system repair. *Exp Neurol* 229(1):181–194
- Su Z, He C (2010) Olfactory ensheathing cells: biology in neural development and regeneration. *Prog Neurobiol* 92(4):517–532
- Windus LC, Lineburg KE, Scott SE, Claxton C, Mackay-Sim A, Key B, St John JA (2010) Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cell Mol Life Sci* 67(10):1735–1750
- Guerout N, Derambure C, Drouot L, Bon-Mardion N, Duclos C, Boyer O, Marie JP (2010) Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58(13):1570–1580
- Vincent AJ, West AK, Chuah MI (2005) Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J Neurocytol* 34(1–2):65–80
- Au E, Roskams AJ (2003) Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* 41(3):224–236
- Roet KC, Bossers K, Franssen EH, Ruitenber MJ, Verhaagen J (2011) A meta-analysis of microarray-based gene expression studies of olfactory bulb-derived olfactory ensheathing cells. *Exp Neurol* 229(1):10–45
- Richter MW, Fletcher PA, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ (2005) Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *J Neurosci* 25(46):10700–10711
- Novikova LN, Lobov S, Wiberg M, Novikov LN (2011) Efficacy of olfactory ensheathing cells to support regeneration after spinal cord injury is influenced by method of culture preparation. *Exp Neurol* 229(1):132–142
- Kumar R, Hayat S, Felts P, Bunting S, Wigley C (2005) Functional differences and interactions between phenotypic subpopulations of olfactory ensheathing cells in promoting CNS axonal regeneration. *Glia* 50(1):12–20
- Franceschini IA, Barnett SC (1996) Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol* 173(1):327–343
- Higginson JR, Barnett SC (2011) The culture of olfactory ensheathing cells (OECs)-a distinct glial cell type. *Exp Neurol* 229(1):2–9
- Richter M, Westendorf K, Roskams AJ (2008) Culturing olfactory ensheathing cells from the mouse olfactory epithelium. *Methods Mol Biol* 438:95–102
- Huang ZH, Wang Y, Cao L, Su ZD, Zhu YL, Chen YZ, Yuan XB, He C (2008) Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay. *Cell Res* 18(4):479–490
- van den Pol AN, Santarelli JG (2003) Olfactory ensheathing cells: time lapse imaging of cellular interactions, axonal support, rapid morphologic shifts, and mitosis. *J Comp Neurol* 458(2):175–194

31. Gudino-Cabrera G, Pastor AM, de la Cruz RR, Delgado-Garcia JM, Nieto-Sampedro M (2000) Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal regrowth in the CNS. *Neuroreport* 11(3):467–471
32. Nieto-Sampedro M (2003) Central nervous system lesions that can and those that cannot be repaired with the help of olfactory bulb ensheathing cell transplants. *Neurochem Res* 28(11):1659–1676
33. Lee IH, Bulte JW, Schweinhardt P, Douglas T, Trifunovski A, Hofstetter C, Olson L, Spenger C (2004) In vivo magnetic resonance tracking of olfactory ensheathing glia grafted into the rat spinal cord. *Exp Neurol* 187(2):509–516
34. Lu P, Yang H, Culbertson M, Graham L, Roskams AJ, Tuszynski MH (2006) Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. *J Neurosci* 26(43):11120–11130
35. Pearse DD, Sanchez AR, Pereira FC, Andrade CM, Puzis R, Pressman Y, Golden K, Kitay BM, Blits B, Wood PM, Bunge MB (2007) Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia* 55(9):976–1000
36. Amemori T, Jendelova P, Ruzickova K, Arboleda D, Sykova E (2010) Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat. *Cytotherapy* 12(2):212–225
37. Pettersson J, Lobov S, Novikova LN (2010) Labeling of olfactory ensheathing glial cells with fluorescent tracers for neurotransplantation. *Brain Res Bull* 81(1):125–132
38. Li BC, Li Y, Chen LF, Chang JY, Duan ZX (2011) Olfactory ensheathing cells can reduce the tissue loss but not the cavity formation in contused spinal cord of rats. *J Neurol Sci* 303(1–2):67–74
39. Saxton MJ (2007) Modeling 2D and 3D diffusion. *Methods Mol Biol* 400:295–321
40. Fawcett JW (2006) Overcoming inhibition in the damaged spinal cord. *J Neurotrauma* 23(3–4):371–383
41. Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5(2):146–156
42. Cao Z, Gao Y, Deng K, Williams G, Doherty P, Walsh FS (2010) Receptors for myelin inhibitors: Structures and therapeutic opportunities. *Mol Cell Neurosci* 43(1):1–14
43. Giger RJ, Venkatesh K, Chivatakarn O, Raiker SJ, Robak L, Hofer T, Lee H, Rader C (2008) Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems. *Restor Neurol Neurosci* 26(2–3):97–115
44. Thomas R, Favell K, Morante-Redolat J, Pool M, Kent C, Wright M, Daignault K, Ferraro GB, Montcalm S, Durocher Y, Fournier A, Perez-Tur J, Barker PA (2010) LGI1 is a Nogo receptor 1 ligand that antagonizes myelin-based growth inhibition. *J Neurosci* 30(19):6607–6612
45. Zhang L, Zheng S, Wu H, Wu Y, Liu S, Fan M, Zhang J (2009) Identification of BLYS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor. *J Neurosci* 29(19):6348–6352
46. Lee H, Raiker SJ, Venkatesh K, Geary R, Robak LA, Zhang Y, Yeh HH, Shrager P, Giger RJ (2008) Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci* 28(11):2753–2765
47. Winzeler AM, Mandemakers WJ, Sun MZ, Stafford M, Phillips CT, Barres BA (2011) The lipid sulfatide is a novel myelin-associated inhibitor of CNS axon outgrowth. *J Neurosci* 31(17):6481–6492
48. Worter V, Schweigreiter R, Kinzel B, Mueller M, Barske C, Bock G, Frentzel S, Bandtlow CE (2009) Inhibitory activity of myelin-associated glycoprotein on sensory neurons is largely independent of NgR1 and NgR2 and resides within Ig-Like domains 4 and 5. *PloS one* 4(4):e5218
49. Hu F, Strittmatter SM (2008) The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *J Neurosci* 28(5):1262–1269
50. Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ (2005) The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci* 25(4):808–822
51. Grunewald E, Kinnell HL, Porteous DJ, Thomson PA (2009) GPR50 interacts with neuronal NOGO-A and affects neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 42(4):363–371
52. Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M (2008) PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* 322(5903):967–970
53. Cao L, Su Z, Zhou Q, Lv B, Liu X, Jiao L, Li Z, Zhu Y, Huang Z, Huang A, He C (2006) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration. *Glia* 54(6):536–544
54. Yan H, Lu D, Rivkees SA (2003) Lysophosphatidic acid regulates the proliferation and migration of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia* 44(1):26–36
55. Windus LC, Chehrehasa F, Lineburg KE, Claxton C, Mackay-Sim A, Key B, St John JA (2011) Stimulation of olfactory ensheathing cell motility enhances olfactory axon growth. *Cell Mol Life Sci* 68(19):3233–3247
56. Huang ZH, Wang Y, Su ZD, Geng JG, Chen YZ, Yuan XB, He C (2011) Slit-2 repels the migration of olfactory ensheathing cells by triggering  $Ca^{2+}$ -dependent cofilin activation and RhoA inhibition. *J Cell Sci* 124(Pt 2):186–197
57. Wehrle R, Camand E, Chedotal A, Sotelo C, Dusart I (2005) Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. *Eur J Neurosci* 22(9):2134–2144
58. Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenber MJ, Holtmaat AJ, De Wit J, De Winter F, Verhaagen J (1999) Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci* 13(2):143–166
59. Low K, Culbertson M, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Tuszynski MH (2008) Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *J Neurosci* 28(5):1099–1108
60. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416(6881):636–640
61. Schwab ME (1990) Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends Neurosci* 13(11):452–456
62. Su Z, Cao L, Zhu Y, Liu X, Huang Z, Huang A, He C (2007) Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *J Cell Sci* 120(Pt 11):1877–1887
63. Buss A, Schwab ME (2003) Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the rat spinal cord. *Glia* 42(4):424–432
64. Buss A, Sellhaus B, Wolmsley A, Noth J, Schwab ME, Brook GA (2005) Expression pattern of NOGO-A protein in the human nervous system. *Acta Neuropathol* 110(2):113–119
65. Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359–369
66. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger

- B (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3(5):466–472
67. Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL (2001) Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* 153(4):881–888
  68. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B (2003) Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:677–695
  69. GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417(6888):547–551
  70. Seira O, Gavin R, Gil V, Llorens F, Rangel A, Soriano E, del Rio JA (2010) Neurites regrowth of cortical neurons by GSK3beta inhibition independently of Nogo receptor 1. *J Neurochem* 113(6):1644–1658
  71. Moreno-Flores MT, Lim F, Martin-Bermejo MJ, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F (2003) Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. *J Neurochem* 85(4):861–871
  72. Ren XD, Kiessens WB, Schwartz MA (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18(3):578–585
  73. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409(6818):341–346
  74. Nguyen-Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chedotal A (2001) Sensory axon response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclic GMP. *Mol Cell Neurosci* 17(6):1048–1058
  75. Prestoz L, Chatzopoulou E, Lemkine G, Spassky N, Lebras B, Kagawa T, Ikenaka K, Zalc B, Thomas JL (2004) Control of axonophilic migration of oligodendrocyte precursor cells by Eph-ephrin interaction. *Neuron Glia Biol* 1(1):73–83
  76. Bribian A, Esteban PF, Clemente D, Soussi-Yanicostas N, Thomas JL, Zalc B, de Castro F (2008) A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors. *Dev Neurobiol* 68(13):1503–1516
  77. Dembo M, Wang YL (1999) Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* 76(4):2307–2316
  78. Butler JP, Tolic-Norreylykke IM, Fabry B, Fredberg JJ (2002) Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(3):C595–C605
  79. Trepatt X, Wasserman MR, Angelini TE, Millet E, Weitz DA, Butler JP, Fredberg JJ (2009) Physical forces during collective cell migration. *Nat Phys* 5(6):426–430
  80. Pastrana E, Moreno-Flores MT, Gurzov EN, Avila J, Wandosell F, Diaz-Nido J (2006) Genes associated with adult axon regeneration promoted by olfactory ensheathing cells: a new role for matrix metalloproteinase 2. *J Neurosci* 26(20):5347–5359
  81. Llorens F, Gil V, del Rio JA (2011) Emerging functions of myelin-associated proteins during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *FASEB J* 25(2):463–475
  82. Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, Hata K, Mimura F (2005) Multiple signals regulate axon regeneration through the Nogo receptor complex. *Mol Neurobiol* 32(2):105–111
  83. Zhang S, Zhang Q, Zhang JH, Qin X (2008) NgR acts as an inhibitor to axonal regeneration in adults. *Front Biosci* 13:2030–2040
  84. Bursac P, Lenormand G, Fabry B, Oliver M, Weitz DA, Viasnoff V, Butler JP, Fredberg JJ (2005) Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell. *Nat Mater* 4(7):557–561
  85. Califano JP, Reinhart-King CA (2010) Exogenous and endogenous force regulation of endothelial cell behavior. *J Biomech* 43(1):79–86
  86. Sorensen A, Moffat K, Thomson C, Barnett SC (2008) Astrocytes, but not olfactory ensheathing cells or Schwann cells, promote myelination of CNS axons in vitro. *Glia* 56(7):750–763
  87. Chuah MI, Hale DM, West AK (2011) Interaction of olfactory ensheathing cells with other cell types in vitro and after transplantation: Glial scars and inflammation. *Exp Neurol* 229(1):46–53
  88. Vukovic J, Ruitenber MJ, Roet K, Franssen E, Arulpragasam A, Sasaki T, Verhaagen J, Harvey AR, Busfield SJ, Plant GW (2009) The glycoprotein fibulin-3 regulates morphology and motility of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia* 57(4):424–443
  89. Mollers S, Heschel I, Damink LH, Schugner F, Deumens R, Muller B, Bozkurt A, Nava JG, Noth J, Brook GA (2009) Cytocompatibility of a novel, longitudinally microstructured collagen scaffold intended for nerve tissue repair. *Tissue Eng Part A* 15(3):461–472
  90. Wang B, Zhao Y, Lin H, Chen B, Zhang J, Wang X, Zhao W, Dai J (2006) Phenotypical analysis of adult rat olfactory ensheathing cells on 3-D collagen scaffolds. *Neurosci Lett* 401(1–2):65–70
  91. Shen Y, Qian Y, Zhang H, Zuo B, Lu Z, Fan Z, Zhang P, Zhang F, Zhou C (2010) Guidance of olfactory ensheathing cell growth and migration on electrospun silk fibroin scaffolds. *Cell Transplant* 19(2):147–157
  92. Martin-Lopez E, Nieto-Diaz M, Nieto-Sampedro M (2010) Differential adhesiveness and neurite-promoting activity for neural cells of chitosan, gelatin, and poly-L-lysine films. *J Biomater Appl*. PMID 20876636
  93. Martin-Lopez E, Alonso FR, Nieto-Diaz M, Nieto-Sampedro M (2010) Chitosan, gelatin and poly(L-lysine) polyelectrolyte-based scaffolds and films for neural tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. PMID 21192838
  94. Morikawa Y, Hisaoka T, Kitamura T, Senba E (2008) TROY, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1126:A1–A10
  95. Woodhall E, West AK, Vickers JC, Chuah MI (2003) Olfactory ensheathing cell phenotype following implantation in the lesioned spinal cord. *Cell Mol Life Sci* 60(10):2241–2253
  96. Lankford KL, Sasaki M, Radtke C, Kocsis JD (2008) Olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory, phagocytic, and myelinating properties in the X-irradiated spinal cord not shared by Schwann cells. *Glia* 56(15):1664–1678
  97. Su Z, Yuan Y, Chen J, Cao L, Zhu Y, Gao L, Qiu Y, He C (2009) Reactive astrocytes in glial scar attract olfactory ensheathing cells migration by secreted TNF-alpha in spinal cord lesion of rat. *PLoS One* 4(12):e8141
  98. Lakatos A, Franklin RJ, Barnett SC (2000) Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* 32(3):214–225
  99. Deng C, Gorrie C, Hayward I, Elston B, Venn M, Mackay-Sim A, Waite P (2006) Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord. *J Neurosci Res* 83(7):1201–1212
  100. GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403(6768):439–444
  101. Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brosamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME (2003) Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* 23(13):5393–5406

102. Wang JH, Lin JS (2007) Cell traction force and measurement methods. *Biomech Model Mechanobiol* 6(6):361–371
103. Fournier MF, Sauser R, Ambrosi D, Meister JJ, Verkhovsky AB (2010) Force transmission in migrating cells. *J Cell Biol* 188(2):287–297
104. Mierke CT, Rosel D, Fabry B, Brabek J (2008) Contractile forces in tumor cell migration. *Eur J Cell Biol* 87(8–9):669–676
105. Wang HB, Dembo M, Hanks SK, Wang Y (2001) Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20):11295–11300
106. Li S, Guan JL, Chien S (2005) Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu Rev Biomed Eng* 7:105–150
107. Schwab ME (2010) Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 11(12):799–811
108. Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE (2006) Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *J Neurosci* 26(3):1006–1015
109. Mimura F, Yamagishi S, Arimura N, Fujitani M, Kubo T, Kaibuchi K, Yamashita T (2006) Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281(23):15970–15979



### Suppl. Figure S1

**Supplementary Figure S1:** Myelin treatment activates RhoA and induces ERK1-2 phosphorylation in TEG3 cells. Time course of RhoA activation (a) and ERK1-2 phosphorylation (b) in TEG3 cells after myelin treatment. See the sections Materials and methods and Results for details.

# Capítulo II

## **Increased migratory potential of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord.**

Authors: Diego Reginensi, Patricia Carulla, Sara Nocentini, Oscar Seira, Xavier Serra-Picamal, Abel Torres-Espín, Rosalina Gavín, María Teresa Moreno-Flores, Francisco Wandosell, Josep Samitier, Xavier Trepatal, Xavier Navarro, José Antonio del Río.

Accepted in: Cellular and Molecular Life Sciences, 2015.

### **RESUMEN:**

Las células de la glía envolvente olfatoria surgen hace algunos años como una estrategia prometedora para reparar la médula espinal lesionada. Sin embargo, diversas moléculas inhibitorias están presentes durante largo tiempo en la médula espinal lesionada que son capaces de inhibir tanto la migración de las OECs como la regeneración axonal. Dos de estas familias de moléculas, los condroitín sulfato proteoglicanos y las moléculas inhibitorias de la mielina son capaces de desencadenar respuestas inhibitorias redundantes en los axones. Evidencia cada vez mayor sugiere que la migración de las OECs es inhibida por la mielina. Aquí nosotros analizamos las propiedades inhibitorias del CSPG en la migración de las OECs.

Además, con tal de evitar el efecto inhibitorio de las MAIs se ha generado una línea estable de OECs capaces de sobreexpresar el ectodominio de Nogo Receptor (NgR). Los resultados indican que las células manipuladas genéticamente son capaces de migrar distancias más largas que las células no modificadas sobre los sustratos mielina y OMgp. Además, las células que expresan el ectodominio NgR también migran distancias más largas en la médula espinal lesionada.



---

# Increased migratory potential of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord.

Diego Reginensi<sup>1</sup>, Patricia Carulla<sup>1</sup>, Sara Nocentini<sup>1</sup>, Oscar Seira<sup>1,2</sup>, Xavier Serra - Picamal<sup>3</sup>, Abel Torres-Espín<sup>4</sup>, Rosalina Gavín<sup>1</sup>, María Teresa Moreno - Flores<sup>5</sup>, Francisco Wandosell<sup>5</sup>, Josep Samitier<sup>6</sup>, Xavier Trepac<sup>7</sup>, Xavier Navarro<sup>4</sup>, José Antonio del Río<sup>1</sup>.

1)Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain. Department of Cell Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain. 2) International Collaboration On Repair Discoveries (ICORD). Blusson Spinal Cord Centre and Department of Zoology, Faculty of Science, University of British Columbia, Vancouver, Canada. 3) Integrative cell and tissue dynamics. Institute for Bioengineering of Catalonia, 08028 Barcelona, Spain. 4) Department of Cell Biology, Physiology and Immunology. Institute of Neurosciences, Edif. M, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, E-08193, Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain. 5) Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Universidad Autónoma de Madrid (CBM-UAM), Madrid, Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), CBM-UAM, Spain. 6) Nanobioengineering Laboratory. Institute for Bioengineering of Catalonia, 08028 Barcelona, Spain. Department of Electronics, University of Barcelona. Centro de Investigación Médica en Red, Biomecánica, Biomateriales y Nanotecnología (CIBERBBN), Barcelona, Spain. 7) Integrative cell and tissue dynamics. Institute for Bioengineering of Catalonia, 08028 Barcelona, Spain University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain. Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain.

## ABSTRACT

Olfactory ensheathing cell transplantation emerged some years ago as a promising therapeutic strategy to repair injured spinal cord. However, inhibitory molecules are present for long times in lesioned spinal cord inhibiting both OEC migration and axonal regrowth. Two of these families of molecules, chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG) and myelin-derived molecules (MAIs), are able to trigger redundant inhibitory responses in lesioned axons. Mounting evidence suggests that OEC migration is inhibited by Myelin. Here we analysed the inhibitory properties of CSPG in OEC migration. In addition, to avoid MAI associated inhibition we generated a stable OEC cell line overexpressing the Nogo Receptor (NgR) ectodomain. Results indicate that engineered cells migrate longer distances than unmodified OECs over Myelin or oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp)-coated substrates. In addition, cells expressing the NgR ectodomain also migrate longer distances in lesioned spinal cord.

*Olfactory Ensheathing Cells, Nogo Receptor ectodomain, Traction force microscopy, Spinal cord lesion, Myelin associated inhibitors.*

## INTRODUCTION

Spontaneous regeneration of damaged axons in the lesioned spinal cord is poor, often resulting in a permanent loss of motor and sensory function (1, 2). The inhibitory environment for axonal regrowth

generated by the meningo-glial scar is the main obstacle in the absence of regeneration after lesion (3, 4). Current strategies to enhance functional regeneration after spinal cord injury (SCI) include gene therapy, biochemical and/or pharmacological treatment, and cell transplantation (5-7). In this scenario, olfactory ensheathing cells (OECs) have attracted particular attention as a therapeutic cell transplantation strategy (8, 9).

During mammalian lifespan OECs are capable of ensheathing and guiding newly growing axons of olfactory sensory neurons from the olfactory mucosa to their target in the CNS (10, 11). Indeed, OECs have been successfully used in many transplantation experiments following SCI with encouraging outcomes (e.g., (12-14)). The precise mechanisms accounting for the observed recovery are not fully understood but may include promotion of axonal regeneration, remyelination, neuroprotection, and induction of neovascularization (see (8) for recent review).

The migratory potential of the OECs is crucial to their function (15). However, studies of the migration capacity and behaviour of OECs after transplantation in SCI models have led to contradictory results (16-19). Nevertheless, it has been demonstrated that in injured spinal cord, rat and human OECs migrate for shorter



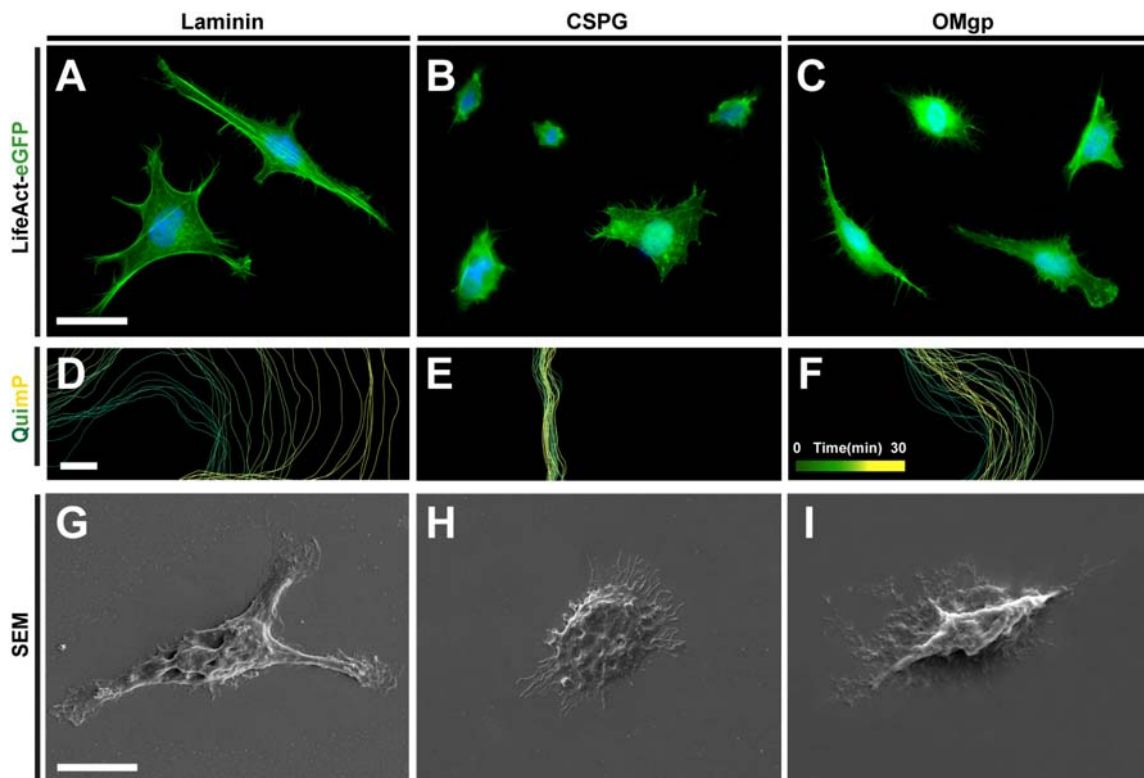
distances, in both rostral and caudal directions, compared to non-injured spinal cords (20). At the molecular level, GDNF (21), Slit-2 (22, 23), Nogo-A (24, 25) and fibulin-3 (26) have been demonstrated to regulate OECs migration. In fact, we and others have demonstrated that the OEC migratory potential is largely impaired by myelin (24, 25) and that this inhibition could be partially overcome by treatment with NEP1-40 peptide (24) or antibodies against the myelin receptor Nogo Receptor (25). However, following SCI, myelin-associated inhibitors (MAIs) as well as chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs) or secreted Semaphorins are overexpressed at the site of lesion and exposed to lesioned axons for protracted times (27-29). However, although OECs transplantation has been combined with enzymatic degradation of CSPGs (30-32), whether CSPG or secreted Semaphorins can also inhibit both axon regrowth and OECs migration is unknown.

In a previous study we determined the effects of myelin extracts on OEC migration, using video-time lapse, traction force microscopy, and biochemical methods (24). Thus, in the present study we analysed the behaviour

of OECs cultured on Chondroitin Sulphate Proteoglycans (CSPGs)- or Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein (OMgp)-coated substrates.

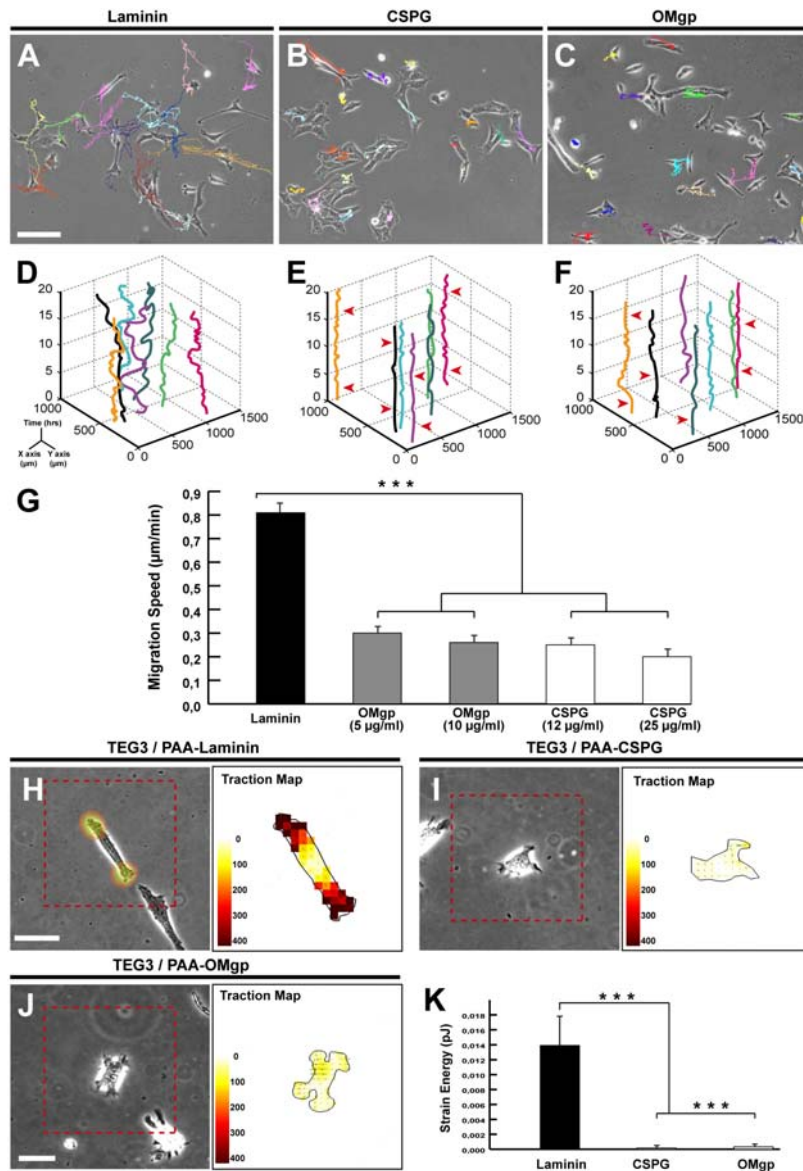
In addition, we genetically modified a stable cell line of OECs (TEG3 cell line (33)) to produce and secrete the extracellular domain of the Nogo receptor protein (NgR(Ecto)) to enhance migration in inhibitory extracellular matrices. In fact, the NgR(Ecto) is a truncated form of the receptor that binds to MAIs preventing their binding to the NgR-complex, by interacting with full-length NgR1 and blocking the intracellular signalling of MAIs (34, 35). Moreover, following SCI, intrathecal and intraperitoneal injections of NgR(Ecto) improved axon regeneration of transected axonal tracts and functional recovery (36, 37).

Our results demonstrate that NgR(Ecto)-expressing OECs migrated longer distances in vitro in comparison to non-modified OECs. In addition, we show that after implantation in a lesioned spinal cord of adult rats, NgR(Ecto)-OECs also



**Figure 1. Morphological changes triggered by CSPG and OMgp in cultured TEG3 cells.**

A-I) LifeAct-eGFP (A-C), QuimP analysis (D-F), and SEM (G-I) microscopy photographs of TEG3 cells growing on Laminin- (A,D,G), CSPG- (B-H), and OMgp- (C,E,I) coated substrates. Notice the large decrease in F-Actin containing lamellipodia and membrane dynamics in presence of CSPG and OMgp. In the QuimP analysis (D-F) the limit of the plasma membrane is delineated by different color lines (from time = 0 (green) to 60 min (yellow)). Notice that yellow lines are in between green lines, in CSPG (H) and OMgp (I), in contrast to Laminin (B), which suggests that cells are unable to generate protrusive forces. Scale bars: A and G = 20  $\mu$ m; pertains to B-C and H-I respectively. D = 5  $\mu$ m pertains to E-F.



migrate longer distances than non-modified cells.

## RESULTS.

### Reduced migration and traction forces in cultured TEG cells mediated by CSPGs and OMgp.

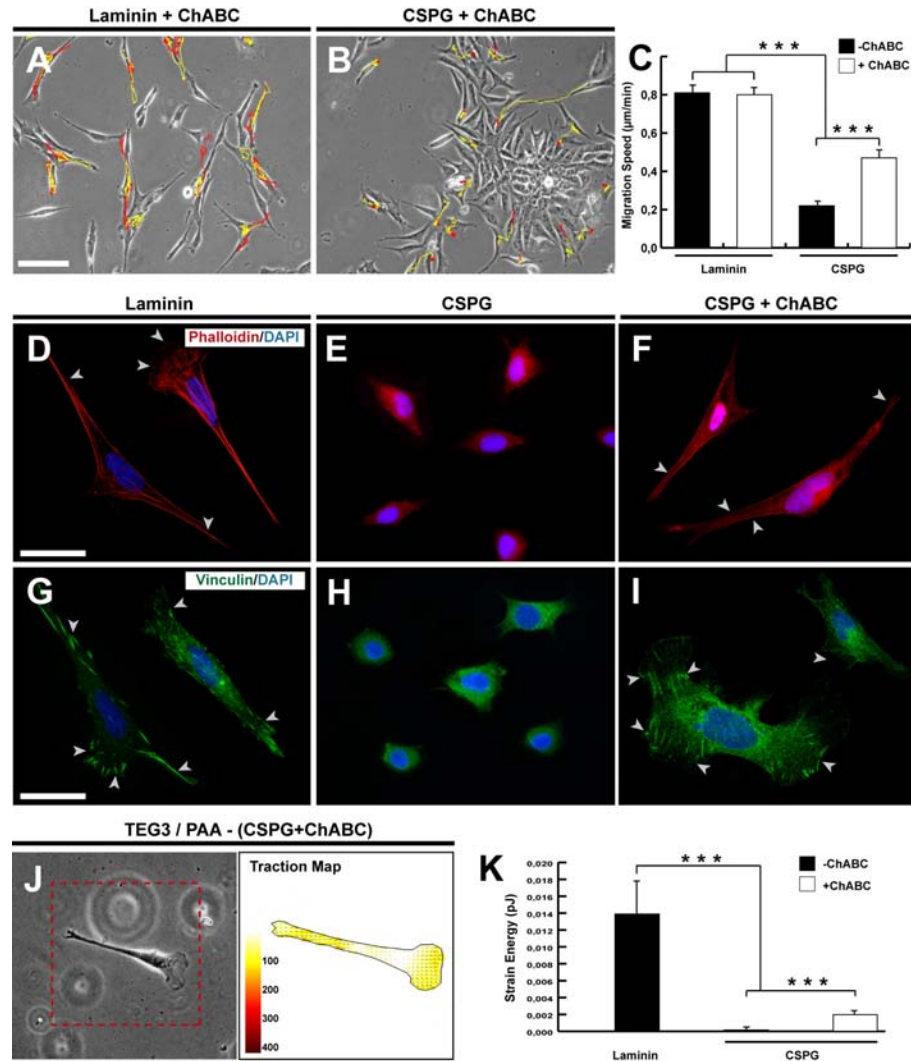
TEG3 is a clone OEC line that shows similar growth promoting potential to non-modified OECs (e.g., (33)). In addition, previously published data reported that TEG3 cell migration is inhibited by myelin (24) as happens with non-modified OECs

(25). Due that the lamellipodial activity of the OECs that seem to play crucial roles in OEC migration (45) and regeneration properties (46), we analysed the membrane dynamics in OECs over different substrates (Fig. 1).

TEG3 cells growing on Laminin-coated substrates showed a bipolar morphology with numerous dynamic filopodia and lamellipodia (Movie 1). The migration of these cells is similar to those observed in cultured fibroblasts (e.g., NIH/3T3 fibroblasts; ATCC CRL-1568) with random trajectories (see below). LifeAct-eGFP transfected TEG3 cells showed an intense remodelling of the Actin cytoskeleton during migration (Movie 2 and Fig. 1a). Thus, video-time lapse experiments directed to analyse the dynamics of the cell membrane showed in-

**Figure 3. Overcoming CSPG inhibition of TEG3 migration by ChABC.**

(A-B) Examples of the ChABC effects of individual TEG3 migration on Laminin- (A) and CSPGs- (B) coated glass substrates. The trajectory of selected TEG3 cells without ChABC treatment is labelled in red in (A) and (B). Yellow lines show the changes observed after incubation with ChABC in the selected cells. (C) Histogram showing the results of the time lapse analysis and the effect of the ChABC incubation. (D-I) Fluorescein photomicrographs illustrating examples of TEG3 cells growing on Laminin (D,G), CSPG (E,H) and CSPG + ChABC (F,I). Cells were immunoreacted to F-Actin (D-F) and Vinculin (G-I) antibodies and counterstained with DAPI. Arrows in (D) and (F) point to stress fibers and in (G) and (I) to Vinculin-positive focal contacts. (J) Quantitation of cellular traction forces of cultured TEG3 cells in PAA-CSPG + ChABC. A phase contrast image of TEG3 cultured cells is shown. The scale and the force map are also shown. Arrows indicate the direction of the bead displacement and the colour scale indicates the magnitude of the cellular traction forces measured in Pa as in Figure 2. (K) Histogram illustrating the quantitative results of the TFM analysis. Data in (C) are represented by mean  $\pm$  S.E.M. Scale bars: A = 200  $\mu$ m pertains to B, D and G = 200  $\mu$ m pertains to E,F and G,I respectively. Asterisks in (C) and (K) indicate statistical differences (\*\* $p < 0.01$ , ANOVA test).



creased dynamics of TEG3 growing over Laminin (Fig. 1a,d) compared with TEG3 cells growing on CSPG (Fig. 1b,e) or OMgp-coated (Fig. 1c,f) substrates. This also correlates with decreased cell protrusions observed in GFP immunoreacted cells (Fig. 1a-c) and in scanning electron microscopy (SEM) observations (Fig. 1g-i).

Next, TEG3 migration over Laminin, CSPG-, and OMgp-coated substrates was monitored for 20 h in video time-lapse experiments (20X objective; one frame every 8 min)(Fig. 2 and Movies 3-5). A 3 axis plot (x/y position vs time (hours)) revealed higher motile persistence on Laminin-coated (Fig. 2d) than on CSPG- (Fig. 2e) or OMgp-coated (Fig. 2f) substrates. Quantitatively, the migration speed of TEG3s cells over Laminin was  $0.81 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ . In contrast, TEG3 cells growing

over CSPG- or OMgp-coated substrates showed a dramatic decrease in the migrated speed ranging from 69% to 78% ( $0.27 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$  (OMgp, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to  $0.21 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$  (CSPG; 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Mounting evidence demonstrated that cells generate traction forces against their substrate during adhesion and migration, and traction forces are used by cells to sense the extracellular matrix in healthy and unhealthy conditions (e.g., (47, 48)). Thus, using traction force microscopy (TFM), we aimed to determine the distribution of traction forces in TEG cells cultured on a well-characterized polyacrylamide (PAA) gel, which is linearly elastic, optically clear, and suitable for protein conjugation ((49) see for details). Using TFM



we observed that cells seeded on Laminin-coated substrates transferred higher strain energy ( $0.0 \pm 0.002$ , PJ;  $n = 18$ ) (Fig. 2h) to their underlying substrate than those seeded on CSPG- ( $0.0001 \pm 0.0001$ , PJ;  $n = 32$ ) (Fig. 2i) or OMgp-coated substrate ( $0.0007 \pm 0.0001$ , PJ;  $n = 28$ ) (Fig. 2j).

### Effects of ChABC treatment on TEG3 cell migration and traction forces over CSPG containing substrates

The bacterial enzyme ChABC liberates chondroitin sulfate GAGs from CSPG core proteins to render a more permissive substrate for axonal outgrowth (50). ChABC acts on chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and dermatan sulfated proteoglycans, and acts very slowly on hyaluronate. This enzyme has been used to promote axon regeneration in lesioned spinal cord in single and combined treatments (e.g., (32, 51-53)). In fact, ChABC has been used in combination with OECs (30, 54) and the expression of ChABC has also been directed to glial cells (Schwann cells (55) and Astrocytes (56) with relevant results.

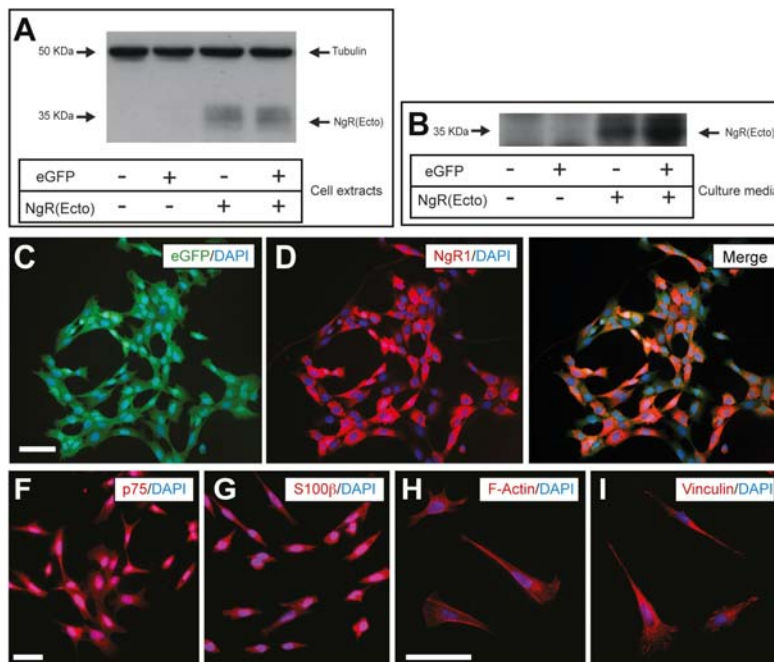
In our study TEG migration and traction forces were decreased by CSPGs (see above). Thus we aimed to determine whether ChABC treatment affected intrinsic OECs migratory properties and whether it was able to rescue their migration when cultured over CSPGs (Fig. 3). Control experiments demonstrated

that ChABC treatment did not modify the migration or the traction forces of cultured TEGs over Laminin (Fig. 3a,c and Movie 6), myelin, or OMgp (not shown). TEG3 migration over CSPG-coated substrates was  $0.21 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$  (CSPG;  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). A  $\approx 50\%$  increase in the migratory speed was observed after treatment with ChABC ( $0.48 \pm 0.07 \mu\text{m}/\text{min}$ ) (Fig. 3b,c and Movie 7).

F-actin and Vinculin staining on TEG3 cells growing on CSPG-coated substrates demonstrated increased lamellipodia and the presence of Vinculin-positive aggregates after ChABC treatment (Fig. 3d-i). In parallel, these increased Vinculin aggregates correlated with increased traction forces as determined with TFM ( $0.0026 \pm 0.0005$ , PJ;  $n = 34$ ) (Fig. 3j-k).

### Generation and characterization of NgR (Ecto)-TEG3 cells.

TEG3 cell lines producing and secreting the extracellular domain (1-310 aa) of the NgR1 receptor were generated by lentiviral infection and selected with Blasticidin (see Methods for details). In addition, selected clones were infected to eGFP-expressing lentivirus (Fig. 4). Clones ( $> 95\%$  eGFP-NgR(Ecto)-TEG3) were selected by the expression levels of the ectodomain. With Western blotting we detected the ectodomain in both cell extracts and in cultures (Fig. 4a and Suppl. Fig. 2). eGFP co-expression in NgR(Ecto) producing cells did not modify the expression of ectodomain (Fig. 4a-c). In



**Figure 4. Generation of the TEG3 cell lines overexpressing NgR(Ecto).**

(A) Western blot illustrating the expression of the NgR(Ecto) in TEG3 cells after lentiviral delivery of eGFP (+or-) and NgR(Ecto) (+or-). Arrows point to the proteins of the interest. Tubulin was immunoblotted as control protein. (B) Western blotting illustrating the presence of NgR(Ecto) in the culture media of TEG3 cells after the lentiviral delivery of eGFP and NgR(Ecto) as above. (C-E) Example of the expression of eGFP (E) and NgR1 (I) in double infected cells. F-I) Fluorescence photomicrographs of eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells immunoreacted to p75 (F), S100- $\beta$  (G), F-Actin (H), and Vinculin (I) detection. Scale bars: C and F = 200  $\mu\text{m}$  pertains to D,E and G respectively. H = 50  $\mu\text{m}$  pertains to I.

addition, eGFP-positive NgR(Ecto)-TEG3 cells maintained p75 or S100 $\beta$  expression (Fig. 4d,e) and displayed the range of morphologies (astrocyte- or Schwann cell-like) described for cultured primary OEC and TEG3 cells (Fig. 4f-i)(e.g., see also (24) for details).

### TEG3-generated NgR(Ecto) blocks Nogo66-AP binding to Nogo Receptor

As indicated above, OECs and TEG3s express all members of the Nogo receptor complex (e.g., (24, 25, 57). Thus in order to determine whether the NgR(Ecto) produced by TEG3 cells was active, we incubated TEG3 cells ( $\approx$  75% confluence) with Nogo66-AP in the absence or presence of NgR(Ecto) containing solution (Fig. 5a-e). After incubation, AP activity in treated cells was measured at 405 nm spectrophotometer (Fig. 5d,e). Results revealed a decrease of  $\approx$ 18% and  $\approx$  55% in the OD values after incubation with 150 nM or 300 nM TEG-produced NgR(Ecto) (Fig. 5e).

In addition, we incubated with TEG3-generated NgR(Ecto) CGNs cultured on Poly-D-Lysine (Fig. 5f,g), as well as cell membranes of Mock- and NogoA-transfected HEK293 cells (Fig. 5f,g). Cultured CGNs were labelled using the TUJ-1 antibody. Neurite length of CGNs cultured over NogoA membranes was reduced to  $\approx$  40% compared to Mock-transfected and Poly-D-Lysine values (Fig. 5g). This value

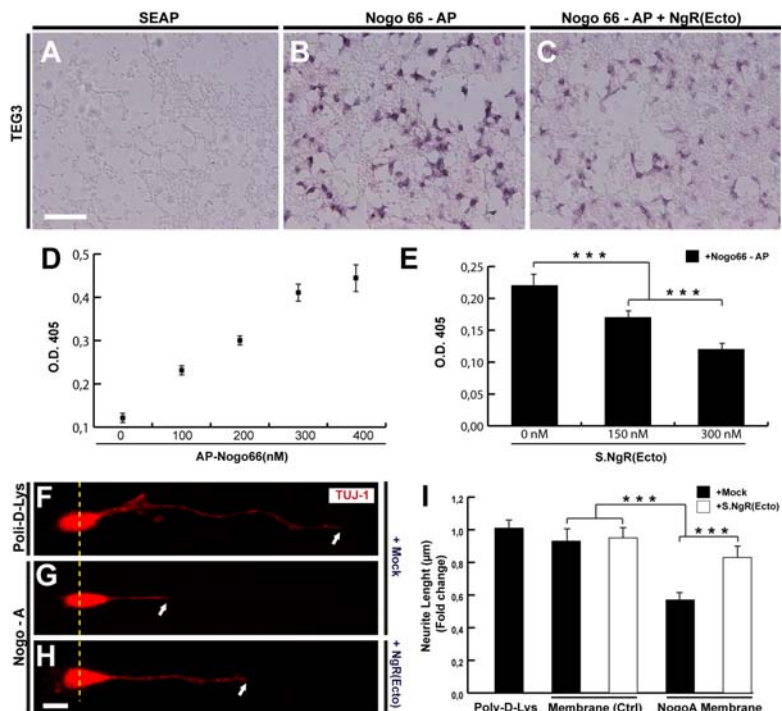
reached a  $\approx$  30% increase when cultured with [150 mM] NgR(Ecto) (Fig. 5g). The addition of NgR(Ecto) did not modify CGN neurite length when cultured over control HEK293 membranes.

### NgR(Ecto)-TEG3 cells overcome OMgp inhibition to cortical axons in microfluidic platforms

Compartmentalized neuronal cultures of lab-on-a-chip devices have been used for different studies in recent years (see (58) for a recent review). Due to this specific design, media located in the axonal reservoir are unable to diffuse to the soma reservoir (59). Thus, we aimed to determine whether NgR(Ecto)-TEG3 cells are able to stimulate axon outgrowth over inhibitory MAIs-containing substrates (Fig. 6). Indeed, E15.5 cortical neurons cultured in one reservoir of the microfluidic platforms are able to cross the 900  $\mu$ m long bridge channels in one week to reach the recipient or axonal reservoir (Fig. 6a). In these conditions, cortical axons were able to spread in Laminin-coated axonal reservoirs (Fig. 6a) expressing NgR receptor 3. Their axonal length was reduced by  $\approx$  25% when OMgp was present as substrate in the axonal reservoir (Fig. 6b). Next we co-cultured eGFP-TEG3 or eGFP-Ngr(Ecto)-TEG3 cells in the axonal reservoir of parallel chips with E15.5 cortical neurons

**Figure 5. The NgR(Ecto) generated by engineered TEG3 cells is functional.**

(A-E) Binding experiments of NgR(Ecto) in TEG3 cells. TEG3 cells were incubated with Mock media (obtained from cells transfected with empty vector; SEAP) (A), 300 nM Nogo66-AP (B) and 300 nM Nogo66AP + 300 nM NgR(Ecto) (C). Notice the decrease in the AP labeling in (C) compared to (B). Increasing levels of O.D. at different Nogo66-AP can be seen in (D). Histogram illustrating the quantitative results of the experiment is illustrated in (C). F-I) NgR(Ecto) induce large neurite extension of cultured CGN over Poly-L-Lys (F) or NogoA (G-H) containing membranes, in presence (I) or absence (H) of 150 mM NgR(Ecto). Arrows in (F-H) point to the end of the measured CGNs neurites. Data in (E) and (I) are represented by mean  $\pm$  S.E.M. Scale bars: A = 1000  $\mu$ m pertains to B and C.



and coated with OMgp as above (Fig. 6c,d,e-g). Results indicated that eGFP-TEG3 was unable to statistically increase neurite length of cultured cortical neurons in the devices (Fig. 6c,g). In contrast, eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells were able to increase by  $\approx 24\%$  the axonal length of the cultured cortical neurons on OMgp (Fig. 6d,e-g)(up to 95% of the value obtained in the presence of Laminin, Fig. 5g).

However, we were unable to observe a clear interaction between cortical axons and eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells in our microfluidic devices, suggesting that these positive effects are mediated by the secreted NgR(Ecto) in the axonal compartment (Fig. 6e,f).

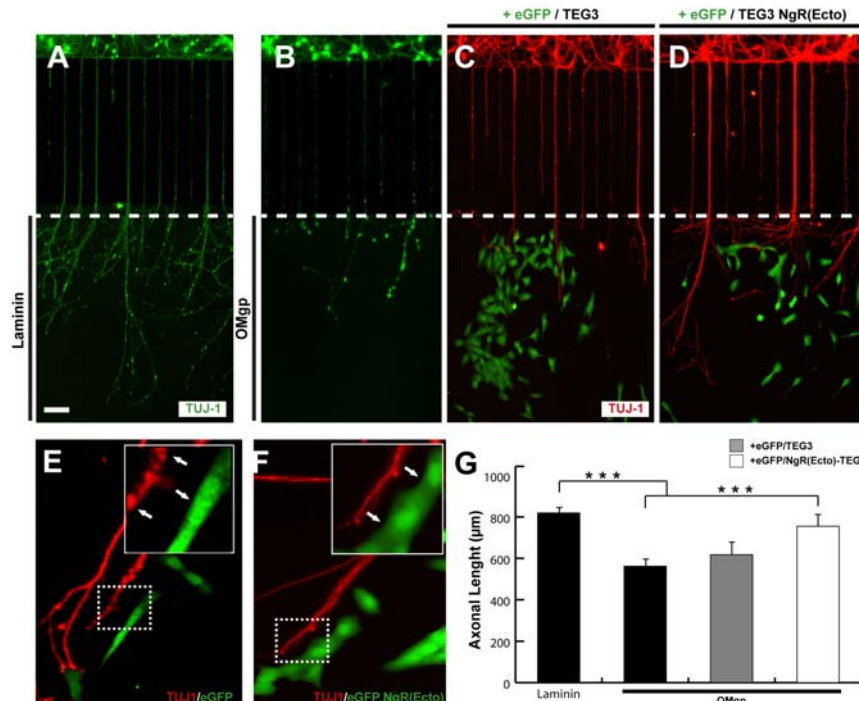
### Increased migration of NgR(Ecto)-TEG3 and NgR(Ecto)-treated TEG3 cells on MAI-coated substrates.

Next we aimed to explore the migratory properties of NgR(Ecto)-TEG3 cells compared to TEG3 cells over inhibitory substrates and the specific effect of NgR(Ecto) on TEG3 cell migration over OMgp (Fig. 7). Indeed, TEG3 migration over Laminin, Myelin- and OMgp-coated substrates was monitored for 20 h in video

time-lapse experiments as above. Quantitatively, in these experiments the migration speed of TEG3s cells over Laminin was  $0.79 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 38$ ) (Fig. 7c) and  $0.82 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 36$ ) (Fig. 7f).

In contrast, TEG3 cells growing over Myelin- or OMgp-coated substrates showed a decrease in the migrating speed ( $0.3 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$  (Myelin;  $n = 35$ ) and ( $0.24 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$  (OMgp,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $n = 35$ ) as expected. NgR(Ecto)-TEG3 cells migrated as TEG3 cells over Laminin ( $0.79 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ ;  $n = 38$ ) (Fig. 7c) but with increased speed over Myelin ( $0.62 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ;  $n = 37$ ) (Fig. 7c and Movie 8) and OMgp ( $0.47 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ ;  $n = 36$ )(Fig. 7f and Movie 9). I

In addition, when NgR(Ecto) was added to migrating TEG cells growing on OMgp-coated substrates, a 1.81 fold increase of the migratory speed was observed ( $0.49 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ;  $n = 48$  (TEG3 + NgR(Ecto)) and  $0.27 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{min}$ ;  $n = 37$ )(TEG without NgR(Ecto)) (Fig. 7g-i and Movies 10,11). In addition, both TEG3 cells treated with NgR(Ecto) (Fig. 7k,n) and NgR(Ecto)-TEG3 cells (Fig. 7l,o) growing over OMgp displayed relevant filopodia (Fig. 7k,l) with abundant puncta-like staining of Vinculin, suggesting increased focal contacts (Fig. 7n,o) compared to parallel TEG cell cultures (Fig. 7j,m).



**Figure 6. Increased axonal growth of cortical neurons induced by eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells in microfluidic devices.**

(A,B) Photomicrographs illustrating examples of E15.5 cortical neurons cultured on XonaTM microfluidic devices coated with Poly-D-Lys (A) or OMgp (B) for 12 days (see Material and methods for details). (C,D) Examples of the combined co-culture of E15.5 cortical neurons and eGFP-TEG3 cells (C) or eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells (D). After fixation, microfluidic devices were processed for TUJ-1 and eGFP immunostaining. (E,F) High power photomicrographs of double-labelled microfluidic devices containing cortical axons (red) and eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 (green). Note that eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells do not seem to be in contact with growing axons (arrows). (G). Histogram illustrating the quantitative results of the experiment illustrated in (A-D). The ends of the bridge channels are labelled by a white dashed line in (A-D). Data in (G) are represented by mean  $\pm$  S.E.M. Scale bars: A = 100  $\mu\text{m}$  pertains to B-D. Asterisks in (G) indicate statistical differences (\*\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ; ANOVA test).

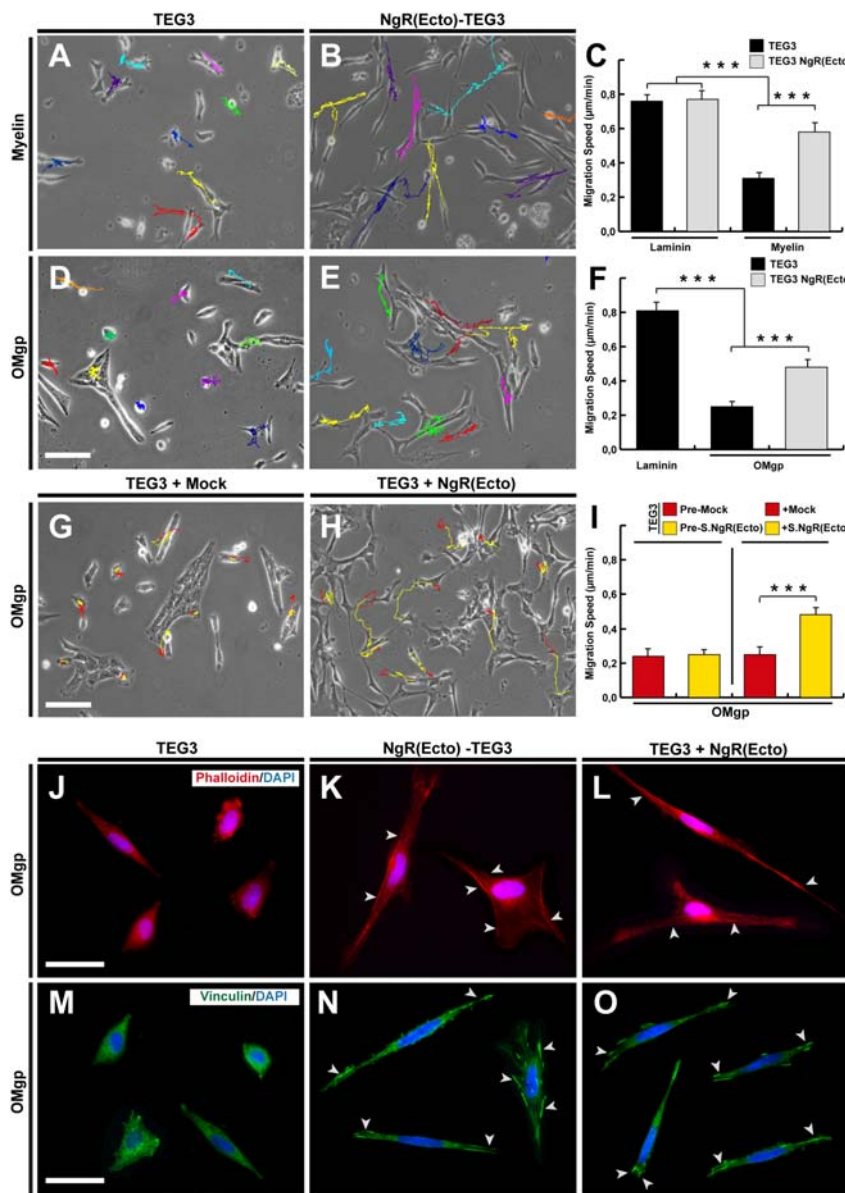
double-labelled microfluidic devices containing cortical axons (red) and eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 (green). Note that eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells do not seem to be in contact with growing axons (arrows). (G). Histogram illustrating the quantitative results of the experiment illustrated in (A-D). The ends of the bridge channels are labelled by a white dashed line in (A-D). Data in (G) are represented by mean  $\pm$  S.E.M. Scale bars: A = 100  $\mu\text{m}$  pertains to B-D. Asterisks in (G) indicate statistical differences (\*\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ; ANOVA test).



## Increased migration of NgR(Ecto)-TEG3 cells in lesioned spinal cord

To further determine whether NgR(Ecto)-TEG3 cells also increased their migratory potential in vivo, 300,000 cells of eGFP- or NgR(Ecto)-TEG3 were implanted in injured spinal cords to analyse the capacity of this cell to integrate and migrate in the lesion model (Fig. 8). A total of 6 rats were used (3 rats received eGFP-TEG3 cells, another 3 eGFP/NgR(Ecto)-TEG3). A week after transplantation spinal cords were perfusion fixed and the localization and distribution of eGFP-positive cells was analysed (see Method for details). Eight representative slices were selected

for analysis for each animal. The total number of eGFP positive cells in the case of eGFP-TEG3s ( $6000 \pm 250$  cells/slice) was slightly less than of eGFP-NgR(Ecto)-TEG3s ( $7000 \pm 200$  cells/slice). To assess the distance migrated we counted the number of eGFP-positive cells in transversal stripes of about  $200\mu\text{m}$  in length starting from the injection point. Eleven lines or stripes caudal or rostral to the injection points were analysed (Fig. 8a,c,e). Results revealed that most eGFP-TEG3s were distributed near the injection point with the maximum cell percentage ( $\approx 25\%$ ) found in the section  $400\mu\text{m}$  rostral or caudal to these points (Fig. 8b,c,h). Moreover very few eGFP-TEG3 cells were observed more



Arrows in (K,L) and in (N,O) point to stress fibers and Vinculin-positive focal contacts, respectively. Scale bars: A and G =  $200\mu\text{m}$  pertains to B-E and H respectively. J and M =  $50\mu\text{m}$  pertains to (K,L) and (N,O) respectively. Data (in C,F and I) are represented by mean  $\pm$  s.e.m. Asterisks in (C, F and I) indicate statistical differences (\*\*\*)  $p < 0.01$ , ANOVA test).

than 2.200  $\mu\text{m}$  from the injection point (Fig. 8h). By contrast, eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells were found in all 11 sections analysed (Fig. 8d,e,h) with the greatest number of cells (16%) found in the section 800  $\mu\text{m}$  rostral or caudal to the injection points (Fig. 8h). In addition, increased numbers of eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells were also observed on the lesion side (Fig. 8f,g).

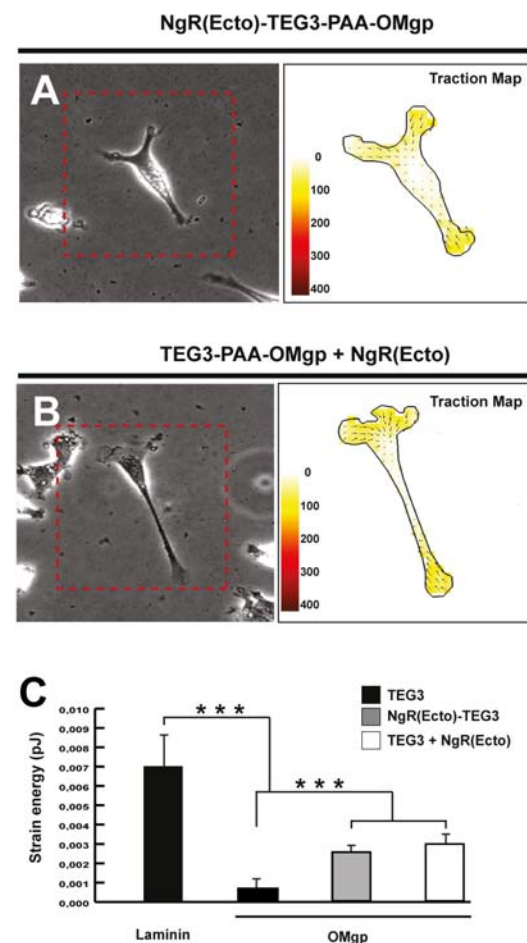
## DISCUSSION

OEC transplantation has been shown to promote regeneration and functional recovery in lesioned spinal cord (8, 9). In that the regenerative properties of OECs are largely associated with their migration and lamellipodial dynamics (e.g., (23, 60)) there is a considerable interest in upgrading OEC migratory capacity. Indeed, it has been reported that OECs with greater migration capacity show enhanced regenerative properties (16-19, 60). In fact, it is assumed that OECs migrate ahead of growing axons and by secreting supporting factors (e.g., GDNF) aid and promote their elongation (15). This could be mediated by the matrix metalloproteinase activity reported in OECs (61). In a previous study we demonstrated that OECs express the NgR receptor complex (NgR1, P75, Lingo1 and TROY) and that their migration is impaired by myelin (24). In addition, NogoA, Slit2, and fibulin-3 have been reported as inhibitors of OEC migration (see below). However, the effects of CSPG on OEC migration have not been previously studied. Here, we described how CSPGs largely impair OEC migration by reducing the mechanical strain forces that cells transmit to the coated substrate. This reduced force correlates well with the low number of Vinculいた-positive focal contacts and profound reorganization of F-Actin cortical cytoskeleton. In fact, a recent study described how CSPGs are also ligands for NgR1 and NgR3 MAI receptors (62). TEG3 and NgR(Ecto)-TEG3 cells express NgR1 ((24) and present results), which may explain some of the observed results that point to a functional redundancy between myelin inhibitors and CSPGs blocking OEC migration. However, because the binding region of CSPG to NgR1 is located in the Stalk region of the receptor, no relevant changes were observed between NgR(Ecto)-TEG3 and TEG3 cell migration over CSPG.

Present results also reinforce the notion that most of the factors inhibiting axon elongation and regrowth after lesion may also affect OEC migration. In fact, to date all the described molecules inhibiting OEC migration—NogoA, fibulin-3, and Slit2—have been reported to be overexpressed in CNS scars after lesion (29, 63, 64). Thus, in this scenario it is reasonable to consider that the combined treatment developed by

Fouad et al., with ChABC, Schwann cell bridges, and OEC transplantation may affect positively both OEC migration and axon regrowth (30).

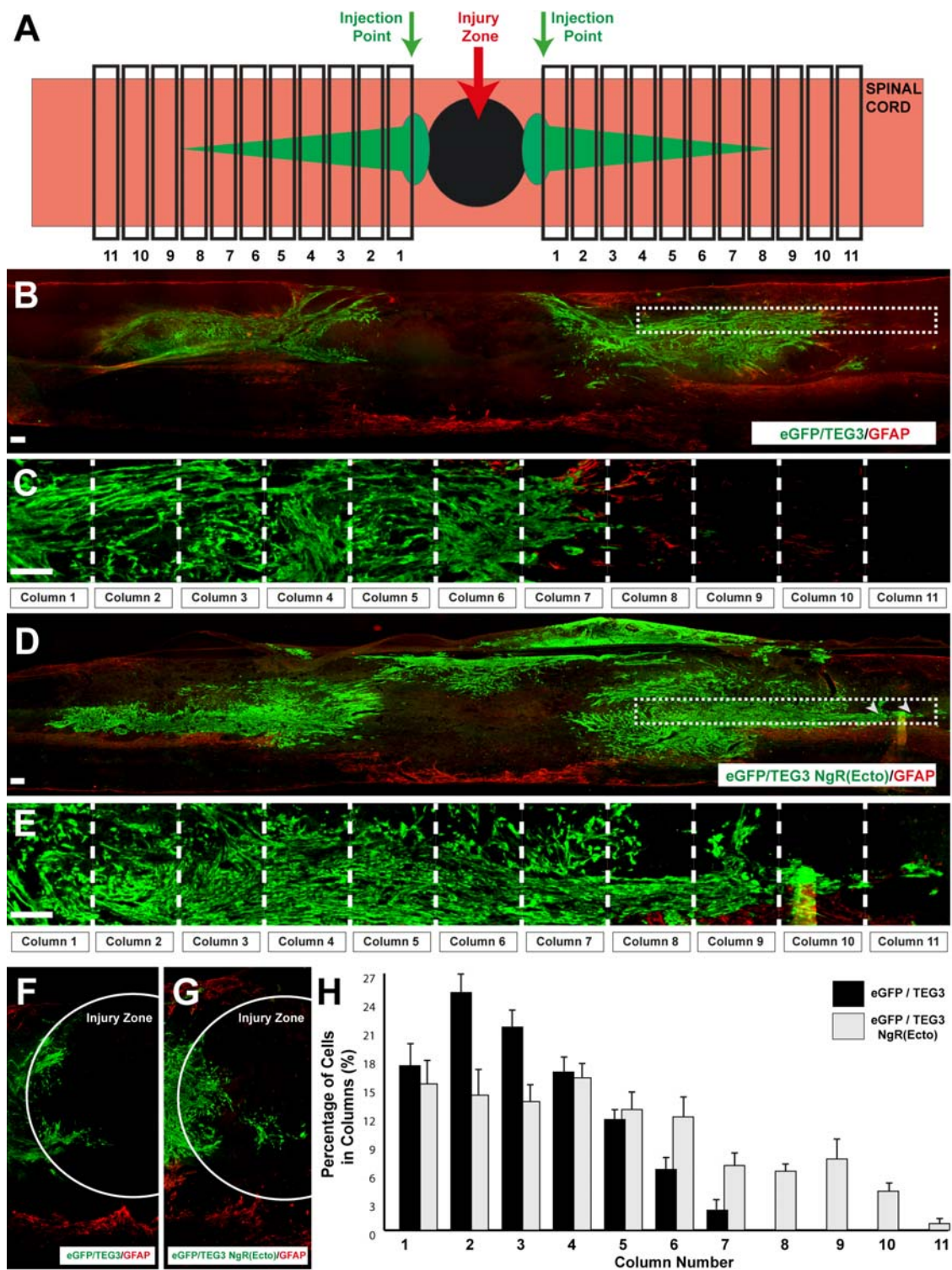
Furthermore, secreted semaphorins (e.g., Sema3A) are expressed by OECs (65) and seem not to affect migration of OECs (J.A.D.R. unpublished results). In this respect, the single genetic ablation of MAIs (66) alone or with Semaphorin receptors (67) is not strong enough to support axon regrowth after SCI. In contrast, it seemed



**Figure 8. Increased strain forces of NgR(Ecto)-TEG3 cells and TEG3 cells incubated with exogenous NgR(TEG3) in PAA gels coated with OMgp.**

(A,B) Quantitation of cellular traction forces of cultured NgR(Ecto)-TEG3 cells (A) and TEG3 cells + exogenous NgR(Ecto) (B) growing on PAA-OMgp gels. A phase contrast image of cultured cells is shown. The scale and the force map are also shown. Arrows indicate the direction of the bead displacement and the colour scale indicates the magnitude of the cellular traction forces measured in Pa as in Figure 2. (C) Histogram illustrating the quantitative results of the TFM analysis. Data in (C) are represented by mean  $\pm$  S.E.M. Asterisks in (C) indicate statistical differences (\*\*\*)  $p < 0.01$ , ANOVA test).





**Figure 9. Enhanced migration of eGFP-NgR(Ecto) into contused spinal cord.**

A) Scheme of the experimental procedure. B-E) Examples of longitudinal sections of the lesioned spinal cord transplanted with eGFP-TEG3 (B,C) or eGFP-NgR(Ecto).TEG3 (D,E) cells immunoreacted to GFAP and eGFP. The boxed areas in (B) and (D) are shown in (C) and (E) respectively. The 11 columns are indicated in each case. (F,G) Medium power photomicrographs illustrating eGFP-TEG3 (F) and eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 (G) cells at the contused lesion site. H) Histogram illustrating the quantitative results of the experiment illustrated in (B-E). Data in (G) are represented as mean  $\pm$  S.E.M. of the percentage of eGFP labeled cells in each column. Scale bars: B-E = 100  $\mu$ m.

that blocking MAI receptors NgR1 and NgR3 and CSPG receptors yields better results (62). In light of the foregoing, we consider that a transplantation strategy with cells with endogenous neurotrophic support and enhanced migratory properties in parallel with pharmacological treatments should be strongly considered as a potential combined therapy for SCI lesion. Indeed, in the present study we genetically modified TEG3 to express a soluble form of NgR1 receptor to overcome Myelin-derived inhibition (34).

Results demonstrate that NgR(Ecto)-TEG3 cells migrate faster *in vitro* over OMgp and Myelin-coated substrates as well *in vivo* after contusive lesions of the spinal cord. In addition, the recovery of migration capacity correlates with increased traction forces observed in TFM experiments in NgR(Ecto)-TEG3s cells. However, the two recoveries (migration and strain forces) are not complete, suggesting that other factors are involved in this inhibition. Indeed, OECs might respond to other myelin-associated molecules (e.g., lipids (68)) or express receptors other than NgR1 (e.g., LDL receptor related protein 1)(69), which could exert inhibitory action on axonal growth. However, whether these lipids could act on OECs is unknown and warrants further study.

However, another challenging question remains unsolved since NgR(Ecto)-TEG3 presents random migration as described for normal TEG3 and this suggests that other strategies may be needed to generate a persistent and directed migration in the lesioned spinal cord by using directed chemoattraction (24, 70) on specific functionalized biomaterials (71, 72).

## Materials and methods

**Antibodies and biochemical reagents.** The following antibodies were used at a dilution of 1:500 for immunohistochemistry and/or Western blotting: S100 $\beta$  and  $\beta$ 3-Tubulin (TUJ-1, 1:4000) were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and green fluorescence protein (GFP) antibodies were from DAKO (Glostrup, Denmark), and p75 was from Promega (Madison, WI, USA). NgR1 was a gift from B.L. Tang (Singapore). Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit immunoglobulins were purchased from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). The goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) and rabbit anti-goat-HRP secondary antibodies used in Western blots were from DAKO. Tubulin (1:5,000), Phalloidin-Alexa 488, and DAPI were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). CSPG and OMgp proteins were purchased from

R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Myelin extract was obtained as (38) and Nogo-A containing membranes as (39).

**Cloning of the NgR ectodomain (NgR(Ecto)) and lentiviral production.** The NgR(Ecto) construct (Suppl. Fig. 1) was prepared as follows: the cDNA of the region was cloned by PCR from adult mouse brain with the primers: NgR(Ecto) Forward 5'- AAA GGA TCC ATG AAG AGG GCC TCC TCC GGA-3', and NgR(Ecto) Reverse 5'-AAT GGA TCC TTA TCA AGC ACA ACC CTC TAA GTC ACT-3'. The NgR(Ecto) PCR fragment was extracted (QIAquick, QIAGEN, Hilden, Germany) and subcloned into the pLenti6/V5-DEST vector (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) into ApaI and BclI sites. This NgR(Ecto) vector was then sequenced to ensure correct nucleotide sequence. Subsequently lentiviral particles were produced by transient transfection of 293FT cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), using the NgR(Ecto) vector, the second generation packaging construct psPAX (Tronolab, Lausanne, Switzerland) and the envelope plasmid pMD2G (Tronolab). 293FT cells (Invitrogen) were cultured in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum and without antibiotics before transfection. Medium was changed and supplemented with antibiotics after 6 h. Medium supernatants containing viral particles were harvested 24 and 48 h later and concentrated by ultracentrifugation (2h at 26,000 x g at 4°C).

**TEG3 cultures and infection strategy.** The immortalized clonal cell line TEG3, which contains the SV40 large T antigen stable transfectant of OEG primary cultures, was used (33). Cells were maintained in ME10: DMEM-F12 (Invitrogen) supplemented with 10% bovine calf serum (SAFC Biosciences, Lanexa, VA, USA), 20  $\mu$ g/ml pituitary extract (Invitrogen), 2  $\mu$ M forskolin (Sigma), 1% penicillin-streptomycin, and 1% fungizone (Invitrogen). TEG3 cells were transfected using a lentivirus carrying the NgR(Ecto) construct and/or one lentivirus carrying the eGFP construct (Suppl. Fig. 1). Cells in passage 2 were plated at 2,000 cells/cm<sup>2</sup> and incubated with one of the lentiviruses for 48h. Then, the medium was changed and the cells cultured as described above with the addition of Blasticidin (3  $\mu$ g/ml, Sigma) to the medium in the case of the NgR(Ecto). For double transfection, cells were first incubated with the NgR(Ecto) lentivirus, and afterwards with the eGFP. Single clones were selected with cloning disks (Sigma) and expression of NgR(Ecto) was tested in these clones by Western blot. Selected clones were grown in ME10 media.

**Immunocytochemical methods on TEG3 cells.** Glass coverslips (12 mm diameter) were coated with proteins essentially as described (34). Briefly, coverslips were pre-coated with Poly-L-Lysine 10  $\mu$ g/ml dissolved in 0.1 M PBS (pH 7.3) and then washed. They were coated with Laminin (2  $\mu$ g/ml, dissolved in 0.1 M PBS) and washed again with 0.1 M PBS. NgR(Ecto)-TEG3 cells were seeded onto substrate-coated coverslips in ME10 medium. Cells were cultured for 20 h and then the coverslips were fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 30 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and blocked with 10% normal serum in both diluted in 0.1 M PBS. Cells were sequentially incubated overnight with primary antibodies at 4°C and with Alexa Fluor-tagged secondary antibodies for 1 h. After rinsing in 0.1 M PBS, cells were

stained with 0.1  $\mu$ M DAPI diluted in 0.1 M PBS for 10 min, rinsed in 0.1 M PBS, and mounted on Fluoromount™ (Vector Labs, Burlingame, CA, USA); they were then analysed in a fluorescence microscope equipped with a cooled camera (Olympus BX61 + DP12L camera).

**Nogo66-AP binding assays.** Binding experiments were developed essentially as described (40). TEG3 cells (75% confluence) were fixed in methanol at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 5 min. After rehydrating in 0.1 M PBS, they were overlaid with different concentrations of Nogo66-AP (kindly provided by Zhigang He) diluted in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen) and 20% FCS for 90 min, washed, and fixed in 3.7% paraformaldehyde. Endogenous phosphatase was heat-inactivated at  $65^{\circ}\text{C}$ . The AP-fusion protein was viewed through an enzymatic reaction with a solution containing 34  $\mu$ M of Nitro-blue-tetrazolium and 18  $\mu$ M of 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Invitrogen). For competition experiments NgR(Ecto) was added at different concentrations during Nogo66-AP incubation. AP levels (blue reaction) were measured using a spectrophotometer (Dynerx Technologies, VA, USA).

**In vitro experiments with cerebellar granule neurons (CGNs).** CGNs from P5-P7 mouse (CD1 strain, Charles River, Lyon, France) pups were dissociated by combined trypsinization as described previously (41). Cells were placed in 24-well tissue culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) on coated coverslips (see below) and grown for 24 to 48h in DMEM medium supplemented with N2 and B27 (Invitrogen). The procedures were used to treat cells with MAIs or myelin; the cell surface was coated with purified myelin essentially as described (38). Cells were fixed in 4% buffered paraformaldehyde and stained with TUJ-1 antibody and Alexa Fluor 568-tagged secondary antibody. After rinsing, coverslips were mounted in Fluoromount™ and photodocumented. Neurite length in cultured CGNs was assessed following image acquisition using Image J software. A total of 50-57 neurons were measured in each condition.

**Time-lapse analysis of cell migration.** Fluorodish cell culture dishes (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) were coated with Laminin or Myelin as above. 5 x 10<sup>4</sup> cells were seeded in the coated dishes and 20-24 h later the time-lapse analysis was performed. Culture dishes were transferred to an LCI system (Live Cell Instruments, Seoul, Korea) for 20 h. Tracking was performed in an inverted Olympus microscope IX71 (20X Objective) and images (5 megapixels each) were captured with an Olympus XC50 camera (150 frames, one frame every 8 min. 20h in total). Cell tracking allows analysis of the scrolling speed and frame position (Xt, Yt). The multi-tracking analysis was performed with ImageJ™ software using the plugin mTrackJ (Biomedical Imaging Group Rotterdam of the Erasmus MC-University Medical Center Rotterdam, Netherlands).

**In vitro experiment on microfluidic devices.** Cortical neurons were cultured in compartmented microchips (Cat. SND900, Xona™ microfluidics, Temecula, CA, USA)(see (42) for details). Both reservoirs (axonal and soma) were coated overnight with Poly-D-Lysine to ensure that the pro-

tein also coated the surface of the 900  $\mu$ m long bridge channels. The following day the axonal compartment was also coated with OMgp as above. To avoid diffusion of the OMgp from the axonal to the soma compartment a larger amount (> 15 %) of medium was added to the soma compartment during the experiment. Cortical neurons were seeded and after an additional 2 days in vitro, eGFP-TEG3 or eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 (2 x 10<sup>5</sup> cells) were seeded in the axonal compartment. After an additional 10 days in vitro, microchips were fixed in 4% buffered paraformaldehyde and rinsed in 0.1 M PBS. After rinsing in 0.1 M PBS, chips were incubated with TUJ-1 and eGFP antibodies for two days at  $4^{\circ}\text{C}$  and 6 hours with the appropriate Alexa-tagged secondary antibodies. After rinsing, both soma and axonal compartments were filled with Fluoromount™ in 0.1 M PBS (2:1 diluted) and photodocumented. The length of the cortical neurons in the axonal compartment was measured using ImageJ™ software. A total of 20 chips were analysed in each condition.

**Traction force microscopy measurements.** Cell tractions were evaluated using constrained Fourier transform traction microscopy (FTTM) (43). PAA gels were coated with Laminin, CSPG, or OMgp as described (24), and cells were cultured over the PAA-coated gels. Briefly, to obtain a stiff gel of 12 kPa Young Modulus (PAA), 265  $\mu$ l of an Acrylamide/Bis-acrylamide mixture (15% Acrylamide and 6.5% Bis-acrylamide, Bio-Rad) was dissolved in ultrapure water containing 0.4% of 0.2  $\mu$ m diameter red fluorescent beads (Invitrogen), 0.5% ammonia persulfate, and 0.05% TEMED (Bio-Rad). For multi-tracking, the mixture was added to the center of the dish, which was then coated and stored overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The displacement field was calculated by comparing fluorescent microbead images obtained during the experiment with a reference image taken at the end of the experiment after the trypsinization and the consequent detachment of OECs from the underlying substrate. The projected cell area was calculated with Matlab™, based on the manual tracing of the OEC contours determined by a phase contrast image obtained at the start of the experiment. A particle imaging velocimetry algorithm (44) was used to determine the deformation of the substrate caused by the traction forces. The number of analyzed cells in each condition is indicated in the Results section.

**Surgical procedures and cell transplantation.** Adult female Sprague-Dawley rats (9 weeks old; 250-300 g weight) were used in the spinal cord experiments. The animals were housed with free access to food and water at room temperature of  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  under a 12:12 h light-dark cycle. The experimental procedures were approved by the ethical committee of the Universitat Autònoma de Barcelona and the IBEC in accordance with European Directive 86/609/EEC. Under anesthesia with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and aseptic conditions, laminectomy was performed in T8-T9 vertebra and a cord contusion of 200 Kdyns was induced using an Infinite Horizon Impactor (Precision System and Ins-



trumentation, Kentucky, USA). The cells for transplantation (eGFP-TEG3 or eGFP-NgR(Ecto)-TEG3) were suspended in L15 medium (Invitrogen) at 50,000 cells/ $\mu$ l and maintained in ice during the time of surgery. 30 minutes after the lesion, using a glass needle (100  $\mu$ m internal diameter, Eppendorf, Hamburg, Germany) coupled to a 10 $\mu$ l Hamilton syringe (Hamilton #701, Hamilton Co, NV, USA), 6  $\mu$ l of the corresponding cell suspension were intraspinally injected (1 mm deep into the spinal cord, 2 injections of 3  $\mu$ l each, one at each side 1 mm lateral to the lesion point), with a total of 150,000 cells per injection (300,000 cells/rat). A perfusion speed of 2  $\mu$ l/min was controlled by an automatic injector (KDS 310 Plus, Kd Scientific, Holliston, MA, USA), and the needle tip was maintained inside the tissue 3 min after injection to avoid liquid reflux. A total of 6 rats were used (3 rats received eGFP-TEG3 cells, another 3 eGFP-NgR(Ecto)-TEG3 cells). The wound was sutured by planes and the animals allowed to recover in a warm environment. Bladders were expressed twice a day. To prevent infection, amoxicillin (500 mg/l) was given in the drinking water for one week.

**Tissue processing.** Seven days post implantation, rats were deeply anesthetized (pentobarbital 60 mg/kg b.w. i.p.) and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS. The spinal cord segment from 1.5 cm rostral to 1.5 cm caudal to the injection ( $\pm$  3 cm total length) was harvested and post-fixed in the same fixative solution for 24h and cryopreserved in 30% sucrose. For GFP-positive cell localization, 30 $\mu$ m thick longitudinal cryostat sections of the spinal cord segment were obtained. Spinal cord sections of cell-transplanted rats were processed for immunohistochemistry against GFP and GFAP. Tissue sections were blocked with PBS-0.3% Triton X-100 -5% foetal bovine serum and incubated for 24h at 4°C with primary antibodies. After washes, sections were incubated for 2h at room temperature with the secondary antibody. Slides were dehydrated and mounted with Citoseal 60 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). For analysis, images (10 megapixels) were obtained with a digital camera (Leica DFC 550) attached to the microscope (Leica AF700). Starting from the injection points, 11 consecutive sections of the length of approximately 200  $\mu$ m were taken into account. GFP-positive cells in each section were counted.

**Statistical analysis.** Summary data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (standard error of the mean) of at least three independent experiments (unless indicated). Means were compared by one-way ANOVA test. Value of \*\*  $p \leq 0.05$  and \*\*\*  $p \leq 0.01$  were considered statistically significant.

## Acknowledgments

The authors thank Tom Yohannan for editorial advice and Oscar Castaño, Miguel Ángel Mateos-Timoneda and E. Engel for helping in S.E.M studies and

offering comments on the manuscript. We also thank M. Segura and M. Morell for technical assistance. This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2012-32617), the Generalitat de Catalunya (SGR2014-1218), La Caixa Obra Social Foundation, and the Basque Foundation of Health and Innovation Research (BIO12/AL/004) to JADR. RG was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI11-00075) and work in FW's lab was supported by grants from the Dirección General de Ciencia y Tecnología-DGICYT-(SAF2012-39148-C03-01), and EU-FP7-2009-(CT222887), as well as an institutional grant from the 'Fundación Areces'. Work at XN's lab was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2009-12495), and funds from CIBERNED and Cell Therapy Network (TERCEL) of Instituto de Salud Carlos III of Spain. XT was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2012-38146) and the European Research Council (Grant Agreement 242993). JS was supported by Fundación Botin and Inst Salud Carlos III PI10/01171. PC was supported by AGAUR, and SN and OS were supported by MINECO and IBEC. DR was supported by a fellowship from the National Commission for Science and Technology (CONICYT, Chile).

## References

- Dumont RJ, et al. (2001) Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol* 24(5):254-264.
- Furlan JC, Sakakibara BM, Miller WC, & Krasnioukov AV (2013) Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. *Can J Neurol Sci* 40(4):456-464.
- Yang XF, Wang H, & Wen L (2011) From myelin debris to inflammatory responses: a vicious circle in diffuse axonal injury. *Med Hypotheses* 77(1):60-62.
- Yiu G & He Z (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature reviews. Neuroscience* 7(8):617-627.
- Wang H, Fang H, Dai J, Liu G, & Xu ZJ (2013) Induced pluripotent stem cells for spinal cord injury therapy: current status and perspective. *Neurol Sci* 34(1):11-17.
- Sun Y, et al. (2013) Transplantation of oligodendrocyte precursor cells improves locomotion deficits in rats with spinal cord irradiation injury. *PLoS One* 8(2):e57534.
- Li Y, Li D, & Raisman G (2005) Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *J Neurocytol* 34(3-5):343-351.
- Roet KC & Verhaagen J (2014) Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheathing cells. *Exp Neurol*.
- Raisman G, Barnett SC, & Ramon-Cueto A (2012) Repair of central nervous system lesions by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Handbook of clinical neurology*

109:541-549.

10. Doucette JR, Kiernan JA, & Flumerfelt BA (1983) The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system. *J Anat* 137 (Pt 1):1-19.
11. Nedelec S, Dubacq C, & Trembleau A (2005) Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol* 34(1-2):49-64.
12. Ramon-Cueto A & Santos-Benito FF (2001) Cell therapy to repair injured spinal cords: olfactory ensheathing glia transplantation. *Restorative neurology and neuroscience* 19(1-2):149-156.
13. Lu J, Feron F, Mackay-Sim A, & Waite PM (2002) Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain : a journal of neurology* 125(Pt 1):14-21.
14. Lopez-Vales R, Fores J, Navarro X, & Verdu E (2006) Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 24(3):443-454.
15. Ekberg JA, Amaya D, Mackay-Sim A, & St John JA (2012) The migration of olfactory ensheathing cells during development and regeneration. *Neuro-Signals* 20(3):147-158.
16. Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, & Bunge MB (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *The Journal of Neuroscience* 18(10):3803-3815.
17. Resnick DK, et al. (2003) Adult olfactory ensheathing cell transplantation for acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 20(3):279-285.
18. Boyd JG, Lee J, Skihar V, Doucette R, & Kawaja MD (2004) LacZ-expressing olfactory ensheathing cells do not associate with myelinated axons after implantation into the compressed spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7):2162-2166.
19. Lu P, et al. (2006) Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. *J Neurosci* 26(43):11120-11130.
20. Deng C, et al. (2006) Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord. *J Neurosci Res* 83(7):1201-1212.
21. Cao L, et al. (2006) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration. *Glia* 54(6):536-544.
22. Huang ZH, et al. (2011) Slit-2 repels the migration of olfactory ensheathing cells by triggering Ca<sup>2+</sup>-dependent cofilin activation and RhoA inhibition. *J Cell Sci* 124(Pt 2):186-197.
23. Wang Y & Huang ZH (2012) Morphological phenotypes of olfactory ensheathing cells display different migratory responses upon Slit-2. *Exp Cell Res* 318(15):1889-1900.
24. Nocentini S, et al. (2012) Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy. *Cell Mol Life Sci* 69(10):1689-1703.
25. Su Z, et al. (2007) Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *J Cell Sci* 120(Pt 11):1877-1887.
26. Vukovic J, et al. (2009) The glycoprotein fibulin-3 regulates morphology and motility of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia* 57(4):424-443.
27. Silver J & Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5(2):146-156.
28. Fawcett JW, Schwab ME, Montani L, Brazda N, & Muller HW (2012) Defeating inhibition of regeneration by scar and myelin components. *Handbook of clinical neurology* 109:503-522.
29. Cregg JM, et al. (2014) Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol* 253:197-207.
30. Fouad K, et al. (2005) Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *J Neurosci* 25(5):1169-1178.
31. Fouad K, Pearse DD, Tetzlaff W, & Vavrek R (2009) Transplantation and repair: combined cell implantation and chondroitinase delivery prevents deterioration of bladder function in rats with complete spinal cord injury. *Spinal Cord* 47(10):727-732.
32. Del Rio JA & Soriano E (2007) Overcoming chondroitin sulphate proteoglycan inhibition of axon growth in the injured brain: lessons from chondroitinase ABC. *Current pharmaceutical design* 13(24):2485-2492.
33. Moreno-Flores MT, et al. (2003) Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. *J Neurochem* 85(4):861-871.
34. Fournier AE, Gould GC, Liu BP, & Strittmatter

- ter SM (2002) Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci* 22(20):8876-8883.
35. He XL, et al. (2003) Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron* 38(2):177-185.
36. Li S, et al. (2004) Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci* 24(46):10511-10520.
37. Wang X, Baughman KW, Basso DM, & Strittmatter SM (2006) Delayed Nogo receptor therapy improves recovery from spinal cord contusion. *Ann Neurol* 60(5):540-549.
38. Seira O, et al. (2010) Neurites regrowth of cortical neurons by GSK3beta inhibition independent of Nogo receptor 1. *J Neurochem* 113(6):1644-1658.
39. Mingorance A, et al. (2004) Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Molecular and cellular neurosciences* 26(1):34-49.
40. Montolio M, et al. (2009) A semaphorin 3A inhibitor blocks axonal chemorepulsion and enhances axon regeneration. *Chem Biol* 16(7):691-701.
41. Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, & Bandtlow CE (2002) Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 22(23):10368-10376.
42. Taylor AM, et al. (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2(8):599-605.
43. Butler JP, Tolic-Norrelykke IM, Fabry B, & Fredberg JJ (2002) Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(3):C595-605.
44. Trepats X, et al. (2009) Physical forces during collective cell migration. *Nat Phys* 5(6):426-430.
45. Windus LC, Claxton C, Allen CL, Key B, & St John JA (2007) Motile membrane protrusions regulate cell-cell adhesion and migration of olfactory ensheathing glia. *Glia* 55(16):1708-1719.
46. Windus LC, et al. (2010) Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cell Mol Life Sci* 67(10):1735-1750.
47. Roca-Cusachs P, Sunyer R, & Trepats X (2013) Mechanical guidance of cell migration: lessons from chemotaxis. *Current opinion in cell biology* 25(5):543-549.
48. Trepats X, Chen Z, & Jacobson K (2012) Cell migration. *Comprehensive Physiology* 2(4):2369-2392.
49. Tambe DT, et al. (2013) Monolayer stress microscopy: limitations, artifacts, and accuracy of recovered intercellular stresses. *PLoS one* 8(2):e55172.
50. McKeon RJ, Hoke A, & Silver J (1995) Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 136(1):32-43.
51. Mountney A, et al. (2013) Sialidase, chondroitinase ABC, and combination therapy after spinal cord contusion injury. *Journal of neurotrauma* 30(3):181-190.
52. Bradbury EJ, et al. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416(6881):636-640.
53. Bradbury EJ & Carter LM (2011) Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Res Bull* 84(4-5):306-316.
54. Zhang C, He X, Lan B, & Li H (2009) [Study on repair of subacute spinal cord injury by transplantation of olfactory ensheathing cells combined with chondroitinase ABC in adult rats]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery* 23(1):8-13.
55. Kanno H, et al. (2014) Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34(5):1838-1855.
56. Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, Li S, & Strittmatter SM (2007) Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27(9):2176-2185.
57. Woodhall E, West AK, Vickers JC, & Chuah MI (2003) Olfactory ensheathing cell phenotype following implantation in the lesioned spinal cord. *Cell Mol Life Sci* 60(10):2241-2253.
58. Park JW, Kim HJ, Kang MW, & Jeon NL (2013) Advances in microfluidics-based experimental methods for neuroscience research. *Lab on a chip* 13(4):509-521.
59. Taylor AM, et al. (2003) Microfluidic Multicompartment Device for Neuroscience Research. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 19(5):1551-1556.
60. Roloff F, Ziege S, Baumgartner W, Wewetzer K, &

Bicker G (2013) Schwann cell-free adult canine olfactory ensheathing cell preparations from olfactory bulb and mucosa display differential migratory and neurite growth-promoting properties in vitro. *BMC Neurosci* 14:141.

61. Ould-Yahoui A, et al. (2013) Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells. *Cell Transplant* 22(6):993-1010.

62. Dickendesher TL, et al. (2012) NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci* 15(5):703-712.

63. Lukovic D, et al. (2014) Brief report: astrogliosis promotes functional recovery of completely transected spinal cord following transplantation of hESC-derived oligodendrocyte and motoneuron progenitors. *Stem Cells* 32(2):594-599.

64. Vukovic J, et al. (2009) Lack of fibulin-3 alters regenerative tissue responses in the primary olfactory pathway. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 28(7):406-415.

65. Schwarting GA, et al. (2000) Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* 20(20):7691-7697.

66. Lee JK, et al. (2010) Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron* 66(5):663-670.

67. Masliah E, et al. (2010) Genetic deletion of Nogo/Rtn4 ameliorates behavioral and neuropathological outcomes in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience* 169(1):488-494.

68. Winzeler AM, et al. (2011) The lipid sulfatide is a novel myelin-associated inhibitor of CNS axon outgrowth. *J Neurosci* 31(17):6481-6492.

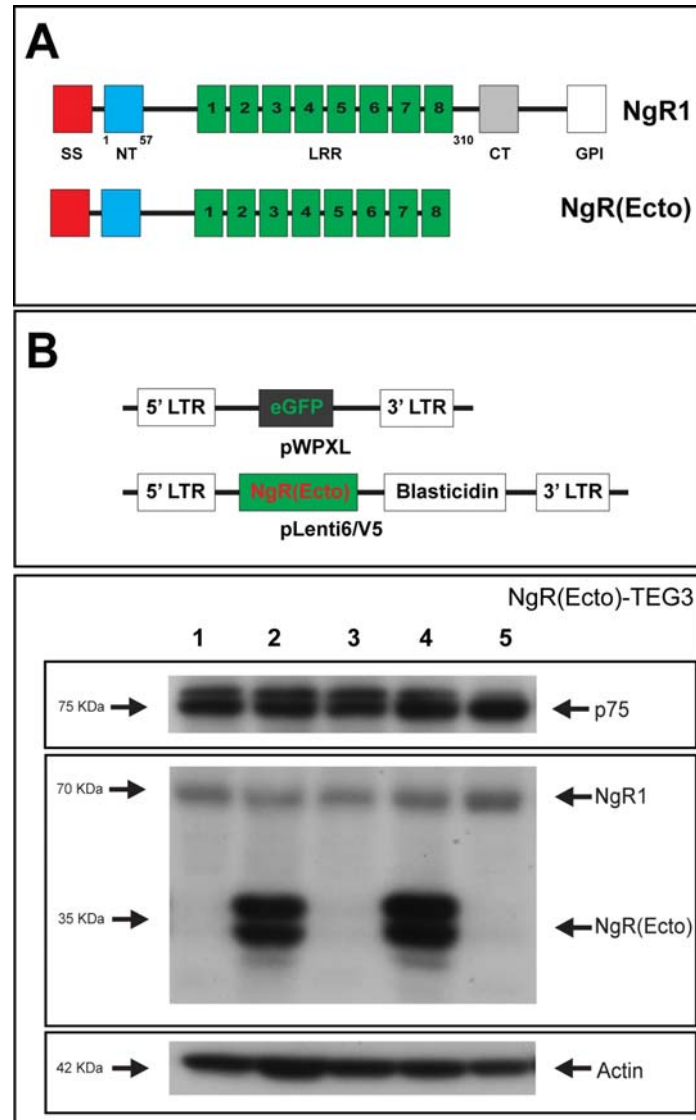
69. Stiles TL, et al. (2013) LDL receptor-related protein-1 is a sialic-acid-independent receptor for myelin-associated glycoprotein that functions in neurite outgrowth inhibition by MAG and CNS myelin. *J Cell Sci* 126(Pt 1):209-220.

70. Huang ZH, et al. (2008) Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay. *Cell Res* 18(4):479-490.

71. Fan Z, et al. (2013) Control of olfactory ensheathing cell behaviors by electrospun silk fibroin fibers. *Cell Transplant* 22 Suppl 1:S39-50.

72. Zhang LL, Huang LH, Zhang ZX, Hao DJ, & He BR (2013) Compatibility of olfactory ensheathing cells with functionalized self-assembling peptide scaffold in vitro. *Chin Med J (Engl)* 126(20):3891-3896.

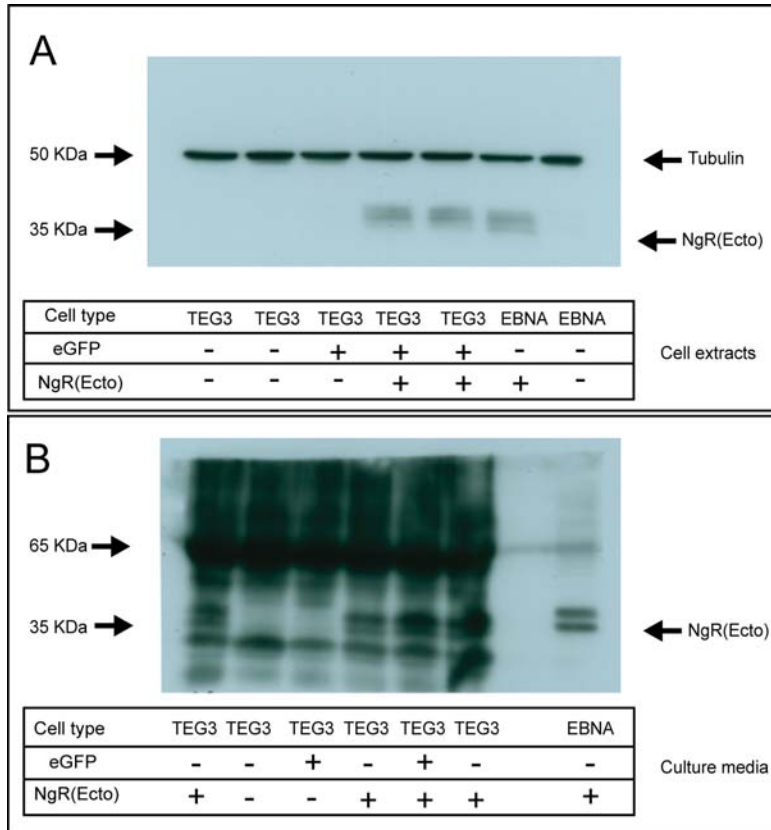
## Supplementary



**Supplementary Figure 1.**

A,B) Diagrams illustrating the full length and the cloned ectodomain of the Nogo receptor protein (A). Relevant domains of the protein are also labeled. B) Scheme of the two lentiviral vectors used in the study. C) Full size scanned films of Western blot experiments of the characterization of TEG3 clones expressing the NgR(Ecto). As example p75 expression in these five clones is also reported. Tubulin was used as an internal protein control. Arrows point to the protein of interest. Note that both endogenous NgR1 and ectodomain are expressed in clones 2 and 4.





**Supplementary Figure 2.**

Full size un-cropped films of the Western blot experiments illustrated in Figure 4. Arrows point to proteins of interest in cell extracts (A) and culture media (B). The cell type (TEG3 or EBNA) and the infection with eGFP or NgR(Ecto) lentivirus are also indicated.

# Capítulo III

## Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip.

Authors: Ziqiu Tong, Oscar Seira, Cristina Casas, Diego Reginensi, Antoni Homs, Josep Samitier and José Antonio Del Río.

Published in: Royal Society of Chemistry Advances (RSC Advances), 2014,4, 54788-54797.

### RESUMEN:

El transporte bidireccional a lo largo de los axones entre los terminales sinápticos somatodendríticos es crucial para mantener la función y la viabilidad de las neuronas. Cuando hay un desbalance, se produce una insuficiencia de la homeostasis neuronal que compromete sus procesos funcionales como su viabilidad. De hecho, distintas enfermedades neurodegenerativas se originan a partir de un desbalance en la función y el transporte axonal. Por lo tanto, numerosas técnicas han sido desarrolladas para establecer y mantener los cultivos neuronales en dispositivos microfluídicos compartimentalizados para comprender mejor los procesos asociados a cada dominio neuronal.

En este estudio, hemos demostrado que el uso de sistemas lab-on-a-chip para co-cultivos de motoneuronas con células C2C12, línea celular de miotubos, para imitar la unión neuromuscular. Además, mediante la integración de técnicas de microscopía en tiempo real de  $Ca^{+2}$  hemos demostrado funcionalidad de los NMJ en los chips a través de transientes de calcio inducidos por KCl en miotubos conectados. Esta plataforma puede potencialmente convertirse en una herramienta útil para análisis experimental in vitro para investigación básica de la NMJ.





Click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2014, 4, 54788

## Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip†

Ziqiu Tong,<sup>‡a</sup> Oscar Seira,<sup>‡§</sup> Cristina Casas,<sup>a</sup> Diego Reginensi,<sup>abc</sup> Antoni Homs-Corbera,<sup>ade</sup> Josep Samitier<sup>\*ade</sup> and José Antonio Del Río<sup>\*abc</sup>

Healthy bi-directional intracellular transport along the axons between the somatodendritic and synaptic terminals is crucial to maintain the function and viability of neurons. When misbalanced, there is neuronal homeostasis failure that compromises its function and viability. In fact, several neurodegenerative diseases originate from misbalanced axonal transport and function. Thus numerous techniques have been developed to establish and maintain neuronal cultures in compartmented microfluidic devices to better understand these processes mimicking neuronal polarization. Although useful, these *in vitro* platforms do not allow for a full specific and temporal analysis in a completely monitored way. In this study, we have utilized a microfluidic system with large open cell culture reservoirs to precisely control neuronal microenvironments, capable of mimicking axon transport and synapse formation and to facilitate their analysis. We demonstrate using this lab-on-a-chip system for long-term motoneuron co-culture with C2C12-derived myotubes to mimic neuro-muscular junction (NMJ) formation. Furthermore, by integration with a calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) imaging technique, we have proved the NMJ functionality in-chip through KCl-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient in connected myotubes. This platform can potentially become a useful tool as a straightforward, reproducible, and high-throughput *in vitro* model for basic NMJ research, and for high-throughput drug screening.

Received 11th September 2014  
Accepted 17th October 2014

DOI: 10.1039/c4ra10219c

[www.rsc.org/advances](http://www.rsc.org/advances)

### Introduction

Neuronal polarization is a key process during neuronal differentiation and maturation being the basis of neuronal transmission.<sup>1</sup> The signal propagation depends on the fact that neurons display two morphologically and functionally distinct domains: the somatodendritic and axonal domains.<sup>2</sup> During maturation, especially in the adult stage, neurons maintain their polarity by controlling local protein synthesis and degradation together with axonal transport along their microtubule-enriched cytoskeleton.<sup>3–5</sup> In fact, most neuronal functions rely on the relevant bi-directional long-distance transport of

cytoplasmic components including vesicles, mitochondria and endocytic organelles along the axon.<sup>1</sup> The maintenance of these domains, in particular the axonal functions, are especially crucial in long-range projecting neurons such as spinal motor neurons or cortical pyramidal cells. Indeed, given the importance of polarity, many studies have focused on uncovering the mechanisms that establish neuronal polarization, and many factors involved in axon specification have been identified using *in vitro* and *in vivo* models. For example, organelle (mitochondria) transport along axons has attracted special interest in recent years following its influences on neurodegenerative diseases in both central<sup>6–8</sup> (*i.e.*, Alzheimer's or Parkinson's diseases) and peripheral<sup>9,10</sup> nervous system (*i.e.*, amyotrophic lateral sclerosis or Charcot–Marie–Tooth diseases).

Precise control, manipulation, and monitoring of cellular microenvironments using microfluidics technology, enabling the handling of fluid flow at  $\mu$ -meter scale, has becoming an indispensable tool for biomedical researchers. Especially those presenting compartmentalized microfluidic platforms which enable the physical isolation of axons from cell bodies and dendrites, have gained much popularity in neurobiological research<sup>11</sup> (ESI Table 1†). Their applications have revealed novel findings that have otherwise been unobtainable by other *in vitro* or *in vivo* methods. For example, a dual compartmentalized microfluidic cell culture device was used by Taylor *et al.* to extract selectively the axonal mRNA from mammalian CNS

<sup>a</sup>Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Baldri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: [jadelrio@ibecbarcelona.eu](mailto:jadelrio@ibecbarcelona.eu); [jsamitier@ibecbarcelona.eu](mailto:jsamitier@ibecbarcelona.eu); Tel: +34 93 4035923

<sup>b</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Department of Cell Biology, University of Barcelona (UB), Barcelona, Spain

<sup>d</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Zaragoza, Spain

<sup>e</sup>Department of Electronics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c4ra10219c

‡ Authors equally contributed to the work.

§ Current address: International Collaboration On Repair Discoveries (ICORD) Blusson Spinal Cord Centre and Department of Zoology, Faculty of Science, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

neuron.<sup>12</sup> Current studies have also focused on using this or similar compartmentalized microfluidic devices to investigate axon growth,<sup>13,14</sup> axon–glia interaction,<sup>15</sup> axon responses in models of spinal cord injury<sup>16</sup> or synapse junction screening<sup>17</sup> (ESI Table 1†). In addition, when combined with microelectrode array platform, these devices have been utilized to examine the cortico-thalamic network<sup>18</sup> and to assess cortico–cortical electrical activity.<sup>19</sup> Traditional method to establish NMJ formation requires motoneurons and muscle cells to be seeded in the same Petri dish and co-cultured under single culture medium.<sup>20,21</sup> Recent attempts have been made to utilize aforementioned compartmentalized microfluidic systems to create more suitable *in vitro* models.<sup>22,23</sup> In fact, in the organism cell bodies of motoneurons are located meters away from the muscle cells and both experience different physiological microenvironments. Hence, it is inadequate to faithfully recapitulate *in vivo* condition of the neuromuscular connections *via* traditional Petri dish co-culture approach. Furthermore, to manipulate individual cell population within the mixed population seems difficult.

The ability to tailor cell microenvironments individually can be desirable and useful, and usually mimics more closely the physiological conditions. Based on the microfluidic co-culture system developed by Taylor *et al.*,<sup>24</sup> in a scale similar to the pioneering study by Campenot,<sup>25</sup> we have utilized a microfluidic chip compatible with the size and geometry of a microscope slide for further optical analysis. The compartmented system contains a physical barrier with a large number (up to 200) of embedded microchannels separating two identical compartments that permits only the extension of neurites. In addition, controlled, fluidically isolated cell seeding reservoirs have been achieved in our device by simple control of media volume differences between the two reservoirs. Furthermore, this type of open system provides an easier and more direct access to manipulate cell cultures.<sup>26,27</sup>

We report in here a robust co-culture protocol of mouse primary motoneuron cells with C2C12-derived myotubes in our modified chip. We have successfully demonstrated the synaptic formation between the two cell types by bungarotoxin (BTX) immunostaining,<sup>22,23</sup> and we have further integrated the calcium imaging technique to study the functional synapse responses, namely to chemically stimulate motoneurons and observe calcium influx changes in differentiated myotubes.

## Materials and methods

### Neuron culture device design and fabrication

Microfluidic neuron culture platform was fabricated in poly-(dimethylsiloxane) (PDMS) by standard photolithography and soft lithography.<sup>38</sup> The overall chip design and dimensions can be seen in Fig. 1. Polystyrene transparent masks were designed using CAD file and printed *via* a high-resolution printer (CAD/Art Services, OR, USA). For the fabrication of single 2  $\mu\text{m}$  wide channel chip, a chrome mask (JD Photo-Tools, United Kingdom) was instead used for achieving a higher resolution.

In brief, a glass slide was pre-cleaned by immersing in Piranha solution for 10 minutes and dried at 200  $^{\circ}\text{C}$  for 30

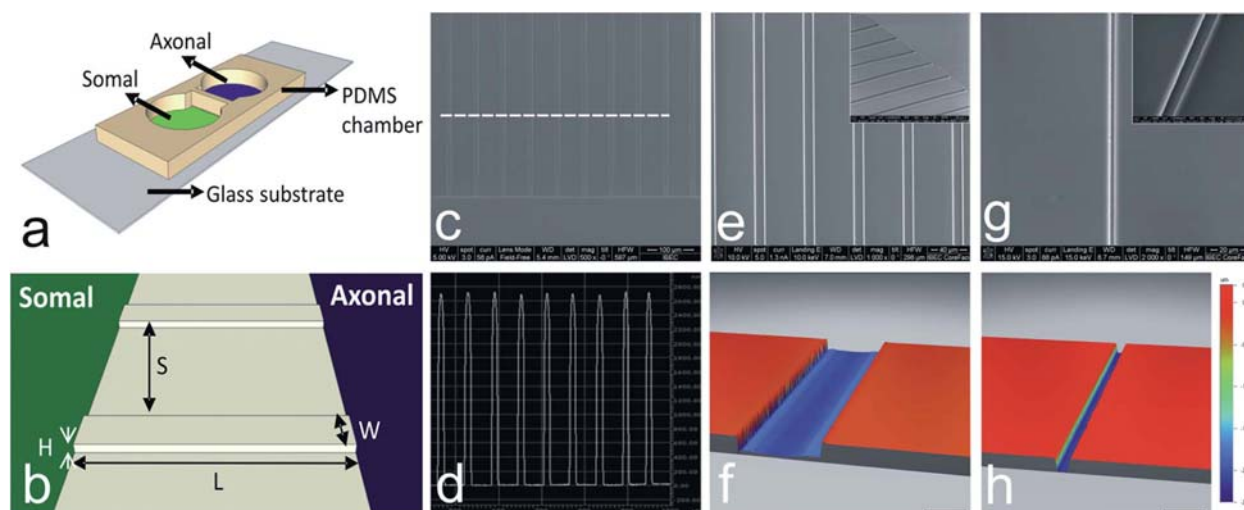
minutes. SU8 2 (MicroChem, MA) photoresist was then spun at a rate of 5000 rpm for 30 seconds to obtain a thin-film layer (1  $\mu\text{m}$  thick) which facilitates the adhesion of subsequent layers of photoresist. The resulting photoresist coated glass slide was exposed with UV light for 10 seconds and heated for 1 minute at 95  $^{\circ}\text{C}$ . A second layer of SU8 2 was then spin-coated at a rate of 1500 rpm to achieve a thickness of approximate of 2.7  $\mu\text{m}$ . A polystyrene transparent mask defining the microchannels (10  $\mu\text{m}$  width by 50  $\mu\text{m}$  spacing, Fig. 1) was then used to pattern the second layer of SU8 2 by exposing to UV light for 4.5 seconds. In the case of fabricating 2  $\mu\text{m}$  wide channels, a chrome mask was used and exposed to UV light for 3 seconds. After resolved with SU-8 Developer (MicroChem), the master was rinsed with isopropanol (Panreac Quimica, Spain), and dried with nitrogen gas. The process was repeated with a denser photoresist to create the third layer of two reservoirs. SU8 50 was spun at 2000 rpm for 30 seconds (resulting 60  $\mu\text{m}$  in height) and a second polystyrene transparent mask was aligned to the first pattern and used to pattern the two large reservoirs. The final SU8 on glass structure was used to create a replication process resistant mold of PDMS by a pouring and casting methodology.

The slide was treated with trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane (Sigma) for 1 hour before pouring PDMS mixture onto it. A thin layer slab of PDMS (1 mm) was fabricated by mixing a small amount of 10 : 1 ratio of PDMS base to catalyst, and poured onto the silanized SU8 master. Then, it was subjected to curing by oven heating for 1 hour at 85  $^{\circ}\text{C}$ . The cured PDMS was carefully peeled from the SU8 structure thus creating a PDMS-master. The master was then placed inside the plasma cleaner (Harrick Scientific, NY) for 1 min to activate the surface, and then irreversibly bound to a glass slide (also treated with plasma) with the non-feature side contacting the glass to be used later to make replicas of final PDMS device (5 mm thick). The advantage of using a PDMS master is that it's more robust and durable than the SU8 photoresist features on glass. Two large cell-seeding reservoirs were hallowed out by using Harris Uni-Core cutter ( $\varnothing = 12$  mm, Ted Pella, CA). The final PDMS devices were cleaned by sonication in ethanol and then in Millipore water, and were further sterilized by autoclaving process.

Features of SU8 on glass and PDMS chips were analyzed and verified by mechanical profilometer (DEKTAK 6M, Veeco, NY), optical profilometry (WYKO NT1100, Veeco, NY), or scanning electron microscopy (SEM) (FEI, Oregon) before their subsequent uses.

### Device surface coating

Thin glass cover slides (24  $\times$  60 mm, Menzel Gläser, Germany) were cleaned with ethanol and sterilized in an autoclave. The PDMS culture chips and glass cover slides were surface-activated by introducing inside a plasma cleaner for 2 minutes. Then the PDMS chips were assembled on top of the cover slides by applying gentle pressure with a pair of tweezers. The bonded devices were further sterilized under UV light for 10 minutes inside a cell culture hood before pipetting coating solution of poly-L-ornithine (15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma) and then



**Fig. 1** Design and fabrication of microfluidic based open chamber co-culture system. (a) Schematic drawing of co-culture system consisting of two open chambers ( $\varnothing = 12$  mm) for culturing of motoneurons and C2C12-derived myotubes. The PDMS device was irreversibly bonded on top of glass slide by plasma bonding. (b) The somal and axonal compartments are connected by a series of parallel microchannels ( $W \times H \times L = 10 \mu\text{m} \times 2.7 \mu\text{m} \times 1$  mm) separated by a distance of  $50 \mu\text{m}$ . In the experiments of utilizing smaller channel dimensions, the width was modified to  $2 \mu\text{m}$ , while the other parameters were kept the same. SU8 photoresist features on glass slide masters were subjected to SEM (c) and profilometer (d) characterization.  $10 \mu\text{m}$  (e and f) and  $2 \mu\text{m}$  (g and h) wide PDMS channels were observed under SEM (e and g) and interferometer (f and h). Insets of (e and g) were imaged under tilt condition using SEM. Scale bars in (f) and (h) are  $5 \mu\text{m}$ .

incubated for 3 hours at room temperature (RT) until dry. Next, laminin ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Sigma) was added to the wells and stored overnight in a humidified incubator ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ). The devices were washed three times with Milli-Q water and PBS before seeding cells.

#### Mouse embryonic motoneurons isolation

Motoneuron-enriched cultures were isolated from ventral cords of embryonic day 13.5 (E13.5) mice. Animals were maintained in a pathogen-free barrier facility at the University of Barcelona animal facility. Experiments were approved by the University of Barcelona Animal Care (Protocol 7855) and Use Committee and used in accordance with Spanish (RD223/88) and European (86/609/ECC) regulations. Ventral spinal cord tissue was dissected from embryos and collected in cold dissection media (Hank's balanced salt solution, HBSS, Invitrogen Life Technologies) containing  $6.5 \text{ mg mL}^{-1}$  culture grade glucose (Sigma). The tissues were mechanically chopped and dissociated with  $0.05\%$  trypsin-EDTA (Invitrogen Life Technologies) for 7 minutes at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Fragments were collected and transferred to an L15 solution (Invitrogen Life Technologies) with B27 (18 mM Glucose/22.5 mM  $\text{NaHCO}_3$ /antibiotics and N2 supplement) mixed with  $4\%$  BSA (Sigma) and  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  DNase I (Applied Biosystems) solutions. Tissue fragments were then mechanically dissociated with a pipette tip ( $200 \mu\text{L}$ ) and the dispersed cell suspension was left standing for 2 minutes to precipitate the tissue debris. The supernatant was collected in a new conical tube and the dissociated cells were layered over a  $1.5 \text{ mL}$  of L15 solution with  $4\%$  BSA followed by centrifugation at  $200 \times g$  for 5 minutes at RT for the first purification step. The pellet was then re-suspended and layered over a  $2 \text{ mL}$  gradient solution with dissection media

and OptiPrep density gradient medium ( $60\%$ , Axis-Shield) followed by centrifugation at  $520 \times g$  for 10 minutes at RT. The final pelleted motoneurons were suspended in a complete motoneuron media (CMM) and were ready for seeding in glass bottom Petri dishes ( $\varnothing = 12$  mm) or in the somal compartments of the microfluidic devices.

#### C2C12 myoblast culture and preparation

C2C12 cells were expanded in DMEM supplemented with  $10\%$  FBS (Invitrogen Life Technologies),  $25 \text{ mM}$  HEPES (Invitrogen Life Technologies),  $1\%$  L-glutamine, and antibiotics. When culture reached  $90\%$  confluence, FBS serum was replaced to  $5\%$  normal horse serum (NHS) in order to trigger myotube differentiation.

#### Co-culture of motoneurons and C2C12 muscle cells in microfluidic chip

Motoneurons were seeded first in the compartmentalized devices ( $\sim 4.5$  to  $5 \times 10^5$  cells per compartment) and maintained in CMM containing Neurobasal media, supplemented with  $1\%$  NHS,  $1\%$  penicillin/streptomycin, B27 and L-glutamine (all from Invitrogen Life Technologies). Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF,  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , PeproTech) and Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF,  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , PeproTech) were added to CMM. On the next day, C2C12 myoblasts were seeded in the myotube compartments ( $\sim 2000$  cells per compartment) and cultured in C2C12 media. 3 days later, media was replaced with differentiation media to induce myoblast differentiation. Meanwhile, cytosine arabinoside (Ara-C,  $5 \mu\text{M}$ , Sigma) was added to the CMM to suppress excessive glial cell growth. Co-cultures were maintained until C2C12 cells were highly differentiated to



myotubes and motoneuron axons reached the myotube compartments which were usually detected at 8–10 DIV. Media changes for both cultures were carried out every 3 days. For C2C12 myotube culture, 3–4 days after differentiation started, the media was also supplemented with Ara-C to prevent myoblasts from dividing and becoming overcrowded. From that point on, the co-cultures were ready for subsequent analysis with Calcein™ (1 mM, Molecular Probes), Mitotracker labelling (200 nM, Invitrogen Life Technologies) or use for confocal Ca<sup>2+</sup> influx measurements. In selected experiments, additional neurotrophins: Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF, 2 ng mL<sup>-1</sup>, PeproTech) and Hepatocyte Growth Factor (HGF, 10 ng mL<sup>-1</sup>, PeproTech), or inhibitory molecules: Semaphorin 3A (Sema3A, 1 µg mL<sup>-1</sup>, R&D systems) were added to the motoneuron culture media to access the axon growth efficiency.

### Immunostaining and Alexa-bungarotoxin staining

Cell cultures were fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 30 minutes at RT, washed twice in 0.1 M PBS, and then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in 0.1 M PBS for 10 minutes. Cultures were blocked with 10% FBS in 0.1 M PBS for 30 minutes at RT. Primary antibody dilutions were prepared as followed: monoclonal anti-myosin (Sigma) was diluted at 1 : 1000 and polyclonal anti-β-tubulin (Covance) at 1 : 2000. The Alexa Fluor 488-conjugated α-bungarotoxin (Alexa-BTX; 1 : 1000, molecular probes) was used to visualize the acetylcholine receptor (AChR) clusters present in the NMJs. Cultures were incubated in primary antibodies diluted in 0.1 M PBS containing 5% FBS at 4 °C overnight or for 1 hour at RT. Cultures were then rinsed 3 times with 0.1 M PBS and incubated for 90 minutes at RT with secondary antibodies (Alexa Fluor 488, 568, 405, 1 : 500; molecular probes) diluted in 0.1 M PBS. To increase the efficiency of labelling and washing, the amount of solutions in the microfluidic chip compartments were kept at some differences. The hydrostatic pressure caused by the fluid height difference facilitated the fluids entering the microchannels. Images were acquired by Leica TCS SP5 confocal microscopy or Olympus BX61 microscopy and were further analyzed and processed by ImageJ® software.

### Calcium (Ca<sup>2+</sup>) transient measurement

Myotube compartments containing differentiated myotubes were rinsed twice with HBSS and then incubated with a calcium sensitive fluorescent dye, Fluo-4 acetoxymethyl (Fluo-4 AM) ester (10 µM, Invitrogen Life Technologies) for 1 hour at 37 °C. After the incubation, Fluo-4 AM was removed and rinsed three times with HBSS. The co-culture chips were then incubated for another 30 minutes at 37 °C in HBSS for de-esterification process before performing fluorescence measurements. Potassium chloride (KCl, 100 mM, Sigma) was added to motoneuron compartments as a depolarization agent. Ca<sup>2+</sup> release intensity level in myotube compartments was recorded for a total of 30 minutes. The liquid volumes in myotube compartments were kept higher than the motoneuron compartments to prevent the convective flow of KCl to myotube compartments. As a positive control, after 30 minutes video recording, KCl was added

directly to the myotube compartments. In selected experiments, tetrodotoxin (TTX, 2 µM, Sigma) was added to the motoneuron compartment after the initial KCl stimulation. During whole labelling process, motoneuron compartments were always maintained with the motoneuron growth media. The fluorescence intensity time-lapse videos were acquired using Leica TCS SP2 confocal microscopy equipped with temperature (37 °C), humidity, and CO<sub>2</sub> controls. The images were further analyzed and quantified with ImageJ® software (MBF plugin, McMaster University biophotonics facility).

## Results

### Design and fabrication of the neuronal microfluidic co-culture platform

The microfluidic co-culture platform consists of a moulded elastomeric polymer piece, PDMS, placed on top of a glass coverslip (Fig. 1a). The bonding was facilitated *via* the exposure of PDMS surface and glass slide with oxygen in a plasma chamber for surface activation creating an irreversible bonding. This strong bonding prevents leakage of the media into the other chamber, undesired alternative axonal pathways, and detachment of PDMS from the glass coverslip during long-term cell culture. The device contains a physical barrier with embedded microchannels ( $L = 1$  mm) separating two large reservoirs ( $\varnothing = 12$  mm), *i.e.*, somal and axonal reservoirs (Fig. 1b). Media was changed every 2 to 3 days and no appreciable changes in cell viability or detectable liquid evaporation were observed. It took approximately one week in culture for motoneuron axons to cross the entire microchannels and to reach the adjacent reservoir. The width ( $W$ ) and height ( $H$ ) of the microchannels were measured to be 10 µm and 2.7 µm respectively, and separated ( $S$ ) by 50 µm (Fig. 1b–f). This geometry allows neurites to enter microchannels but not the cell bodies due to physical constraints. The length of microchannels were chosen to be 1 mm because this length scale ensures that only axons were able to cross the entire microchannels and not dendrites.<sup>24</sup> In parallel, we have also designed and fabricated a device containing smaller microchannels ( $W \times H = 2$  µm  $\times$  2.7 µm) aiming for isolation of a low number of axons (Fig. 1g and h). However, with this dimension, it took approximately 2 weeks for the axons to cross the entire 1 mm long microchannels (ESI Fig. 1†).

### Establishing a protocol for mixed co-culture of motoneuron–myotube

As an initial step to set up a co-culture protocol for in-chip system, we first analyzed culture conditions individually for motoneurons and myoblasts in current culture plates (see Material and methods for details). After 8 days in culture, motoneurons exhibited typical stellate morphology in glass bottom Petri dishes (Fig. 2a). Isolation of a pure population of motoneurons is challenging, especially from embryonic mouse spinal cord. In fact, after optimizing the isolation protocol, we could still identify the presence of astrocytes (S100β or GFAP-positive; Fig. 2b and c) and oligodendrocytes (olig2-positive,



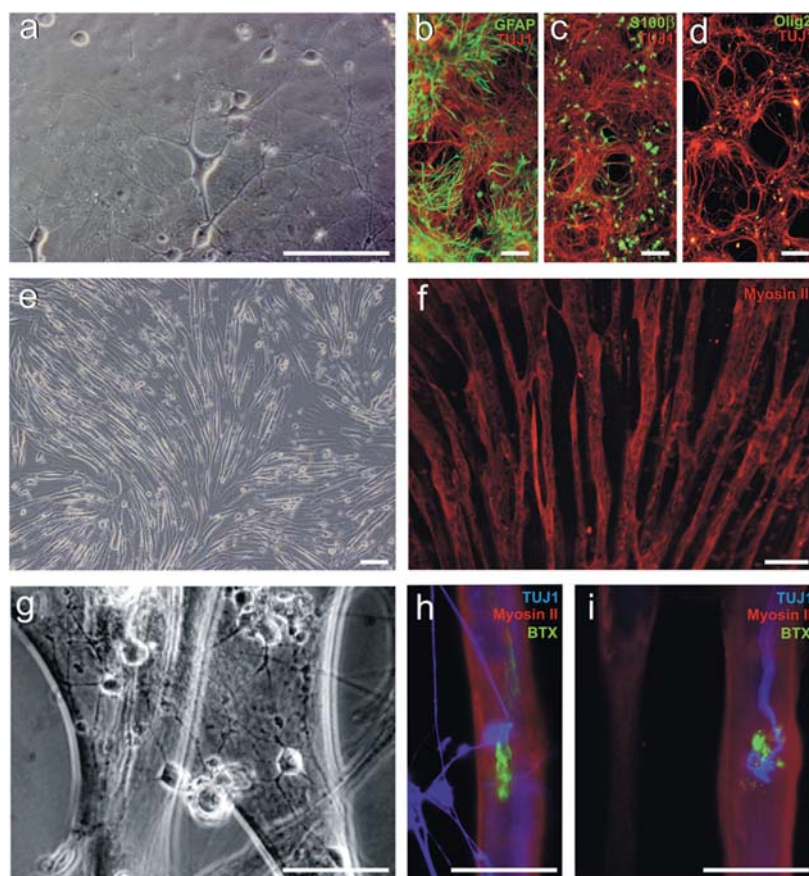


Fig. 2 Characterization of motoneuron and myotube co-culture on a single platform. (a) Photomicrograph illustrating cultured embryonic mouse motoneurons growing over poly-L-ornithine and laminin coated coverslips (8 DIV). Notice the presence of glial cell monolayer under motoneurons. Mixed co-culture of motoneurons ( $\alpha$ -TUJ1 positive) and glia stained with antibodies to (b) glial fibrillar acidic protein (GFAP), (c) S100 $\beta$  and (d) oligodendrocyte transcription factor (olig2) at 8–10 DIV. Bright field micrographs of C2C12 myoblast cells differentiating into myotubes (e) and differentiated myotubes stained for Myosin II (f) in red. (g) Phase contrast micrograph of mixed motoneurons and myotubes co-culture for 7–10 DIV. (h and i) NMJ formations on glass bottom Petri dishes (7–12 DIV) stained with Alexa-BTX, Myosin II and TUJ1. Scale bars: 100  $\mu$ m.

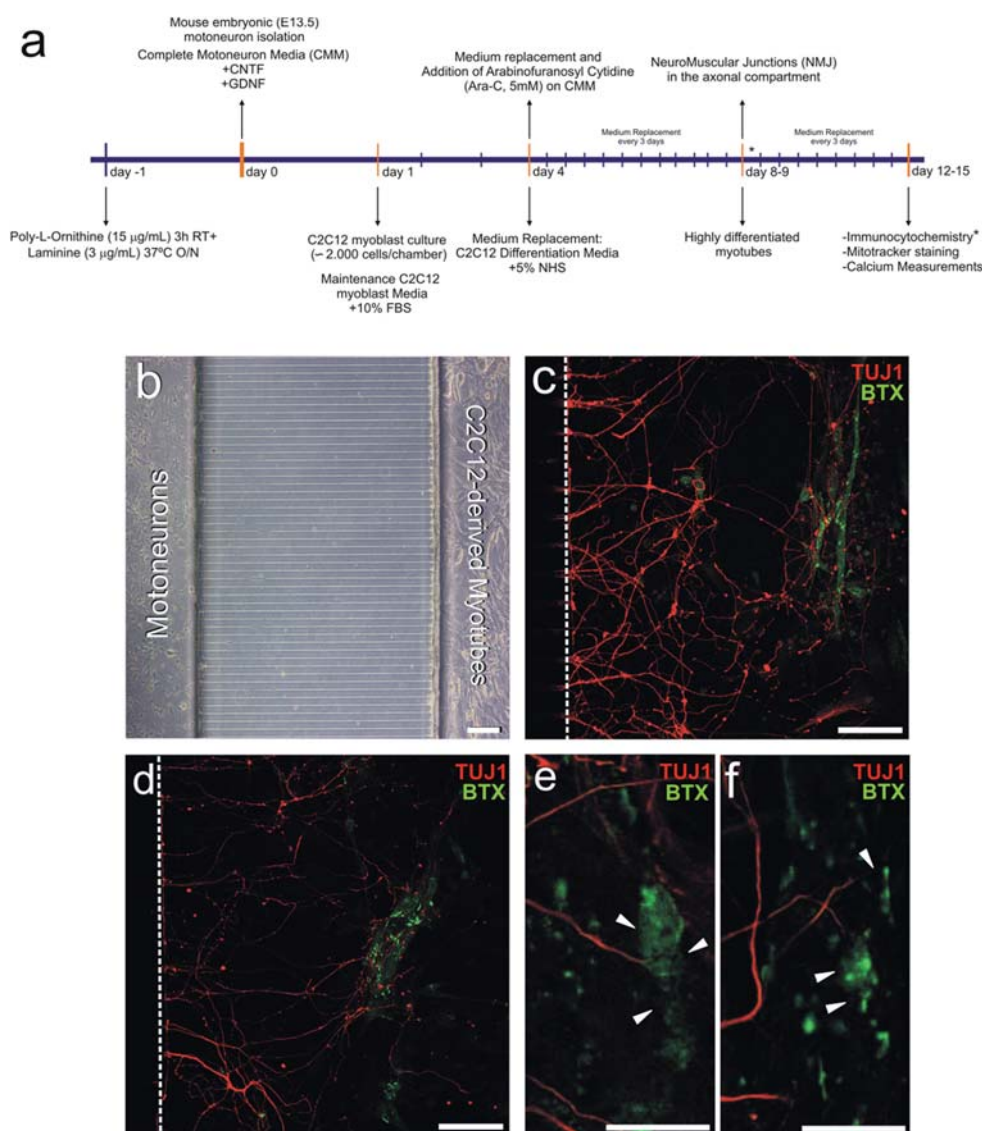
Fig. 2d) in our cultures. Nonetheless, we have noticed that motoneurons could actually improve their viability in the presence of those glial cells, which has also been previously reported.<sup>28–31</sup>

C2C12 myoblast cell line is commonly used as a simplified model for studying muscular system since myoblast can be induced to form myotubes (Fig. 2e). A C2C12 myoblast to myotube differentiation protocol was optimized to characterize the differentiation process and to define the differentiation timing in a standard culture plates for later establishment of the co-culture in our chips. As observed in Fig. 2f, matured and elongated differentiating myotubes from C2C12 cells express Myosin II. Once both cell cultures were optimized separately, we performed co-cultures testing in glass-bottomed Petri dishes ( $\varnothing = 12$  mm). Fig. 2g shows bright-field micrograph of co-cultured condition showing two differentiated myotubes in proximity of several motoneurons. Motoneurons typically extend their axons over differentiated myotubes after 7 to 10 days culture *in vitro*. To demonstrate that axons and

myotubes established synaptic connections, we performed Alexa Fluor 488-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin (BTX) staining. BTX has high affinity to the  $\alpha$ -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor allowing for an accurate indication of NMJ formation. Microscopic observations of Alexa-BTX treated cultures showed the connections in mixed conditions by detecting the clusters of positive staining of BTX in identified myotubes (Fig. 2h and i).

#### Viable co-culture and formation of NMJ in compartmentalized PDMS chips

Compartmentalized, fluidically-isolated microfluidic devices enable the cultures of motoneurons and C2C12 cells in two separated compartments connected by motoneuron axons. Highly reproducible co-cultures were established following the strict timeline protocol shown in Fig. 3a. Motoneurons and differentiating C2C12-derived myotubes showed their typical morphologies and with high viabilities when cultured in our microfluidic devices (Fig. 3b). In addition, after 7 days *in vitro*



**Fig. 3** NMJ formation in compartmentalized microfluidic devices. (a) Timeline for establishing the co-culture of motoneurons and myotubes in chip. (b) Phase contrast image of motoneurons (left) and C2C12 differentiating cells (right) in the separated compartments of a microfluidic device 5–6 DIV. (c and d) Fluorescence micrographs of the co-culture in myotube compartment. After 12–15 DIV, the co-cultures showed a significant motoneuron axon outgrowth (TUJ1-positive) and connected with C2C12-derived myotubes establishing synapses (Alexa-BTX staining). (e and f) High magnification micrographs showing the motoneuron axons contacting with NMJs on myotubes visualized by Alexa-BTX (arrowheads). Scale bars: (b) 200  $\mu\text{m}$ . (c) and (d) 100  $\mu\text{m}$ , (e) and (f) 20  $\mu\text{m}$ .

culture, some of myotubes started to beat spontaneously in our chip (ESI Video 1 $\dagger$ ).

Motoneurons were seeded in somal compartment 1 day before seeding C2C12 myoblasts in counter compartment. 4 days later, Ara-C was added to complete motoneuron media (CMM), to decrease excessive glial proliferation. Despite the addition of essential growth factors to the CMM, the presence of those glial populations seems to be important for the maintenance of a healthy motoneuron culture. We have observed that when glial growth was blocked early (up to 24 h) after plating motoneurons, the culture quality was largely compromised (data not shown). After approximately 6–7 DIV, axons from the

somal compartment reached the axonal compartment. At the same time, C2C12 cells began to differentiate. Finally, after 2 to 3 more days, the distal axons reached matured myotubes forming NMJs, comparable to what we observed previously in the mixed co-culture condition (Fig. 2). In order to improve both motoneuron survival and number of crossing axons, additional neurotrophins, BDNF and HGF, were added to CNTF and GDNF. The presence of these four neurotrophins has rendered a large number of axons crossing the microchannels (ESI Fig. 2a, b, and d $\dagger$ ). Furthermore, we aimed to determine whether inhibitory molecules such as the class-3 secreted semaphorin 3A (Sema3A) may also affect motoneuron axonal growth. It has

been demonstrated that *Sema3A* impairs the growth of motoneuron axons.<sup>32,33</sup> Experimentally, when *Sema3A* ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was added in the culture media we observed that axon growth was largely impeded and their entrance to the myotube compartment was significantly reduced compared to control experiments (ESI Fig. 2c and d†).

Then, in order to determine whether transport processes, such as the organelle axonal transport occurs in chip culture, mitochondria were labelled with Mitotracker (ESI Fig. 3†). Results indicate the presence of Mitotracker-labelled mobile mitochondria along the axons inside the microchannels suggesting that normal axonal transport along the axon of motoneurons is maintained.

Next, to illustrate the synapse contacts resulted in the formations of functional NMJs in chip, we used Alexa-BTX staining (Fig. 3c and d) to identify AChR clusters on myotubes. High magnification micrographs in Fig. 3e and f show two examples of confirmed neuromuscular synapse-like formations. We have identified several endings of axons interacting with myotubes forming a well-defined AChR clusters (indicated by arrow heads in Fig. 3e and f).

#### Intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) transients in C2C12 myotubes after potassium chloride (KCl) incubation in cultured motoneurons in compartmentalized chips

We also aimed to test whether synapse transmission occurred in our chip. Thus, we performed an analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  transients in differentiated myotubes *via* incubation with Fluo-4 AM when motoneurons were stimulated with 100 mM KCl.

First, as control experiments, we analyzed how  $\text{Ca}^{2+}$  transients were evoked directly by depolarization using 100 mM KCl in the C2C12-derived myotubes 8–10 DIV after differentiation. As illustrated in Fig. 4a and b, KCl triggers a noticeable synchronous and fast intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase in myotubes. In fact, this localized  $\text{Ca}^{2+}$  increase in the myotubes was transient and showed a  $\text{Ca}^{2+}$  spike lasting a short duration and the fluorescence levels returned to baseline after 3 to 4 minutes as expected. We noticed that not all the myotubes responded equally to the KCl stimulation (*i.e.*, exhibiting different levels of fluorescent intensity) but all responses were synchronous. Next, to confirm the absence of putative diffusion of KCl to the C2C12 reservoir, 100 mM KCl was added to the soma compartment (without motoneurons) and the  $\text{Ca}^{2+}$  transients in C2C12 plated in the second reservoir were analysed (ESI Video 2†). As expected, C2C12 myotubes growing in the axonal compartment showed a basal asynchronous activity that was not modified by the addition of KCl in the somal compartment demonstrating that compartmentalized chambers showed fluidic isolation. Due to the characteristics of high fluidic resistance in microchannels, a volume difference of the two compartments (higher fluid level in axonal compartment) induces a slow, but sustained, laminar net flow of fluid from axonal compartment to somal compartment through the microchannels without substantial modification of the composition in somal compartment. The net flow impairs the diffusion phenomena from somal to axonal compartment as also reported.<sup>24</sup>

After we confirmed the positive response of C2C12 myotubes from direct stimulation by KCl and the fluidic isolation of the chambers, we induced the depolarization of the motoneurons cultured in the somal compartment with 100 mM KCl and recorded the fluorescent intensity change in myotube compartment (Fig. 4c and d). Fig. 4c shows the  $\text{Ca}^{2+}$  level of a myotube (labelled ROI 1) slowly increased with time and sustained at an elevated level for 15 minutes before the intensity level fell down again. However, the other two myotubes (indicated by ROI's 2 and 3) in the same optical field were not observed to display any fluorescence intensity change. Finally, as a positive control, we added 100 mM KCl directly to the myotube compartment, and instantaneously, all the studied myotubes quickly responded synchronous to the direct KCl stimulation (Fig. 4c, at 32 minutes). Thus, we can conclude that fluorescence changes observed from myotube (labelled ROI 1) was not an artefact. In fact, the ROI 1 myotube was closer to the microchannel exits and it was very likely that ROI 1 myotube form NMJs with an axon from somal compartment and the other two myotubes did not form connections. This prolonged, elevated fluorescent signal increase has also been observed in other repeated experiments (data not shown). Moreover, this KCl activation was specific since the addition of TTX ( $2 \mu\text{M}$ ) after KCl stimulation strongly decreased the evoked  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered fluorescence in C2C12 myotubes (Fig. 5).

## Discussion

In this work, we have presented a modified compartmentalized microfluidics cell co-culture platform for generating robust and functional NMJ formations for further neurobiological studies. Using the present open chamber microfluidic setup has following advantages: (1) it provides improved nutrient and gas exchange to cell cultures with much more efficiency than cells growing under restricted environments such as inside a microchannel with a limited nutrient supply (*e.g.*, see ESI Table 1†). (2) The open chamber enables simple manipulations to the cell culture, such as media exchange or introducing drugs, toxins or pharmacological reagents without the need of an external pump. (3) The cell culture area can be easily modified “on demand” by using different sizes of commercially available hole-punchers or cutters.

Our modified culture devices have two wells of 12 mm in diameter, which have the same dimension to those microplates commonly used in biological laboratories from several companies (Nunc, Costar, WPI, *etc.*). This macro cell culture format can be quite important when culturing certain sensitive cell types, such as primary cortical neurons, neural stem cells or induced pluripotent stem cells allowing them to differentiate. At the same time, modification of the microstructure of the design (*i.e.*, geometry of microchannels) can be easily attained to suit particular experimental applications. For instance, in our experiments the compartmentalization of the motoneurons is accomplished due to the small openings of microchannels.<sup>24</sup> Similarly, if we were interested to study the behaviour of low number of axons, we would be able to isolate those axons by reducing the dimension and the number of microchannels



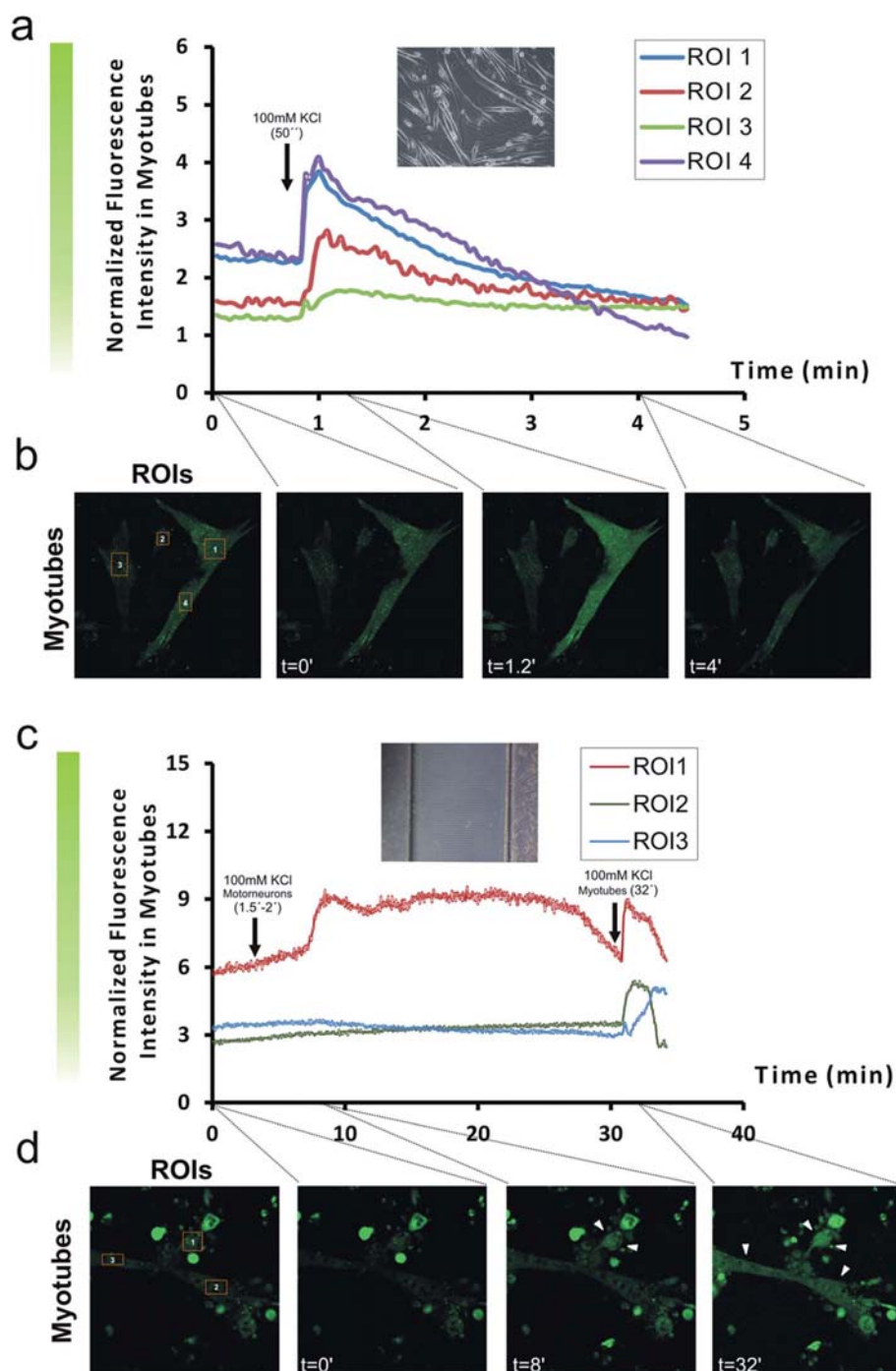


Fig. 4  $\text{Ca}^{2+}$  transient generation in motoneuron–myotube co-cultures. (a) Control experiment of C2C12 myotubes quickly synchronous responded to KCl (100 mM) stimulation ( $t = 50''$ , arrow) resulting  $\text{Ca}^{2+}$  transient peaks (at  $t = 1.2'$ ) after the treatment. (b) Micrographs representing three time courses of the control experiment ( $t = 0'$ ,  $t = 1.2'$ ,  $t = 4'$ ). At  $t = 4$  minutes, the elevated fluorescence intensities have all reached basal level. Note, first micrograph shows the ROI distribution used for the analysis in (a). (c) KCl (100 mM) stimulation on the motoneuron compartment induces  $\text{Ca}^{2+}$  transient in the C2C12-derived myotubes. Notice that we only observed an increase in the  $\text{Ca}^{2+}$  transient in the myotubes with functional connection with motoneuron axon (indicated by ROI 1). After addition of the KCl ( $t = 1.5\text{--}2'$ , arrow), we observed a slow, gradual increase in the relative fluorescent intensity that reached a plateau after 8 minutes and sustained at the elevated level for 15 minutes. At  $t = 30'$ , the sustained  $\text{Ca}^{2+}$  transient returned to baseline. (d) Micrographs representing three time courses of the actual experiment ( $t = 0'$ ,  $t = 8'$ ,  $t = 32'$ ) as indicated in the x-axis in (c). At  $t = 32'$ , myotube culture chamber was directly stimulated with KCl (100 mM, arrow). Note, the first micrograph shows the ROI distributions used for the analysis in (c). Arrow heads indicate the myotubes that form functional connections with axons and maintained a sustained increase of  $\text{Ca}^{2+}$ . Fluorescent intensity levels were normalized by the background fluorescent noise.

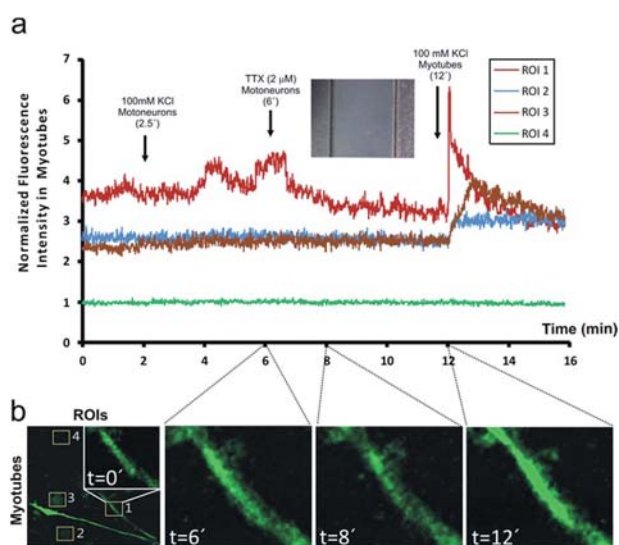


Fig. 5 TTX treatment reduces  $\text{Ca}^{2+}$  transient intensity in motoneuron–myotube co-culture in chip. (a) Motoneuron compartment was stimulated with 100 mM KCl at  $t = 2.5$  min as shown in Fig. 4 (arrow). TTX was added at  $t = 6$  min (arrow) to the KCl-treated motoneurons. Finally another dose of 100 mM KCl was added at  $t = 12$  min (arrow) in the C2C12 compartment. The graph shows the responses from the connected myotube (ROI 1), the unconnected myotubes ROI's 2 and 3, and the background ROI 4. The fluorescent intensity level was normalized to background noise. (b) Zoom-in micrographs of connected myotubes (ROI 1) responses at  $t = 0$ , 6, 8, and 12 min. Note, the first micrograph also shows the ROI distributions used for the analysis.

without additional changes in the culture conditions (ESI Fig. 1†). In some circumstances, a low number or single isolated axons can be valuable in interrogating some particular issues that yet to be solved due to the lack of specific tools. For example, it would be interesting to explore single axons electrical responses comparing to the group axons responses *in vitro*.<sup>34–36</sup> Another interesting application of single axon isolation is the possibility to trace organelle or molecule transports in a low number of axons improving optical resolution and analysis. In addition, the resulting pre-determined linear track and direction of transport enables a more accurate and easier way of quantification (ESI Fig. 3†).

*In vitro* methods to generate neuromuscular junction formation to study spinal or muscular diseases are typically mixed cultures performed in a common plate with motoneurons and muscle cells receiving the same media. However, this type of co-culture system do not fully mimic the *in vivo* NMJ condition as those cell types are in different extracellular matrix environments and connected by peripheral nerves. Using an open chamber, compartmented, fluidically controlled isolation microdevice, we have successfully cultured those two cell types in separated compartments and receiving individual distinct culture media and joined solely by axonal processes. We have established a robust culture protocol to generate healthy, long-term survival of the cell co-cultures in chip (up to 4 weeks). Furthermore, NMJ formation in differentiated myotubes was

verified by the positive staining of Ach receptors *via* imaging though Alexa-BTX staining.

In addition, myotubes were able to form spontaneous contractions in our culture chips (ESI Video 1†). This was further modulated by the generation of  $\text{Ca}^{2+}$  transient in cultured myotubes after KCl stimulation of motoneurons. KCl treatment triggers motoneurons to release neurotransmitters which induces  $\text{Ca}^{2+}$  transient in the connected myotubes. From our control experiments, where myotubes were directly stimulated with KCl, we observed the duration of  $\text{Ca}^{2+}$  changes lasted less than 1 minute. This instantaneous and transient  $\text{Ca}^{2+}$  changes for myotubes stimulation was commonly observed. However, when KCl stimulation applied to motoneurons, we have observed the prolonged  $\text{Ca}^{2+}$  response (more than 15 minutes) in the myotube compartment. To rule out the possibility of sustained  $\text{Ca}^{2+}$  influx was triggered by the diffused KCl from motoneuron compartment, we have conducted a detailed diffusion experiments (Fig. 5). In addition, not all analyzed myotubes respond in the same way, indicating a specific effect of the KCl stimulation in particular motoneurons. Furthermore, the application of TTX on the motoneuron compartment resulted in diminishment of the fluorescent signal in myotube which was initially evoked by KCl stimulation on motoneurons (Fig. 5). Hence, the sustained elevated  $\text{Ca}^{2+}$  signals of the myotubes were caused by the specific stimulation from motoneurons. In fact, a protracted  $\text{Ca}^{2+}$  transient phenomenon has also been reported in striatal neurons and other cells when they were exposed directly to nitric oxide.<sup>37</sup>

## Conclusions

In conclusion, we have presented here an open microfluidic cell culture platform for the application of co-culture of motoneuron and C2C12-derived muscle cells aiming for generating a robust *in vitro* model of NMJ formations. Furthermore, we have shown to be able to manipulate a single cell population, *i.e.*, motoneurons, and have proven the functional response *via*  $\text{Ca}^{2+}$  live imaging. Our modified macro-well microfluidic device will be especially useful for culturing environmental sensitive cells such as neurons and neural stem cells. Furthermore, with a simple modification of the design, we can set up a more sophisticated co-culture platform to study more complex neuron interactions.

## Acknowledgements

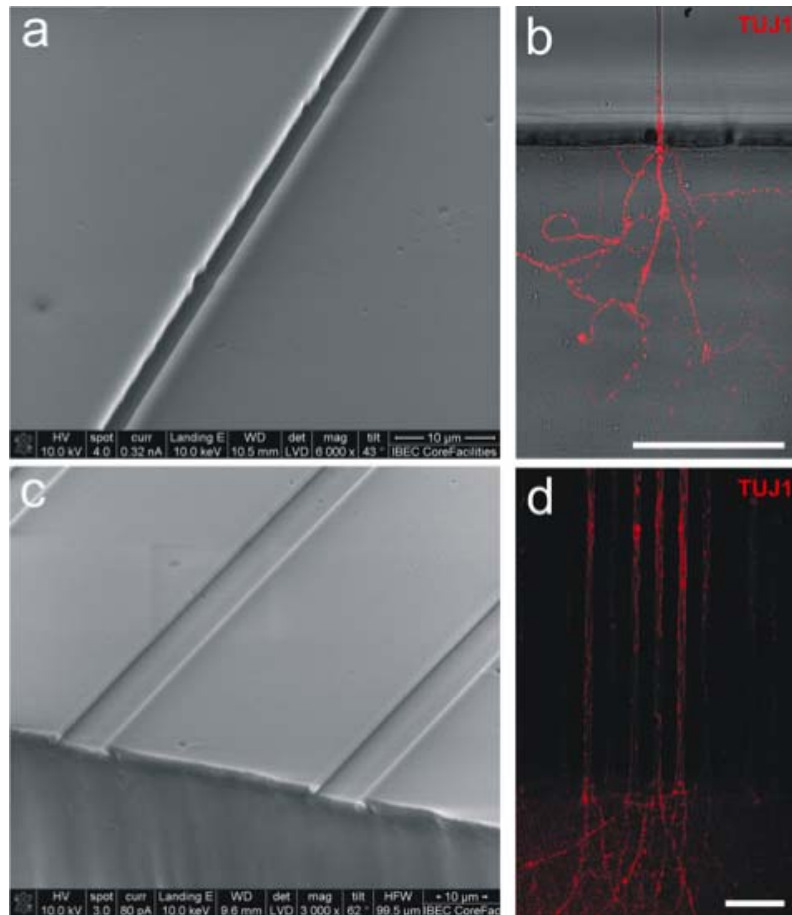
The authors thank Asumpció Bosch (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Autonomous University of Barcelona) for technical support on motoneuron culture. The authors also thank David Izquierdo and Juan Manuel Alvarez from IBEC Nanobioengineering group and Miriam Segura From Molecular and Cellular Neurobiotechnology group to their technical assistances and Tom Yohannan for linguistic advice. The authors would also thank IBEC Nanotechnology Platform staff for their generous help. This research was supported by the Botin Foundation (JS), Seventh Framework Programme of the European Commission, grant agreement 222887 FP7-PRIORITY

(JADR), the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2012-32617) (JADR), CIBERNED (2014/02) (JADR), the Fundació Vasca de Innovació e Investigació Sanitàries (BIO12/AL/004) (JADR) and the Generalitat de Catalunya (SGR2012-1218) (JADR), La Caixa Obra Social Foundation (LCOSF) (JS and JADR), the Instituto de Salud Carlos III (PI11/03028) and the Marato TV3 Foundation (JADR). CIBER-BBN Plan 2008–2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program to JS. OS was supported by MINECO, IBEC (Strategic Research Initiative program founded by LCOSF) and CIBERNED. The Nanobioengineering group has also supported from the Commission for Universities and Research of the Department of Innovation, Universities, and Enterprise of the Generalitat de Catalunya (SGR2012-1442).

## References

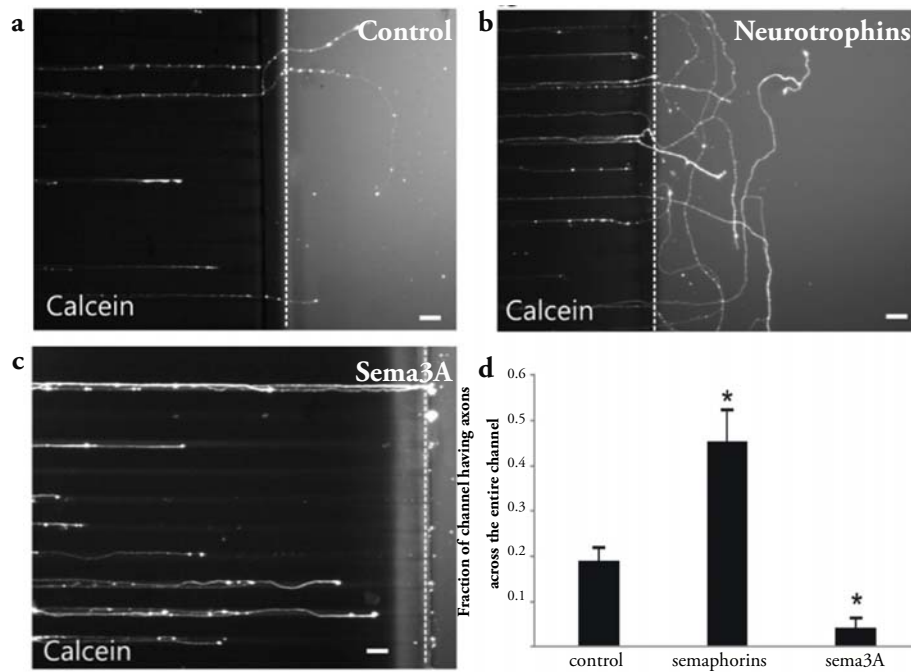
- 1 P. L. Cheng and M. M. Poo, *Annu. Rev. Neurosci.*, 2012, **35**, 181–201.
- 2 A. P. Barnes and F. Polleux, *Annu. Rev. Neurosci.*, 2009, **32**, 347–381.
- 3 A. C. Horton and M. D. Ehlers, *Neuron*, 2003, **40**, 277–295.
- 4 L. de la Torre-Ubieta and A. Bonni, *Neuron*, 2011, **72**, 22–40.
- 5 C. G. Dotti and M. M. Poo, *Nat. Cell Biol.*, 2003, **5**, 591–594.
- 6 B. DuBoff, M. Feany and J. Gotz, *Trends Neurosci.*, 2013, **36**, 325–335.
- 7 P. H. Reddy, *Brain Res.*, 2011, **1415**, 136–148.
- 8 A. H. Schapira, V. M. Mann, J. M. Cooper, D. Krige, P. J. Jenner and C. D. Marsden, *Ann. Neurol.*, 1992, (32 Suppl.), S116–S124.
- 9 S. Boillee, C. Vande Velde and D. W. Cleveland, *Neuron*, 2006, **52**, 39–59.
- 10 F. Palau, A. Estela, D. Pla-Martin and M. Sanchez-Piris, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2009, **652**, 129–137.
- 11 D. Y. Lu, C. H. Tang, W. L. Yeh, K. L. Wong, C. P. Lin, Y. H. Chen, C. H. Lai, Y. F. Chen, Y. M. Leung and W. M. Fu, *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, **613**, 146–154.
- 12 A. M. Taylor, N. C. Berchtold, V. M. Perreau, C. H. Tu, N. L. Jeon and C. W. Cotman, *J. Neurosci.*, 2009, **29**, 4697–4707.
- 13 J. M. Peyrin, B. Deleglise, L. Saias, M. Vignes, P. Gougis, S. Magnifico, S. Betuing, M. Pietri, J. Caboche, P. Vanhoutte, J. L. Viovy and B. Brugg, *Lab Chip*, 2011, **11**, 3663–3673.
- 14 U. Hengst, A. Deglincerti, H. J. Kim, N. L. Jeon and S. R. Jaffrey, *Nat. Cell Biol.*, 2009, **11**, 1024–1030.
- 15 J. Park, H. Koito, J. Li and A. Han, *Lab Chip*, 2012, **12**, 3296–3304.
- 16 E. Park, J. D. Bell and A. J. Baker, *Can. Med. Assoc. J.*, 2008, **178**, 1163–1170.
- 17 P. Shi, M. A. Scott, B. Ghosh, D. Wan, Z. Wissner-Gross, R. Mazitschek, S. J. Haggarty and M. F. Yanik, *Nat. Commun.*, 2011, **2**, 510.
- 18 T. T. Kanagasabapathi, P. Massobrio, R. A. Barone, M. Tedesco, S. Martinoia, W. J. Wadman and M. M. Decre, *J. Neural. Eng.*, 2012, **9**, 036010.
- 19 T. T. Kanagasabapathi, K. Wang, M. Mellace, G. J. Ramakers and M. M. Decre, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 2009, pp. 1655–1658.
- 20 M. Das, J. W. Rumsey, C. A. Gregory, N. Bhargava, J. F. Kang, P. Molnar, L. Riedel, X. Guo and J. J. Hickman, *Neuroscience*, 2007, **146**, 481–488.
- 21 M. Das, J. W. Rumsey, N. Bhargava, M. Stancescu and J. J. Hickman, *Biomaterials*, 2010, **31**, 4880–4888.
- 22 H. S. Park, S. Liu, J. McDonald, N. Thakor and I. H. Yang, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 2013, pp. 2833–2835.
- 23 K. A. Southam, A. E. King, C. A. Blizzard, G. H. McCormack and T. C. Dickson, *J. Neurosci. Methods*, 2013, **218**, 164–169.
- 24 A. M. Taylor, M. Blurton-Jones, S. W. Rhee, D. H. Cribbs, C. W. Cotman and N. L. Jeon, *Nat. Methods*, 2005, **2**, 599–605.
- 25 R. B. Campenot, *Methods Enzymol.*, 1979, **58**, 302–307.
- 26 M. Arundell, V. H. Perry and T. A. Newman, *Lab Chip*, 2011, **11**, 3001–3005.
- 27 J. Park, J. Li and A. Han, *Biomed. Microdevices*, 2010, **12**, 345–351.
- 28 M. C. Bohn, *Exp. Neurol.*, 2004, **190**, 263–275.
- 29 M. Sendtner, Y. Arakawa, K. A. Stockli, G. W. Kreutzberg and H. Thoenen, *J. Cell Sci., Suppl.*, 1991, **15**, 103–109.
- 30 G. M. Gilad, V. H. Gilad, D. Dahl and A. Bignami, *Brain Res.*, 1988, **458**, 249–260.
- 31 A. R. Taylor, M. B. Robinson and C. E. Milligan, *Nat. Protoc.*, 2007, **2**, 1499–1507.
- 32 R. J. Pasterkamp, F. De Winter, R. J. Giger and J. Verhaagen, *Prog. Brain Res.*, 1998, **117**, 151–170.
- 33 R. J. Pasterkamp, R. J. Giger and J. Verhaagen, *Exp. Neurol.*, 1998, **153**, 313–327.
- 34 E. Claverol-Tinture, J. Cabestany and X. Rosell, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2007, **54**, 331–335.
- 35 R. Morales, M. Riss, L. Wang, R. Gavin, J. A. Del Rio, R. Alcubilla and E. Claverol-Tinture, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1896–1905.
- 36 L. Wang, M. Riss, J. O. Buitrago and E. Claverol-Tinture, *J. Neural. Eng.*, 2012, **9**, 026010.
- 37 T. F. Horn, G. Wolf, S. Duffy, S. Weiss, G. Keilhoff and B. A. MacVicar, *FASEB J.*, 2002, **16**, 1611–1622.
- 38 G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang and D. E. Ingber, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2001, **3**, 335–373.

## Supplementary

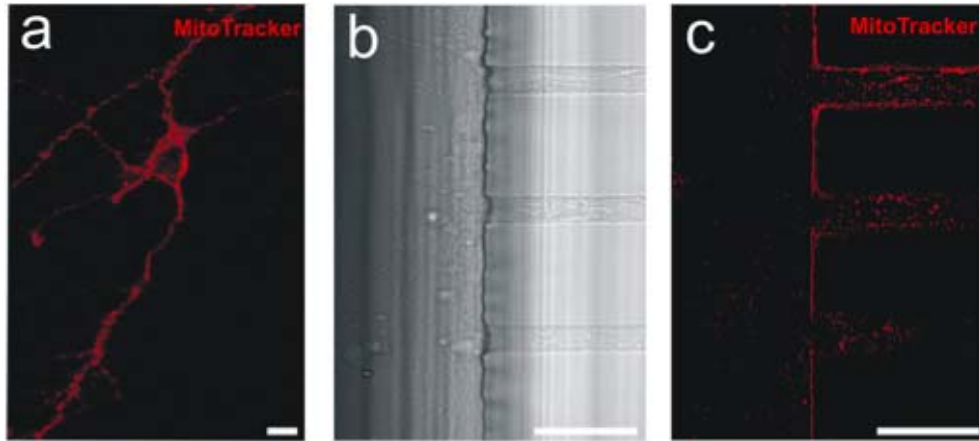


**Figure S1.** Comparison of motoneurons growing on 2  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  wide microchannel chips. Characterization of 2  $\mu\text{m}$  wide (a) and 10  $\mu\text{m}$  wide (c) microchannels via SEM imaging. Neuronal Class III  $\beta$ -Tubulin (TUJ1) staining of axons exiting in 2  $\mu\text{m}$  wide (b) and 10  $\mu\text{m}$  wide (d) microchannels. Scale bars: (b) 20  $\mu\text{m}$ , (d) 100  $\mu\text{m}$ .





**Figure S2.** Effect of neurotropic factors and Semaphorin 3A on motoneuron axon growth. Representative micrographs of axonal growth in: normal motoneuron growth media which contains growth factors of CNTF and GDNF (a), additional neurotropic factors of BDNF and HGF (b), and the addition of Sem3A to the growth media (c). Pictures were taken 7 days after the initial cell seeding. Fractions of channels having axons across the entire channel under each condition are calculated and plotted. Asterisk denotes statistically significant by Student t-test (\*  $P < 0.01$ ) comparison to control. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure S3.** Comparison of mitochondria imaging on petridish and on chip. MitoTracker Deep Red FM was used for live cell staining of mitochondria in petridish (a) and on chip with 10  $\mu\text{m}$  wide microchannels (c). Figure b shows bright field image of axons entering the 10  $\mu\text{m}$  wide microchannels (b). Scale bars (a): 200  $\mu\text{m}$ ; (b, c): 50  $\mu\text{m}$ .

<b>Author (paper)</b>	<b>Cell Culture</b>	<b>Main applications</b>
<i>Taylor et al, 2003</i>	Rat cortical neurons	Coupled with microcontact printing technique to study guided axon growth
<i>Taylor et al, 2005</i>	Rat and mouse cortical hippocampal neurons, postnatal rat pups oligos.	Isolated axonal mRNA study axonal injury and regeneration.
<i>Liu et al, 2008</i>	Rat sympathetic neurons, kidney epithelial, PVR strains	Analysis of neuron-to-cell transmission and viral transport in axon
<i>Park et al, 2008</i>	Rat cortical neurons	Analysis of axon regeneration focusing on the inhibitory protein Nogo-66 and MAG
<i>Hengst et al, 2009</i>	Rat dorsal root ganglia and dorsal spinal commissural neurons	Elucidating the mechanism for local protein translation in axonal outgrowth (PAR complex)
<i>Arundell et al, 2011</i>	PC12, SH-SY5Y, cortical neurons	Demonstration of the new method of creating macro/micro cocultured platform
<i>Kanagasabapathi et al, 2012</i>	Rat cortical and thalamic neurons	Coupled with microelectrode arrays (MEA) for spontaneous electrical activity recording
<i>Southam et al, 2013</i>	Rat spinal motor neurons, rat hind-limb muscles, rat spinal glial cells	Co-culture of motoneuron and muscle cells to establish neural muscular junction
<i>Park et al, 2013</i>	Mouse ESCs and mouse myoblasts (C2C12)	Co-culture of ESC derived motoneurons and myoblasts

**Table S1.** Summary of recently published studies using microfluidic chip for neuron cultures, especially targeting for axon isolations. Note: W=width, H=height, L=length, c=cell culture area, m=microchannels, W<sub>c</sub>, H<sub>c</sub>, L<sub>c</sub> denote the dimensions of cell culture area, and have units of (mm); W<sub>m</sub>, H<sub>m</sub>, L<sub>m</sub> denote the dimensions of microchannels and have units of (μm). n/a=data not available.





# DISCUSIÓN





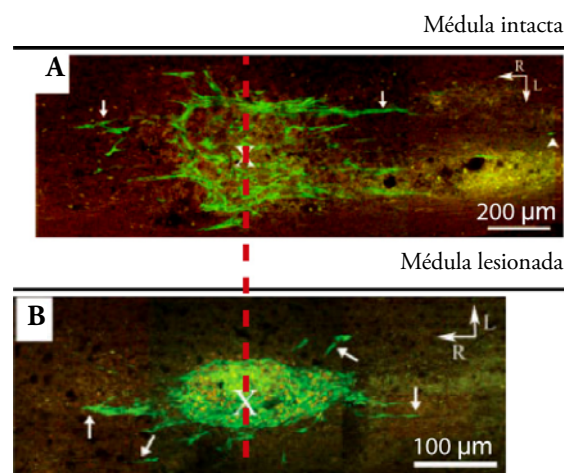
## I. Modulación de las propiedades migratorias de las células de la glia envolvente olfatoria.

### Propiedades migratorias de la glia envolvente olfatoria.

Las lesiones del CNS son muy complejas, por lo cual el tratamiento de las mismas no se debe enfocar en bloquear solo un mecanismo de lesión, para promover la regeneración axonal. Esto conlleva que el número de axones regenerados tras los diversos tratamientos es bajo y, además, la respuesta regenerativa entre las diferentes poblaciones neuronales (p.e. tracto espinal) a una droga particular o tratamiento farmacológico no es idéntico (David and Lacroix, 2003). Esto provoca que una simple manipulación del entorno inhibitorio no sea suficiente para obtener una regeneración axonal funcional óptima. Así es como, estamos frente a un problema multifactorial que requiere una aproximación adaptada a su complejidad.

Las OECs juegan un papel clave en el reclutamiento y la orientación de los axones olfatorios, como también se ha demostrado que ayudan al crecimiento de neuritas *in vitro* (Kafitz and Greer, 1999; Sonigra et al., 1999). Varios estudios han confirmado que el uso de las OECs en las lesiones de la médula espinal promueve la regeneración axonal después de su tratamiento terapéutico. La evidencia de regeneración anatómica (Franklin et al., 1996; Li et al., 1997; Li et al., 1998; Imazumi et al., 2000; Nash et al., 2002) y mejoría funcional (Li et al., 1998; Ramón-Cueto et al., 1998; Ramón-Cueto et al., 2000; Lu et al., 2001; Lu et al., 2002; Lopez-Vales et al., 2006) se ha observado en una variedad de modelos de reparación de la médula espinal, incluyendo la transección completa, hemisección, lesión de tracto espinal, contusión y desmielinización.

El trasplante de OECs es una terapia celular prometedora para lesiones medulares, no obstante, la terapia basada en el uso de las células de la glía envolvente olfatoria posee una serie de problemas que la llevan a tener resultados variables y contradictorios entre sí, dados por: (i) la complejidad inherente del problema regenerativo, como tal, y sus múltiples variables involucradas (p.e. receptores, ligandos) (Thuret et al., 2006); (ii) las células trasplantadas presentan una alta tasa de muerte celular en el huésped producto de la excitotoxicidad de la zona lesionada, como también en la región de penumbra. Por ello, el número de células por trasplante debe ser elevado 150.000-200.000 (Guntinas-Lichius et al., 2001; Tabakow et al., 2013); (iii) la capacidad migratoria de las OECs es limitada en la zona de lesión dependiendo de la región de trasplante y del grado de excitotoxicidad del ambiente extracelular conllevando resultados variables tras su aplicación (Collazos-Castro et al., 2005; Deng et al., 2006; Gudino-Cabrera et al., 2000); y (iv) bajo número de estudios exitosos sobre elaboración matrices biocompatibles para la promoción de migración celular y recrecimiento axonal en modelos de lesión del SCN (Straley et al., 2010).



**Figura 24. Migración OECs *in vivo*.** Ejemplo de migración de las células de la glia envolvente olfatoria tras 7 días de trasplante en una médula espinal (a) intacta y (b) lesionada. *From Deng et al. 2006.*

Algunos reportes indican que las OECs migran largas distancias desde el punto de inyección tras su trasplante (Ramon-Cueto et al., 1998; Resnick et al., 2003), no obstante, diversos estudios denotan que el marcaje utilizado (p.e Hoesch o Fast blue), no es fiable para rastrear las células trasplantadas debido a que se genera difusión inespecífica del marcador (Iwashita et al., 2000; Ruitenberg et al., 2002). Otros estudios han pre-etiquetado las OECs con partículas paramagnéticas de óxido de hierro que permiten la visualización de las células *in vivo* por resonancia magnética, sin embargo, existe un factor de error que viene otorgado por la captación de las OECs pre-marcadas muertas que son fagocitadas por macrófagos (Dunning et al., 2004; Lee et al., 2004).

Estudios que utilizan OEC-eGFP revelan que después de la lesión, de forma inequívoca, que las células trasplantadas no migran a través del epicentro de la lesión, ni tampoco grandes distancias desde el sitio de la lesión (Boyd et al., 2004; Li et al., 2004b; Lu et al., 2006a; Ruitenberg et al., 2002). Deng y cols. han indicado que tanto OECs de ratas, como humanas presentan similar migración después de la inyección en médula torácica, sin embargo, es importante destacar que, OECs tanto de ratas, como humanas migran distancias más cortas, en ambas direcciones rostral y caudal, en animales con médulas lesionadas con una hemisección contralateral concomitante (Deng et al., 2006). Smale y cols. han reportado una migración celular no significativa cuando OECs de bulbo olfativo de rata fetal se trasplantan en el cerebro de ratas adultas dañadas (Smale et al., 1996). También, se ha demostrado que las OECs trasplantadas migran menores distancias en médulas lesionadas en comparación a los controles (médulas no lesionadas) (Collazos-Castro et al., 2005; Gudino-Cabrera et al., 2000). Estos resultados se han confirmado en experimentos de xenoinjertos utilizando OECs de ratones GFP (Ramer et al., 2004b). No obstante, los mecanismos específicos que subyacen sobre la reducción de la migración de las OECs en lesiones del CNS siguen siendo, en su mayoría, desconocidos.

Diversos estudios indican que las propiedades regenerativas de las OECs parecen estar ligadas en gran medida a su dinámica de migración (Rolloff et al., 2013; Wang and Huang, 2012), esto ha

llevado a un gran interés por la mejora de la capacidad migratoria y la supervivencia de las OECs después de trasplante. De hecho, se ha informado en diversos estudios que una mayor capacidad migratoria de las OECs representa mejores propiedades regenerativas (Boyd et al., 2004; Lu et al., 2006a; Ramon-Cueto et al., 1998; Resnick et al., 2003).

Pocos factores han sido descritos como capaces de modular funcionalmente la migración de las OECs, entre ellos se incluyen: GDNF, fibulina-3, slit-2 y Nogo-A (Cao et al., 2006; Huang et al., 2011; Su et al., 2007; Vukovic et al., 2009). De hecho, todas las moléculas que inhiben la migración de las OECs se ha informado son sobreexpresadas en las cicatrices después de la lesión y actúan como inhibidores del crecimiento axonal.

El primer factor identificado como modulador de la migración de las OECs fue GDNF (Cao et al., 2010). Las OECs expresan y secretan GDNF, como también su receptor. Este factor estimula la formación de ondas lamelipodiales periféricas que resultan en un aumento de los contacto célula-célula y una consecuente migración mediada por contacto. GDNF se ha demostrado que promueve la migración de las OECs tanto *in vitro* como *in vivo* (Cao et al., 2006). Este factor actúa a través de un complejo receptor formado por Ret y GFR $\alpha$ -1 activando JNK y conllevando un aumento en la migración de las OECs. La combinación del trasplante de OECs y la administración de GDNF se caracteriza por un aumento de las propiedades migratorias de las OECs en médulas no lesionada (Cao et al., 2006).

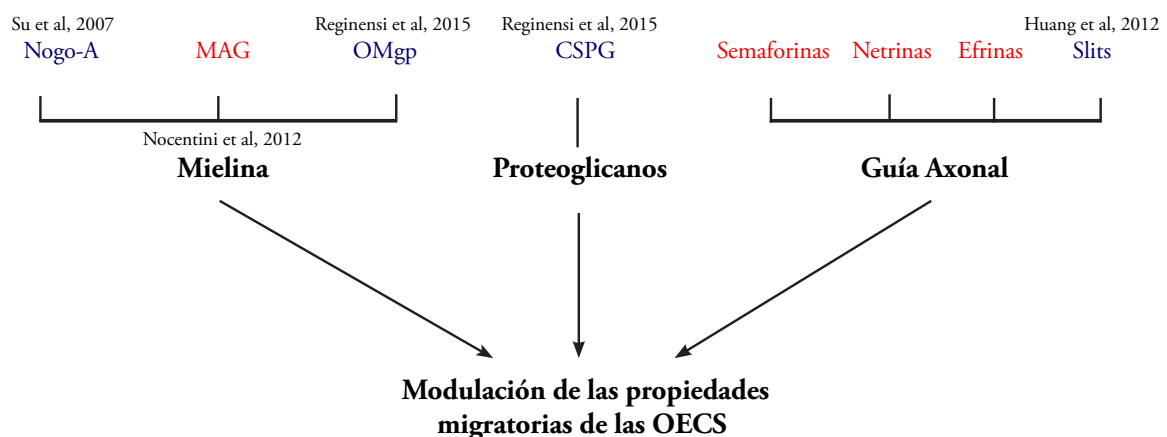
Fibulina-3 se ha demostrado que regula directamente la migración de las OECs (Vukovic et al., 2009). Su sobreexpresión mediada por virus en las OECs inhibe su migración y en su lugar promueve su proliferación celular. Esto acompañado de una disminución del crecimiento neurítico en co-cultivo de neuronas/OECs tratadas con respecto a sus controles, apoya la hipótesis de que la migración de las OECs estimula la extensión neurítica. Por otro lado, la sobreexpresión de fibulina-3 da lugar a una disminución de la capacidad de las OECs para integrarse con otros tipos celulares; considerando que una de las propiedades que hacen a las OECs un candidato atractivo para las terapias de trasplante celular en

comparación con otros tipos gliales (p.e células de Schwann) es su capacidad para asociarse libremente con otros tipos celulares, como los astrocitos (Lakatos et al., 2003).

Slit-2 se ha demostrado que modula la migración de las OECs. De hecho, el gradiente de Slit-2 por microinyección en el frente de avance celular causa colapso en el polo de dirección de movimiento y ocasiona una dinámica migratoria en la dirección opuesta (Huang et al., 2011). La exposición del extremo frontal, zona de avance celular, ante este gradiente desencadena un aumento intracelular de  $Ca^{+2}$  que conduce a la activación de cofilina, cuya actividad es responsable de la disrupción de la F-actina que conlleva el colapso de la dinámica del lamelipodio del frente de avance (Huang et al., 2011). Curiosamente, la reversión direccional y la translocación del soma son dependientes del cambio de la actividad de RhoA en la célula. De hecho, las OECs durante su proceso migratorio expresan elevada polaridad frontal, y baja polaridad posterior, debido a una reversión de la actividad de RhoA en presencia de Slit-2 (Huang et al., 2011). El mecanismo por el cual se genera la actividad de Slit-2 sigue siendo desconocido, pero un estudio reciente ha observado que Slit-2 podría inactivar Fyn. Ésta es una quinasa que forma un complejo con Robo1 sugiriendo que la desactivación de Fyn es capaz de activar RhoA a través de la señalización de Robo1 (Liu et al., 2012).

Probablemente, debido a que Slit-2 es altamente expresada en el OE, es posible que pudiese ayudar a las OECs y axones olfatorios a migrar fuera del OE mediante un mecanismo quimio-repulsivo durante el desarrollo embrionario. Slit-2 también se expresa en el OB pudiendo, quizás, estar implicado en la regulación de la dispersión topográfica de las OECs en su arribo a la superficie de la OB (Huang et al., 2011). La expresión de slit-2 tras lesión es tema de estudio, por ejemplo, Wehrle y cols. observaron que el nivel de Slit-2 no se detecta después de la lesión en la zona dañada y regiones colindantes (Wehrle et al., 2005); mientras que Liu y cols. denotaron que los niveles de expresión de Slit-2 incrementan desde el día 7 hasta el día 14, para luego retornar a sus niveles normales el día 21 post-lesión (Liu et al., 2012). Por ello, se ha propuesto que las OECs pueden tener una funciones asociadas a la estimulación de la axogénesis tanto en el desarrollo y la maduración del sistema olfatorio a medida que va envolviendo los axones en crecimiento de manera preliminar a la etapa en que emergen desde el epitelio olfatorio (Tenneth et al., 1996).

Así es posible que al igual GDNF, diversos factores guía producidos por las OECs pueden regular tanto la extensión axonal, como la migración de las OECs. Estos factores neurotróficos de orientación axonal son potenciales reguladores de la migración de las OECs e incluyen: NGF, BDNF, NT3/4, CNTF y VEGF (Au et al., 2003;



**Figura 25. Moléculas inhibitorias de la regeneración en el CNS y su efecto la migración de las OECs.** Cuadro esquemático que expone el efecto de las diversas moléculas inhibitorias del crecimiento axonal tras una lesión en el Sistema Nervioso Central (CNS) y su relación moduladora de las propiedades migratorias de las OECs. En azul, las moléculas que se ha observado un efecto sobre la migración de las OECs; en rojo, las moléculas que aún no se ha descrito hasta fecha de hoy sobre la migración de las OECs.

Boruch et al., 2001; Mackay-Sim et al., 2000; Wewetzer et al., 2002; Woodhall et al., 2001). Como también las OECs expresan receptores para muchos de estos factores y otras moléculas, incluyendo los receptores para las neurotrofinas, Trk y p75 (Au et al., 2003; de Lucía et al., 2003), el receptor de CNTF (Wewetzer et al., 2002), el receptor de FGF1 (Hsu et al., 2001), el receptor de neuregulina erbB1-2 (de Lucía et al., 2003) y el receptor de HGF c-Met (Yan et al., 2001).

### **Mielina inhibe las propiedades migratorias de la glía envolvente olfatoria.**

Para estudiar las características moleculares y celulares de la capacidad de motilidad de las OECs frente a diferentes sustratos se necesita una población homogénea de células; y si consideramos, que la mayoría de las OECs utilizadas en los estudios de regeneración axonal derivan de cultivos primarios que se caracterizan por ser bastantes variables entre sí (p.e. protocolo, metodología y fuente de obtención) y que presentan una gran cantidad de células contaminantes (p.e. células de Schwann, fibroblastos) (Au and Roskams, 2002; Richter et al., 2008) nos encontramos con un problema para estudiar las propiedades migratorias de las OECs, y por ello, es mandatorio la utilización de un cultivo homogéneo respecto a sus características morfofuncionales (Pellitteri et al., 2010).

En nuestro caso para caracterizar las propiedades migratorias de las OECs hemos utilizado una población homogénea celular a partir de una línea clonal de OECs, específica de ratas, llamada TEG3 que en animales trasplantados son capaces de sobrevivir, tras el injerto, al menos unas 10 semanas y promover la regeneración axonal (Moreno-Flores et al., 2006). Ello con el objetivo de estudiar las características migratorias de la glía envolvente tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.

En primer lugar, observamos que las TEG3 presentan los subtipos morfológicos, tipo Schwann (s-OECs) y tipo astrocitos (a-OECs), expresados en los cultivos primarios de OECs (Nocentini et al., 2012). También, caracterizamos esta línea celular mediante inmunofluorescencia y observamos la expresión de marcadores

clásicos de OECs, tales como: GFAP, S-100 y p75 (Nocentini et al., 2012). En segundo lugar, hemos descrito por primera vez que las OECs expresan todos los componentes del complejo NgR1 (NgR1, Lingo-1, p75, TROY), complejo común para las proteínas inhibitorias de la mielina. Previamente sólo se había demostrado la expresión de NgR1 y TROY (Morikawa et al., 2008; Su et al., 2007).

Complementariamente, hemos demostrado que este complejo receptor es activado por estimulación aguda de mielina conllevando un aumento en los niveles de RhoA y la fosforilación de ERK1-2 (Nocentini et al., 2012). De hecho, en neuronas, la activación del complejo NgR conduce la activación directa de RhoA, que activa secuencialmente ROCK, que provoca la reorganización y la inhibición del crecimiento axonal. Por otra parte, el aumento de las concentraciones de calcio intracelular inducido por la activación de NgR, conduce la transactivación de EGFR con la consiguiente fosforilación de ERK 1-2 (Chuderland and Seger, 2008; Koprivica et al., 2005).

Esta bien documentado que Nogo-A, MAG y OMgp son componentes importantes de la actividad inhibitoria de la mielina del CNS en la regeneración axonal (Chen et al., 2000; Habib et al., 1998; McKerracher et al., 1994). Después de una lesión de la médula espinal, mRNA Nogo-A está regulado positivamente en la zona lesionada y la proteína Nogo-A se expresa fuertemente en las fibras lesionadas (Hunt et al., 2003). Meier y cols, han determinado que la expresión de Nogo-A se regula de manera positiva después de una denervación hipocampal o por convulsiones inducidas por kainato (Meier et al., 2003).

Se ha establecido que Nogo-A disminuye significativamente la tasa migratoria de las OECs, (Su et al., 2007) lo cual nos ha sugerido que la mielina podrían ser capaces de modular la capacidad migratoria de las OECs. Por ello, en nuestro caso decidimos observar el efecto de la mielina (Nocentini et al., 2012) sobre la migración de las OECs. Con esto buscamos reforzar la idea de que la mayor parte de los factores que inhiben la elongación axonal y regeneración después de la lesión, también pueden afectar la migración de las OECs.

En nuestro caso, hemos realizado estudios *in*



*vitro*, mediante microscopía en tiempo real, de las propiedades migratorias de las OECs en presencia de diversos sustratos que se encuentran expresados en la zona lesionada (Nocentini et al., 2012). Para caracterizar las propiedades migratorias de las TEG3 se utilizó como sustrato permisivo laminina debido a que fisiológicamente es expresada en el nervio olfatorio en desarrollo (Tisay and Key, 1999). Las OECs se ha observado en experimentos *in vitro* de video microscopía en tiempo real presentan mayor dinámica migratoria en el sustrato laminina en comparación a poli-L-lisina o colágeno I (Huang et al., 2008). Mediante microscopía en tiempo real de alta resolución, hemos observado cambios morfológicos entre ambos subtipos de forma espontánea, no inducido por estímulos ambientales. Ello confirma que las OECs son un tipo glial de características únicas y alta variabilidad fenotípica en el sistema nervioso.

En nuestro estudio hemos demostrado que las OECs en presencia de mielina disminuyen su potencial migratorio, tanto en vidrio como en geles de poliacrilamida (PAA), como también hemos indicado que las TEG3 pueden migrar con mayor persistencia en presencia de laminina (sustrato permisivo) en comparación al sustrato mielina (Nocentini et al., 2012). Este resultado, explica de manera parcial, porque las OECs deben ser trasplantadas a ambos lados de la lesión, y cerca de ella, para ser más eficaz (Gudino-Cabrera et al., 2000; Pearse et al., 2007), ello debido posiblemente a que moléculas expresadas en la zona de lesión (p.e. Nogo-A, MAG, OMgp) son capaces de reprimir la persistencia migratoria de este tipo glial.

### **Mielina inhibe las propiedades biomecánicas de las células de la glía envolvente olfatoria.**

Desde un perfil reológico, se ha establecido claramente que las células son sensibles a las propiedades mecánicas de su entorno y que estas características están implicadas tanto en condiciones normales como patológicas (Jaalouk and Lammerding, 2009; Wozniak and Chen, 2009). El CNS es de los tejidos más blandos del cuerpo y tiene una respuesta viscoelástica compleja. Por ello, tanto el cerebro como la médula espinal están protegidos mecánicamente por soportes más

rígidos (p.e. cráneo, duramadre, piamadre) (Franze et al., 2013). Se ha detectado que cambios en la composición de la ECM durante el proceso de degeneración neuronal, aunque el nexo específico entre cambios de la ECM y la aparición y/o progresión de las enfermedades neurodegenerativas no se ha determinado (Franze et al., 2013). Así es como el conocimiento acerca de las propiedades mecánicas de las neuronas y el entorno neuronal, incluidas células gliales, es un tema poco abordado y bastante desconocido hoy en día para la neurobiología celular y molecular (Lu et al., 2006b).

En nuestro caso, mediante TFM determinamos por primera vez las propiedades biomecánicas asociadas a la glía envolvente olfatoria. Las OECs tienen elevada mecanosensibilidad a sustratos rígidos de módulo de corte (del inglés, shear modulus) de 1-3 kPa (Nocentini et al., 2012), al igual que otros tipos gliales, como: los astrocitos, los precursores de oligodendrocitos y las células de Schwann (Jagielska et al., 2012; Lopez-Fagundo et al., 2014; Moshayedi et al., 2010). Los resultados obtenidos en nuestro estudio biomecánico mediante TFM nos indican que las OECs en presencia de mielina ven reducidas sus fuerzas de tracción en comparación a los controles en valores de hasta un orden de magnitud (Nocentini et al., 2012).

Waterman y cols. indican que las células utilizan fluctuaciones de fuerzas en sus adhesiones focales individuales para sentir y migrar a través de la MEC (Waterman et al., 2012), indicando que fuerzas de tracción y adhesiones focales tienen una estrecha relación en su respuesta ante señales mecánicas (Han et al., 2012). En nuestro estudio hemos observado que la reducción de fuerzas de tracción en las OECs sobre el sustrato mielina se encuentra asociado a una reducción en el número de fibras de estrés y la expresión de contactos focales (Nocentini et al., 2012).

### **NEP1-40 potencia las propiedades migratorias y biomecánicas de la glía envolvente olfatoria.**

Una estrategia terapéutica atractiva para mejorar las lesiones del CNS es identificar los factores que promueven la pérdida de regeneración axonal en el CNS (Thuret et al. 2006). NgR1 es el

receptor funcional para al menos tres inhibidores de la mielina (Nogo-66, MAG, OMgp) y por lo tanto su papel ha recibido considerable atención.

GrandPré y cols. indicaron por primera vez que los primeros 40 aminoácidos del bucle extracelular C-terminal de Nogo-A (NEP1-40) se unen a NgR1 sin activar río abajo el complejo receptor Nogo1. Así es como, el péptido NEP1-40 actúa como antagonista competitivo del complejo NgR1 reduciendo la inhibición del crecimiento axonal *in vitro* con mielina del CNS como sustrato (GrandPré et al., 2002).

Cuando NEP1-40 es inyectado localmente en el sitio de la lesión medular es capaz de promover un mayor crecimiento axonal del tracto corticoespinal y un aumento de la densidad de las fibras serotoninérgicas en la médula espinal caudal mejorando de ese modo la recuperación funcional (GrandPré et al., 2002; Steward et al., 2008). Sorprendentemente, incluso se han obtenido resultados positivos tras una aplicación retardada de NEP1-40 de hasta una semana después de la lesión medular (Li and Strittmatter, 2003). En axones entorrinal-hipocampales *in vitro*, NEP1-40 facilita fuertemente la regeneración de los axones entorrinales después de axotomía y permite el restablecimiento de los contactos sinápticos con sus dianas. Estos datos proporcionan pruebas de que esta estrategia podría usarse para mejorar la regeneración axonal en las conexiones corticales lesionadas (Mingorance et al., 2006). En nuestro estudio, incubamos el péptido NEP1-40 en cultivos de OECs sobre el sustrato mielina y se observa una recuperación parcial de las propiedades migratorias y mecánicas de las OECs. Esto sugiere la presencia de otros mecanismos inhibitorios activados en presencia de mielina (Nocentini et al., 2012).

Se ha vinculado, de manera tradicional, a las proteínas inhibitorias de la mielina: Nogo-A (Nogo-66), MAG y OMgp al receptor NgR1, no obstante, en estudios con ratones K.O para NgR1 se observa una recuperación parcial del crecimiento axonal lo que sugiere un cierto grado de redundancia mecanística por parte de las proteínas inhibitorias de la mielina (Zheng et al., 2005), como también la presencia de otros receptores.

PirB es un nuevo receptor que de manera pro-

miscua interactúa con Nogo-66, MAG y OMgp y en donde antagonistas de PirB conducen una significativa desinhibición parcial del efecto de las MAIs sobre el crecimiento axonal (Atwal et al., 2008). No obstante, la ablación funcional combinada de NgR1 y PirB no es suficiente para liberar totalmente el efecto inhibitorio de Nogo-66, MAG y OMgp lo que sugiere la existencia de mecanismos receptores adicionales para las MAIs. Además de NgR1 y PirB, se ha demostrado que MAG se une a los gangliósidos cerebrales, integrina- $\beta$ 1 y NgR2, dependiendo del tipo neuronal; donde cada una de estas interacciones ligando-receptor contribuye en diferentes grados en la inhibición del crecimiento axonal (Goh et al., 2008; Mehta et al., 2007; Worter et al., 2009). Es más, actualmente se ha reportado que LRP1 actúa como receptor de MAG mediante unión directa e independiente de su actividad lectina. Ello si, estudios cualitativos, en paralelo, demuestran que LRP1 podría interactuar, quizás, con las otras MAIs, que incluyen: nogo-66 y OMgp (Stiles et al., 2013). Complementariamente, complicando más el puzzle molecular a nivel regenerativo se ha indicado que también los lípidos asociados a la mielina (p.e sulfátidos) son capaces de inhibir la capacidad regenerativa neural (Winzler et al., 2011) exponiendo la complejidad del proceso regenerativo del CNS.

### **Incremento de las propiedades migratorias de NgR(Ecto)-TEG3s en estudios *in vitro* e *in vivo*.**

El trasplante de OECs ha demostrado que promueve la regeneración y recuperación funcional en la médula espinal lesionada (Raisman et al., 2012; Roet and Verhaagen, 2014). Las OECs poseen propiedades regenerativas que se asocian, en gran medida, a su dinámica migratoria (Huang et al., 2008; Roloff et al., 2013). Por ello, es de gran interés la potenciación de sus propiedades migratorias en condiciones de lesión del CNS. Es más, diversos estudios han indicado que existe una directa relación entre migración celular y potencial regenerativo en las OECs (Boyd et al., 2004; Lu et al., 2006a; Ramon-Cueto et al., 1998; Resnick et al., 2003).

Paralelamente, otros estudios han utilizado como terapia regenerativa la entrega de diversos



factores (p.e neurotróficos, farmacológicos) en el sitio de lesión mediante inyección o minibombas. No obstante, estos métodos no son capaces de focalizar la entrega del factor específico, a largo plazo, en la zona de lesión. Un enfoque alternativo es lograr una entrega específica del factor en el sitio de la lesión (p.e médula espinal) mediante terapia génica *ex vivo* (Tuszynski, 1997).

Considerando que tras la lesión, los restos de mielina están presentes por mucho tiempo en la zona dañada, y que previamente, hemos demostrado que las OECs expresan todos los componentes del complejo receptor NgR1 (NgR1, p75, Lingo-1 y TROY) y que su capacidad migratoria es inhibida por la presencia de mielina (Nocentini et al., 2012).

En nuestro caso, nosotros hemos generado una línea de OECs modificadas genéticamente denominado NgR(Ecto)-TEG3 que expresan en forma soluble NgR1. La generación de las NgR(Ecto)-TEG3 basada por integración de adenovirus es altamente eficiente debido a que no ocasiona cambios de la expresión génica de las células ni tampoco activación de la respuesta inmune en el organismo huésped tras el trasplante (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.). Las NgR(Ecto)-TEG3 sobreexpresan NgR1 permitiendo potenciar las propiedades promotoras de recrecimiento axonal y la creación de un microambiente favorable para potenciar la capacidad migratoria de este tipo glial (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.).

Nuestros resultados *in vitro* nos indican que las NgR(Ecto)-TEG3 tienen mayor capacidad migratoria sobre mielina y OMgp respecto a las WT-TEG3 (controles). Adicionalmente, se observa recuperación de las propiedades migratorias de las NgR(Ecto)-TEG3 que se correlaciona con un aumento de las fuerzas de tracción mediante TFM (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.). Sin embargo, la recuperación tanto migratoria como biomecánica es parcial, lo que sugiere que otros factores están implicados en esta inhibición. Esto debido a que las OECs podrían responder a otras moléculas asociadas a la mielina (p.e. sulfátidos) (Winzeler et al., 2011) o expresar otros receptores distintos a NgR1 (p.e. PirB, LRP1) (Atwal et al., 2008; Stiles et al., 2013).

Como punto final se ha determinado la dinámica de las células modificadas genéticamente (NgR1(Ecto)-TEG3) trasplantadas en una médula espinal lesionada y hemos observado que las NgR1(Ecto)-TEG3 poseen mayor capacidad migratoria que las WT-TEG3 (controles) en nuestros estudios *in vivo* (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.).

### **CSPG inhibe las propiedades migratorias y biomecánicas de la glía envolvente olfatoria.**

En nuestro estudio buscamos reforzar la idea de que la mayor parte de los factores que inhiben la elongación y regeneración axonal después de la lesión del CNS, también son capaces de afectar las propiedades migratorias de las OECs. De hecho, todas las moléculas descritas como inhibidores de la migración de las OECs (p.e. Nogo-A (Nogo-66), Slit-2, y fibulin-3) se ha informado se sobreexpresan en la cicatriz meningo-glial tras la lesión (Cregg et al., 2014).

De manera similar a las MAIs, la inhibición mediada por CSPG depende de la activación de RhoA y PKC convencionales (Sivasankaran et al., 2004). Estudios mecanicistas han identificado que el receptor la proteína tirosina fosfatasa (RPTP $\sigma$ ) como un receptor de alta-afinidad por CSPGs (Shen et al., 2009). RPTP es un miembro de la familia LAR que también incluye a LAR y RPTP $\delta$  (Fisher et al., 2009; Shen et al., 2011). RPTP $\sigma$  se une estructuralmente a las cadenas GAG-CS y GAG-HS a través de su primer dominio tipo-IG. La ablación de RPTP $\sigma$  mejora el crecimiento de neuritas en presencia de CSPG *in vitro*. La recuperación incompleta de la inhibición de CSPG en neuronas deficientes de RPTP $\sigma$  sugiere la existencia de mecanismos adicionales en la inhibición de CSPG (Dickendesher et al., 2012).

NgR1 y NgR3 son proteínas de membrana ancladas a un grupo GPI y comparten estructuras similares, como la presencia dominios de 8 repeticiones ricas en leucina (LRR) flanqueadas por un N-terminal y un C-terminal con un LRR limitante (Saha et al., 2014; Dickendesher et al., 2012). Dickendesher y cols. han reportado que NgR1 y NgR3 tiene por ligandos, de alta afini-

dad, a los GAGs de los CSPGs y son capaces de mediar la inhibición del crecimiento axonal asociada a los CSPGs. Es más, la depleción de NgR1 y NgR3, pero no la NgR1 y NgR2, es capaz de superar la inhibición mediada por CSPG en la elongación neurítica y promover la regeneración de los nervios ópticos dañados en ratones mutantes adultos (Dickendesher et al., 2012).

Los efectos del CSPG sobre la migración de las OECs eran desconocidos hasta la fecha. En nuestro estudio, describimos por primera vez como las OECs en presencia de CSPG ven perjudicada de gran medida su capacidad migratoria, al igual que sus propiedades biomecánicas debido a que disminuyen sus fuerzas de tracción sobre el sustrato CSPG en comparación al sustrato control (laminina). De hecho, esto se correlaciona con una baja en el número de contactos focales (vinculina-positivo) y una profunda desorganización del citoesqueleto de F-actina (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.).

En nuestro estudio, hemos observado que la capacidad de migración de las NgR1(Ecto)-TEG3 y WT-TEG3 no presenta cambios relevantes entre sí sobre el sustrato CSPG debido, probablemente, a que la región de interacción CSPG/NgR1 se encuentra en la región Stalk de NgR1 (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.).

### **ChABC potencia las propiedades migratorias y biomecánicas de la glía envolvente olfatoria.**

La administración controlada de condroitinasa ABC (ChABC) enzima bacteriana altamente invasiva se ha utilizado en vertebrados superiores para escindir las cadenas laterales inhibitorias de las GAG-CS en los sitios de lesión de la médula espinal, lo que resulta en una mayor regeneración axonal y la restauración de la actividad sináptica (Bradbury et al., 2002; Caggiano et al., 2005).

En nuestro estudio, hemos incubado ChABC siendo capaz bloquear el efecto inhibitorio del CSPG conllevando a una recuperación parcial de las propiedades migratorias de las OECs, lo cual sugiere la presencia de otros mecanismos inhibitorios asociados al CSPG (Reginensi et al., Ac-

cepted for Cell Mol Life Sc.).

A nivel reológico, en el CNS se ha determinado que el módulo de elasticidad de la cicatriz meningo-glial es diferente al de un tejido normal o el tejido lesionado adyacente (Boulet et al., 2011). Las cicatrices meningo-gliales son de hecho más rígidas que el tejido sano, y por ello, los conos de crecimiento entran en colapso axonal ante la presencia de este ambiente rígido (Cullen et al., 2007). Así como, el uso de ChABC pudiese tener un carácter dual: (i) bioquímico, mediante la digestión enzimática de las cadenas GAGs del CSPG y (ii) biomecánico, modificando la rigidez de la ECM asociada a la cicatriz meningo-glial (Franze, 2013).

Nosotros hemos sido los únicos en determinar las propiedades mecánicas de las OECs en condiciones miméticas de lesión medular y observado que presentan una reducción de sus fuerzas de tracción en presencia de CSPG en comparación a nuestro control (laminina), siendo dicho parámetro recuperado de manera incompleta al ser sometidas a tratamiento farmacológico con la enzima ChABC (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.). Adicionalmente, en nuestro estudio observamos que las TEG3 en sustrato control (laminina) presentan lamelipodios prominentes y muy dinámicos, mientras que sobre el sustrato inhibitorio CSPG se observa una reducción ostensible en la dinámica lamelipodial que es recuperada parcialmente mediante tratamiento con ChABC (Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.).

### **Nanofibras de PLA favorecen la migración de las células de la glía envolvente olfatoria.**

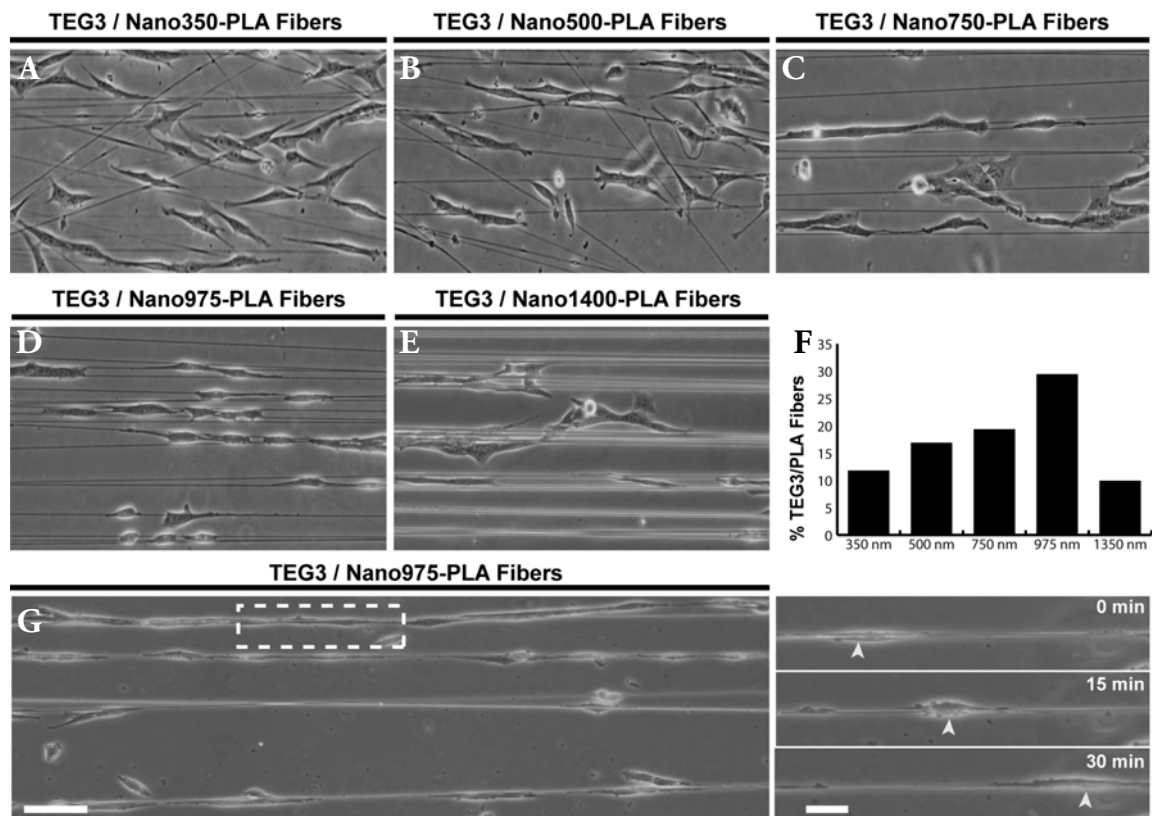
Los trasplantes de OECs son inyectados en suspensión en la zona de lesión para proporcionar vías de regeneración axonal ante pequeñas lesiones de la médula espinal permitiendo la restauración de la función neural mediante su integración en la cicatriz meningo-glial (Li et al., 2005). Sin embargo, la escala del daño, generalmente, es más grande conllevando a que el número de células durante el trasplante sea un gran limitante. Además debemos agregar, la reducción de las propiedades migratorias de las OECs en presencia

de moléculas inhibitorias expresadas en la zona de lesión (Huang et al., 2011; Nocentini et al., 2012; Su et al., 2007; Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.). Esto nos lleva a deducir que es crucial la utilización de matrices sintéticas que permitan maximizar el efecto del número limitado de células disponibles, y al mismo tiempo, proporcionar señales físicas y químicas que favorezcan el alineamiento y direccionamiento celular en la zona de lesión (Straley et al., 2010).

La interacción célula-ECM es un proceso bidireccional, por un lado la ECM proporciona un microambiente para la orientación de las células, y por otro lado, las células son capaces de remodelar continuamente la ECM. Este tipo de interacción célula-superficie ha demostrado ser influida por los dominios espaciales, la composición estructural y la fuerza mecánica en la nanoescala (Sniadecki et al., 2006) y así ocasionar una serie de procesos celulares, tales como: la migración, la proliferación y la diferenciación (Chen et al., 2004).

La organización y orientación espacial de las células juega un papel crítico en el comportamiento celular, y a su vez, proporciona las propiedades estructurales y físicas para el mantenimiento de las funciones tisulares. Por ejemplo, la formación de alineamientos celulares *in vivo* es generalmente acompañada de procesos de proliferación, diferenciación y cambios físicos en el medio extracelular (Li et al., 2014). La organización alineada de las células da como resultado procesos secretores y de deposición de la ECM que son diferenciales para cada subtipo tisular, y además, crítica en la determinación de la función celular (Jeong et al., 2005). Por lo tanto, es esencial el diseño mediante bioingeniería de estructuras que promuevan el alineamiento celular para generar un equivalente estructural y funcional para las células.

La nanotecnología ha sido capaz de fabricar materiales biodegradables a escalas submicrométricas controlada. Su aplicación ha demostrado su efecto en una variedad de células, incluyendo:



**Figura 26. Caracterización de adhesión y dinámica celular de las OECs en fibras de PLA.** Se observa el nivel de interacción TEG3 - fibras PLA utilizando diversos diámetros de la fibra (a) 350 nm, (b) 500 nm., (c) 750 nm., (d) 975 nm., (e) 1400 nm; (f) histograma % interacción TEG3/PLA y (g) análisis de microscopía en tiempo real de la dinámica de las TEG3 sobre las fibras de PLA.

fibroblastos, astrocitos, oligodendrocitos y células epiteliales (Bauguera et al., 2010; Venugopal et al., 2006).

Los biomateriales pueden ser utilizados como mediadores para ayudar a la regeneración del nervio a nivel de la cicatriz glial y las cavidades císticas. Existen una variedad de biomateriales, en particular los polímeros, se han sido investigados con el fin de establecer su idoneidad para aplicaciones de ingeniería de tejidos (Yucel et al., 2010). Entre ellos, el PLA (del inglés, Poli(lactic acid)), es un polímero prometedor para la regeneración neural debido a su procesabilidad termoplástica y sus propiedades mecánicas y biológicas, tales como su inmunogenicidad y biodegradabilidad (Auras et al., 2004).

En experimentos preliminares, hemos confeccionado mediante *electrospinning* un set de fibras alineadas de PLA, del orden de los nanómetros, del rango de los 300 nm. hasta los 1400 nm. cuantificadas por SEM. En nuestros resultados preliminares se observa reconocimiento celular y adhesión preferencial de las OECs a las fibra de PLA del orden de los 900-1000 nm. siendo capaces de adquirir una morfología bipolar fuertemente orientada por la disposición de la fibra.

Experimentos de microscopia en tiempo real han demostrado que las TEG3 son altamente motiles sobre las fibras PLA y se observa un ciclo de movimiento en que la células extienden su extremo guía en una dirección determinada, seguido por una tracción del tren posterior celular. No obstante, no hay existencia de un direccionamiento dirigido en su dinámica migratoria (J.A.D.R, unpublished results1).

En base a estos resultados, podemos concluir que las nanofibras podrían servir como material para el desarrollo de puentes, en lesiones más extensas en combinación con las OECs. Además, la utilización de biomateriales genera el aumento de la viabilidad de las OECs en la zona de lesión, a diferencia de su aplicación en suspensión, mejorando la eficiencia del número de células retenidas en la zona de lesión. Sin embargo, se debe buscar la incorporación de factores adicionales que sean capaces de generar un movimiento persistente y dirigido sobre la fibra polimérica (J.A.D.R, unpublished results1).

Uno de los principales inconvenientes del uso de biomateriales es que las células se desplazan en una dinámica aleatoria sobre la fibras. Si consideramos, que recientemente un estudio realizado por Su y cols. ha indicado que el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expresado por astrocitos reactivos en la cicatriz glial es capaz de atraer las OECs (Su et al., 2009) y que esta molécula genera un gradiente de quimiotaxis en la zona de la cicatriz glial después de una lesión medular. Es un indicativo de que TNF- $\alpha$  es un posible mecanismo regulador de la migración de las OECs trasplantadas (Su et al., 2009). Sin embargo, se debe tener en cuenta que los niveles de TNF- $\alpha$  tras una lesión medular tienen por pico de expresión el día 7, condición que debiese ser considerada a la hora de un trasplante de las OECs tras una lesión del CNS (Chuah et al., 2011).

En base a esto, se podría llegar a diseñar e implementar en el futuro, en modelos animales, fibras alineadas de PLA de diámetro específico (p.e 900-1000 nm) que permitan usar un número limitado de células en la zona dañada que posean un gradiente de TNF- $\alpha$  que sea capaz de direccionar la dinámica migratoria de las OECs. Ello, asociado al diseño de una macroarquitectura compatible que permita, conjuntamente, el recrecimiento axonal en el CNS (J.A.D.R, unpublished results1).

### **¿Qué tipo de migración tienen las células de la glía envolvente olfatoria?**

En condiciones fisiopatológicas (p.e. lesión medular) las OECs trasplantadas pueden migrar e interactuar con los astrocitos reactivos, a diferencia de otros tipos celulares trasplantados (p.e células de Schwann) (Lakatos et al., 2000) pudiendo reducir su reactividad y la respuesta inflamatoria (O'Toole et al., 2007; Richter et al., 2005; Verdu et al., 2001). Esta habilidad migratoria de las OECs de interactuar con astrocitos les permite la generación de rearrreglos de sus procesos celulares y su entremezclamiento con este tipo glial, conllevando la formación de vías conductivas para el crecimiento axonal. Así, este reordenamiento celular forma un tipo de puerta abierta, cuya superficie externa tiene a las moléculas inhibitorias de crecimiento y la superficie interna provista de diversas moléculas de supervivencia



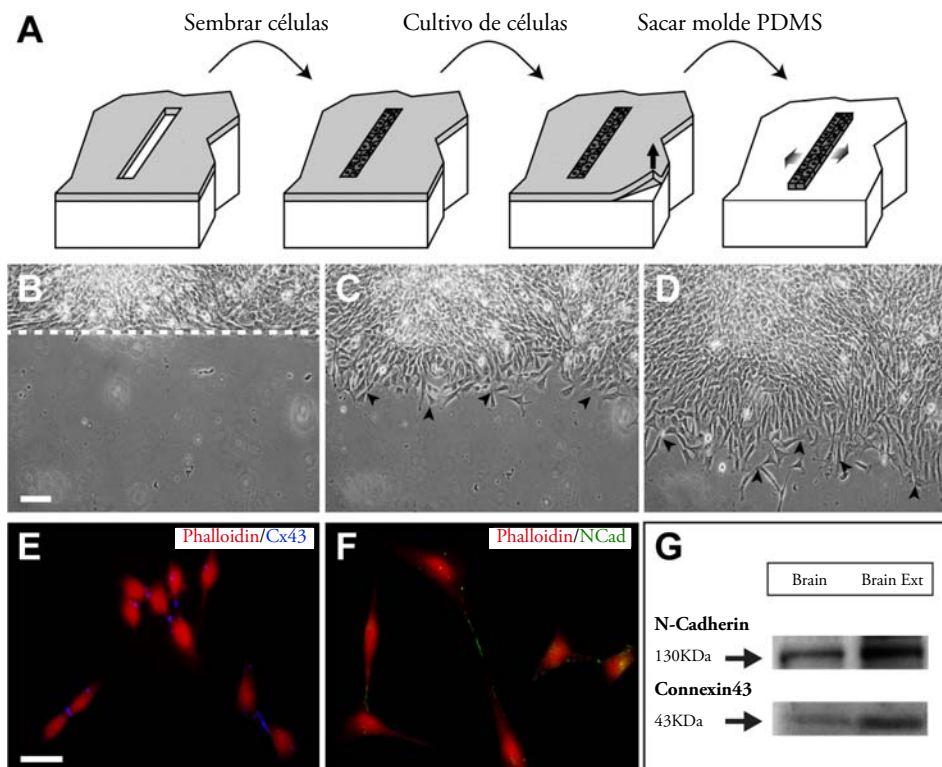
y promoción de la elongación axonal generadas por las OECs que son cruciales tanto en el contexto del ambiente natural en el sistema olfatorio, como en un trasplante de médula espinal (Li et al., 2005).

Sin embargo, los mecanismos que subyacen el tipo de dinámica de migración de las OECs, ya sea durante el desarrollo embrionario, su integración en la cicatriz meningo-glial y los procesos regenerativos son temas completamente desconocido (J.A.D.R, unpublished results2), y por ello, hasta el día de hoy sigue siendo un enigma el tipo de dinámica migratoria de las OECs.

En general, la dinámica de la migración glial sigue dos caminos: (i) en el CNS, generalmente, la orientación migratoria es de modo individualizado, por lo cual la célula requiere ir detectando progresivamente señales de orientación posicional relevante para su desplazamiento, ello sí, pueden haber excepciones a esta regla general (ii) en el PNS, las células se mueven de manera grupal

mediante migración colectiva (Gilmour et al., 2002).

De hecho, se supone que durante el desarrollo embrionario las OECs migran de manera orientativa por delante de los axones en crecimiento promoviendo su elongación mediante liberación de factores de soporte (p.e GDNF) (Lipson et al., 2003; Woodhall et al., 2001). Es más, diversas pruebas indican que el crecimiento de neuritas y las propiedades migratorias de las OECs son funcionalmente relacionadas (Tisay and Key, 1999) e involucran la expresión de fibulina-3 y la remodelación de la ECM (Vukovic et al., 2009). Sin embargo, el potencial migratorio de las OECs tanto *in vitro* e como *in vivo* (Deng et al., 2006; Lu et al., 2006a; Pearse et al., 2007) pareciera estar regulado por su entorno molecular, celular y tisular. Por ejemplo, la migración de las OECs implica dinámica de los lamelipodios laterales, que podría ser modulada por moléculas de la ECM, que incluyen: HSPG, CSPG, ácido lisofosfatidico, N-cadherina y factores neurotró-



**Figura 27. Análisis del tipo de migración celular de las TEG3.** (a) Principio experimental, las células se siembran en un sistema compuesto por una delgada capa de PDMS. Cuando las células alcanzan la confluencia, la microplantilla se remueve para permitir que las células migren y determinar su patrón migratorio; (b-d) Análisis de microscopía en tiempo real de la dinámica celular de las TEG3 en distintos tiempos, (b) 0 hrs, (c) 10 hrs, (d) 20 hrs; (e-g) Inmunofluorescencia de las TEG3 para los anticuerpos Faloidina (color rojo), Conexina-43 (color azul), N-Cadherina (color verde); (g) Western blot que ilustra la expresión de Conexina-43 y N-Cadherina en las TEG3s.

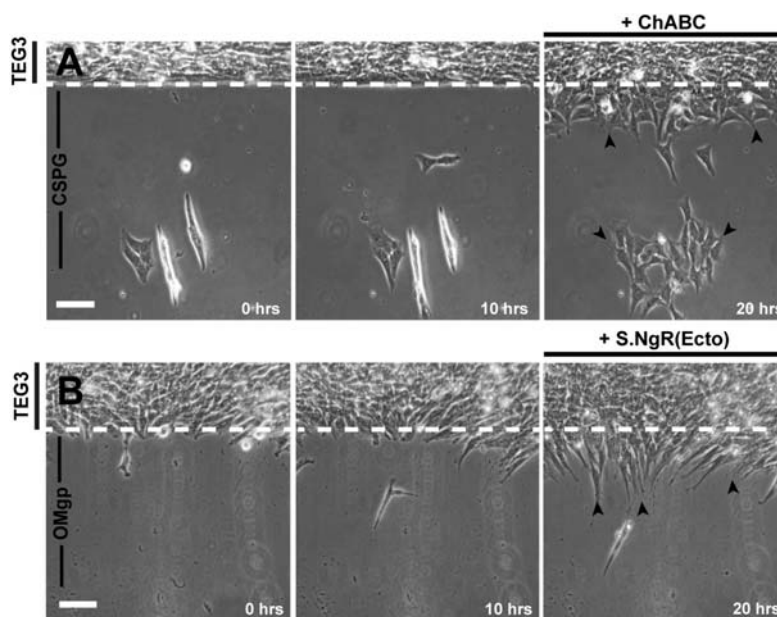
ficos, en particular, GDNF en la organización del citoesqueleto (Huang et al., 2008; Tisay and Key, 1999). Adicionalmente, otras moléculas de ECM, como: laminina, colágeno IV y fibronectina, que podrían actuar como sustratos estimulantes del crecimiento axonal olfativo (Doucette, 1996), y diversas metaloproteinasas de matriz (p.e MMP2, MMP9) que sirven de andamios para la motilidad de las OECs en la mucosa nasal; siendo probable que la distribución de las MMPs y su actividad proteolítica sea variable y pueda ser capaz de modificar el fenotipo característico de estas células migratorias. Además de su papel en la promoción en la migración, las MMPs son capaces de generar un ambiente proclive a la regeneración del crecimiento axonal; de hecho, las MMPs pueden degradar el núcleo proteico de las CSPGs, como también otras proteínas inhibitorias, como: Nogo-A y tenascina (Gueye et al., 2011; Ould-Yahoui et al., 2013).

En nuestro caso, hemos realizado experimentos preliminares para comprender el mecanismo fundamental del tipo de migración de las OECs. En primer lugar, hemos confeccionado un patrón nanométrico, rectangular, mediante técnicas de nanotecnología que permite analizar el comportamiento espacio-temporal de las células sin someterlas a irrupción de su integridad estructural. Ello nos permite analizar y caracterizar las propiedades migratorias de las OECs mediante microscopía en tiempo real en la búsqueda de un patrón migratorio.

Los resultados preliminares, pero no concluyentes, indican que las OECs son capaces de migrar de manera tipo colectiva, pero con una disposición libre. Se observa carencia de uniones célula-célula estables durante el proceso migratorio, sin embargo, se aprecian interacciones físicas transitorias, y quizás pudiesen ser también moleculares, que permitirían a las células migrar libres, pero con un comportamiento grupal direccionado (J.A.D.R, unpublished results2).

Este resultado no es concluyente, pero a su vez insinuante, debido a que se ha establecido recientemente que las OECs tienen origen embrionario derivado de la cresta neural que corresponde a una población migratoria que da lugar a la mayor parte del PNS (Forni and Wray, 2012). Interesantemente, las células de la cresta neural, en todos los vertebrados, generalmente poseen disposición migratoria, en grupos discretos de células, por zonas libres bien definidas a través de una dinámica denominada *corriente migratoria* (Friedl, 2004).

Las células de Schwann, al igual que las OECs, se originan a partir de la cresta neural y sus progenitores se encuentran en estrecho contacto con los axones del PNS (Kulesa et al., 2010). Ello indica, que las células de Schwann poseen un proceso migratorio altamente preciso y bien coordinado a largo de los tractos axonales periféricos (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010). Se ha observado mediante análisis de imágenes microscópicas *in vivo*, en pez cebra que los progenitores de las cé-



**Figura 28. Patrón de PDMS, migración celular y moléculas inhibitorias.** (a-b) Mediante microscopía en tiempo real se analiza la dinámica migratoria de las TEG3s en presencia de los inhibidores (a) CSPG y (b) OMgp. A las 10 horas se agregan los tratamientos recuperativos de ChABC (sustrato CSPG) y el ectodominio NgR1 aislado (sustrato OMgp).



lulas de Schwann en la línea lateral son capaces de seguir los tractos axonales hasta su posición final mediante discretas corrientes migratorias. Es más, cuando los axones se desvían a una posición ectópica, las células gliales siguen, a modo de cadena migratoria, los axones erróneamente posicionados (Gilmour et al., 2002).

Las OECs comparten propiedades funcionales comunes, además de las células de Schwann, con los astrocitos al presentar el establecimiento de uniones comunicantes entre sí mediante la expresión de conexinas (p.e Cx43) tanto *in vitro* como *in vivo* (Rela et al., 2010). La presencia de acoplamiento funcional en las OECs es un indicativo de la existencia de una dinámica altamente sincrónica y colectiva durante su dinámica celular lo cual sugiere que la dinámica de migración de las OECs es altamente intrincada y compleja.

Se puede concluir, que en nuestro estudio preliminar de análisis de la migración de las OECs que se debería estudiar la relación entre las propiedades microscópicas de la migración de sus células individualizadas y sus patrones multicelulares para aclarar el tipo de migración de las OECs. Para lograr ello, se debería realizar una simulación computacional que permita definir la existencia de un patrón migratorio de las OECs, como el grado de interacción intercelular de los elementos migratorios. La comprensión del tipo de migración de las OECs es desconocida hasta fecha de hoy y sería importante para el entendimiento de sus mecanismos migratorios y su aplicación terapéutica (J.A.D.R, unpublished results2).

## II. Bioingeniería en un chip: un modelo de unión neuromuscular funcional.

### Sistemas de microfluídica para aplicaciones neurobiológicas.

El sistema nervioso se forma a través de un notable proceso de autoorganización. Durante su formación las neuronas se encuentran con distintos microambientes altamente dinámicos y complejos, y por ello, descifrar el mosaico de señales químicas y físicas que guían cada neurona, la for-

mación de sus axones y sus respectivas conexiones es una tema de elevada dificultad (Kandel et al., 2012).

Los sistemas microfluidicos compartimentalizados son compatibles con una amplia variedad de neuronas, tanto cerebrales como espinales (Millet and Gillette, 2012). Estos sistemas ofrecen un ambiente altamente estructurado y sofisticado para la experimentación neuronal. Estos dispositivos ofrecen control espacio-temporal que permite la separación de los subcomponentes celulares mediante la utilización de microcanales para determinar la interacción entre distintos tipos celulares (Wang et al., 2009; Gross et al., 2010). También existe el beneficio del control preciso sobre la cantidad de factor(es) o reactivo(s) que se añaden, como también el bajo coste asociado al dispositivo microfluídico.

Lesiones traumáticas del CNS pueden conducir a daños irreversibles, lo que resulta en la pérdida permanente de la función (Thuret et al., 2006). El estudio de la compleja dinámica que interviene en este proceso puede conducir al desarrollo de nuevas estrategias y terapias para la regeneración nerviosa. Diversos modelos animales *in vivo* de trauma permiten el estudio de una multitud de variables complejas asociadas a los procesos de lesión del CNS (Akhtar et al., 2008). Estos modelos son extremadamente útiles, no obstante, poseen bajo porcentaje de reproducibilidad, alta inversión de tiempo y elevado consumo laboral. Más importante aún es que no permiten el monitoreo de la regeneración axonal en tiempo real o imposibilitan la confección de estudios reduccionistas para la comprensión de los procesos involucrados en una sola célula.

La microfabricación permite la confección de sistemas compartimentalizados, *in vitro*, para el estudio de procesos de lesión axonal y regeneración. Las plataformas de microfluidos son altamente compatibles con la incorporación de sistemas de daño localizado dentro del dispositivo microfluidico permitiendo mejorar la determinación de los mecanismos axón-específicos en la degeneración y regeneración al permitir la manipulación del cuerpo neuronal y el axón de manera independiente (Siddique et al., 2014). Así es como se pueden confeccionar sistemas biomiméticos *in vitro* de lesión medular utilizando

por sustratos señales químicas propias de la zona de la lesionada, tales como: Nogo-66, MAG-Fc, OMgp y CSPG (Kim et al., 2012; Park et al., 2008; Reginensi et al., Accepted for Cell Mol Life Sc.).

### **Aplicaciones de microfluídica en el estudio de la transmisión sináptica en la unión neuromuscular (NMJ).**

La sinapsis en el sistema nervioso ocurre en dimensiones espaciales extremadamente reducidas ( $1 \mu\text{m}^2$ ), son numerosas ( $>1000$  por neuronas hipocámpales) y su escala de tiempo de transmisión sináptica es del orden de los  $\mu\text{s}$  (Taylor et al., 2010). No obstante, las herramientas convencionales no nos permiten estudiar el proceso sináptico de forma integrativa. Las herramientas clásicas nos permiten determinar la presencia de estructuras sinápticas, pero no realizar ciertas preguntas relevantes a nivel molecular, celular y fisiológico respecto la transmisión sináptica (Southam et al., 2013).

La unión neuromuscular es altamente especializada se ubica en el terminal axónico, a nivel del PNS, en contacto directo con el tejido muscular. La señalización neuromuscular es un proceso bidireccional que implica una señal electroquímica anterógrada que resulta en la contracción muscular y la determinación del tipo de fibra muscular (Naya et al., 2003) y una señalización neurotrófica retrógrada que mantiene la supervivencia neuronal (Pearlson et al., 2013). Por lo tanto, la correcta funcionalidad entre neuronas motoras y el tejido muscular que inervan, son interdependientes entre sí (Millet and Gillette, 2012).

Métodos *in vitro* para el estudio de uniones neuromusculares utilizan, generalmente, una placa de cultivo y medio en común (cultivo en masa). No obstante, estos sistemas de estudio no son capaces de mimetizar las condiciones *in vivo* de las neuronas espinales y células musculares, las cuales se encuentran en entornos extracelulares diferentes (Kim et al., 2012; Tong et al., 2014).

Mediante la utilización de ensayos de microscopía de alta resolución hemos demostrado la formación de NMJ a partir de co-cultivo convencional de células musculares y neuronas

motoras espinales (Tong et al, 2014). No obstante, existe una diferencia absoluta entre los co-cultivos convencionales en masa (Dutton et al., 1995; Nelson et al., 1993) y los co-cultivos en sistemas compartimentalizados (Taylor et al., 2010) debido a que la plataforma microfluídica permite identificar mecanismos celulares a nivel local con alta precisión, monitoreo de transporte axonal anterógrado y retrógrado y manipulación de vías de señalización que regulan la formación, el mantenimiento y la supervivencia de la NMJ (Cheng et al., 2011). Además, este método nanotecnológico permite el control espacio-temporal sobre microambientes aislados ya sea mediante manipulación del compartimiento neuronal o la población celular muscular, de forma independiente, lo que permite el estudio de los mecanismos moleculares y celulares de comunicación célula-célula y la formación de la NMJ (Southam et al., 2013).

En nuestro caso, hemos confeccionado un sistema compartimentalizado de microfluídica para estudio de unión neuromuscular que consiste en un sistema integrado de dos cámaras separadas por microcanales que permiten una configuración espacial específica de los componentes del co-cultivo de NMJ. El formato de nuestra plataforma de microfluídica permite diseñar una microestructura más apropiada acorde al tipo celular, lo cual es muy práctico en el caso de células sensibles (p.e neuronas corticales, células madres) (Southam et al., 2013). De este modo, si estamos interesados en estudiar un compartimiento con un bajo número de axones, se puede ser capaces de aislar los axones mediante reducción en el número y diámetro de los microcanales.

Nuestro sistema compartimentalizado permite obtener un co-cultivo de NMJ simple espacialmente separado y ser sometido a tratamientos diferenciales. En nuestro caso, hemos obtenido una excelente supervivencia y observado la formación de uniones neuromusculares estables capaces de formar contracciones espontáneas (Tong et al., 2014). El proceso de contracción neuromuscular es modulado por la generación de transientes de  $\text{Ca}^{+2}$  en los cultivos de miotubos después de la estimulación con KCl en motoneuronas. El tratamiento de KCl es capaz de desencadenar en las motoneuronas la liberación de neurotransmisores que inducen transientes de  $\text{Ca}^{+2}$  en los miotubos

interconectados (Angleton and Betz, 2001).

En nuestro estudio, para descartar la posibilidad de que los transientes de  $\text{Ca}^{+2}$  fueran provocados por difusión de KCl desde el compartimiento de las motoneuronas hemos corroborado mediante análisis de difusión intercompartimental (Taylor et., 2009; Tong et al., 2014). Complementariamente, se aplica tetrodotóxina (TTX) que es capaz de suprimir el potencial de acción a través de un bloqueo neuronal selectivo de los canales de sodio dependientes de voltaje (Bane et al., 2014) en el compartimiento neuronal que es capaz de desencadenar una disminución en los transientes de  $\text{Ca}^{+2}$  sostenidos en los miotubos lo que es indicativo de que la estimulación es específica a partir de las neuronas motoras (Tong et al., 2014).

El estudio experimental de axones aislados, a baja densidad, es de vital importancia para el estudio de la dinámica de orgánulos, interacción axón-glia y respuesta sináptica. Esto otorga una mejoría en la resolución de los procesos celulares y la cuantificación de fenómenos subcelulares (Wang et., 2009; Taylor et al., 2010). Además, la plataforma permite elucidar sobre los factores moleculares desencadenantes de diversas enfermedades neurodegenerativas, así como de lesiones nerviosas proporcionando información espacio-temporal sobre la progresión de estos procesos neuronales (Taylor et al., 2010). Es más, actualmente se combina la tecnología de optogénica y microfluídica para estudios genéticos de alto rendimiento de la función sináptica en diversos modelos de estudio (Stirman et al., 2010).









# CONCLUSIONES



1. Las OECs expresan todo los elementos del complejo receptor NgR. Además, este complejo receptor es activo. De hecho, en respuesta a mielina se activa RhoA y aumenta la fosforilación ERK1-2.
2. Las OECs en presencia de mielina muestran una disminución de la capacidad migratoria y biomecánica, como también reorganización del citoesqueleto. Esta capacidad está parcialmente restaurada en presencia de NEP1-40.
3. Las OECs en presencia de CSPG reducen su capacidad de migración y biomecánica, que es recuperada parcialmente mediante tratamiento con ChABC.
4. Mediante terapia génica generamos OECs capaces de expresar y secretar el ectodominio NgR1, en altos niveles, para estudios *in vitro* e *in vivo*.
5. NgR1(Ecto)-TEG3 son capaces de migrar mayores distancias sobre el substrato mielina y OMgp respecto a sus controles.
6. NgR1(Ecto)-TEG3 trasplantadas en médulas espinales lesionadas logran integrarse en el tejido y migrar mayores distancias que los controles, en sentido caudal o rostral respecto al sitio de inyección.
7. Desarrollo de un sistema de microfluidica para estudiar la unión neuromuscular.









# BIBLIOGRAFÍA



- Agata, K., Saito, Y., and Nakajima, E. (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Development, growth & differentiation* 49, 73-78.
- Ahmed, Z., Douglas, M.R., John, G., Berry, M., and Logan, A. (2013). AMIGO3 is an NgR1/p75 co-receptor signalling axon growth inhibition in the acute phase of adult central nervous system injury. *PloS one* 8, e61878.
- Ahn, Y.H., Lee, G., and Kang, S.K. (2006). Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: Inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 560-570.
- Akhtar, A.Z., Pippin, J.J., and Sandusky, C.B. (2008). Animal models in spinal cord injury: a review. *Reviews in the neurosciences* 19, 47-60.
- Alexander, J.K., and Popovich, P.G. (2009). Neuroinflammation in spinal cord injury: therapeutic targets for neuroprotection and regeneration. *Progress in brain research* 175, 125-137.
- Allen, N.J., and Barres, B.A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457, 675-677.
- Andersson, P.B., Perry, V.H., and Gordon, S. (1991). The kinetics and morphological characteristics of the macrophage-microglial response to kainic acid-induced neuronal degeneration. *Neuroscience* 42, 201-214.
- Arber, S., Burden, S.J., and Harris, A.J. (2002). Patterning of skeletal muscle. *Current opinion in neurobiology* 12, 100-103.
- Arriemerlou, C., and Meyer, T. (2005). A local coupling model and compass parameter for eukaryotic chemotaxis. *Developmental cell* 8, 215-227.
- Artigiani, S., Comoglio, P.M., and Tamagnone, L. (1999). Plexins, semaphorins, and scatter factor receptors: a common root for cell guidance signals? *IUBMB life* 48, 477-482.
- Atwal, J.K., Pinkston-Gosse, J., Syken, J., Stawicki, S., Wu, Y., Shatz, C., and Tessier-Lavigne, M. (2008). PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science (New York, NY)* 322, 967-970.
- Au, E., Richter, M.W., Vincent, A.J., Tetzlaff, W., Aebersold, R., Sage, E.H., and Roskams, A.J. (2007). SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 7208-7221.
- Au, E., and Roskams, A.J. (2002). Culturing olfactory ensheathing glia from the mouse olfactory epithelium. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 198, 49-54.
- Auld, D.S., and Robitaille, R. (2003). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 9, 144-157.
- Auras, R., Harte, B., and Selke, S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular bioscience* 4, 835-864.
- Baiguera, S., Del Gaudio, C., Fioravanzo, L., Bianco, A., Grigioni, M., and Folin, M. (2010). In vitro astrocyte and cerebral endothelial cell response to electrospun poly(epsilon-caprolactone) mats of different architecture. *Journal of materials science Materials in medicine* 21, 1353-1362.
- Balentine, J.D., and Spector, M. (1977). Calcification of axons in experimental spinal cord trauma. *Annals of neurology* 2, 520-523.
- Bandtlow, C.E., and Zimmermann, D.R. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological reviews* 80, 1267-1290.
- Barber, P.C. (1982). Neurogenesis and regeneration in the primary olfactory pathway of

- mammals. *Bibliotheca anatomica*, 12-25.
- Barber, P.C., and Lindsay, R.M. (1982). Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience* 7, 3077-3090.
- Bard, J.B., and Hay, E.D. (1975). The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movement in situ and in vitro. *The Journal of cell biology* 67, 400-418.
- Barraud, P., Seferiadis, A.A., Tyson, L.D., Zwart, M.F., Szabo-Rogers, H.L., Ruhrberg, C., Liu, K.J., and Baker, C.V. (2010). Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21040-21045.
- Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430-440.
- Barton, W.A., Liu, B.P., Tzvetkova, D., Jeffrey, P.D., Fournier, A.E., Sah, D., Cate, R., Strittmatter, S.M., and Nikolov, D.B. (2003). Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *The EMBO journal* 22, 3291-3302.
- Bartsch, U., Bandtlow, C.E., Schnell, L., Bartsch, S., Spillmann, A.A., Rubin, B.P., Hillenbrand, R., Montag, D., Schwab, M.E., and Schachner, M. (1995). Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* 15, 1375-1381.
- Bartus, K., James, N.D., Bosch, K.D., and Bradbury, E.J. (2012). Chondroitin sulphate proteoglycans: key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Experimental neurology* 235, 5-17.
- Bauer, S., Rasika, S., Han, J., Mauduit, C., Racourt, M., Morel, G., Jourdan, F., Benahmed, M., Moyses, E., and Patterson, P.H. (2003). Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 1792-1803.
- Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., Komon, J., Tovar, C.A., Van Meter, M., Anderson, D.K., Faden, A.I., Hsu, C.Y., Noble, L.J., Salzman, S., et al. (1997). Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Experimental neurology* 148, 453-463.
- Beebe, D.J., Mensing, G.A., and Walker, G.M. (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering* 4, 261-286.
- Beltman, J.B., Maree, A.F., and de Boer, R.J. (2009). Analysing immune cell migration. *Nature reviews Immunology* 9, 789-798.
- Benson, M.D., Romero, M.I., Lush, M.E., Lu, Q.R., Henkemeyer, M., and Parada, L.F. (2005). Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10694-10699.
- Bergman, A., Condeelis, J.S., and Gligorijevic, B. (2014). Invadopodia in context. *Cell adhesion & migration* 8.
- Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 1071-1076.
- Bisi, S., Disanza, A., Malinverno, C., Frittoli, E., Palamidessi, A., and Scita, G. (2013). Membrane and actin dynamics interplay at lamellipodia leading edge. *Current opinion in cell biology* 25, 565-573.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews* 94, 235-263.
- Blanes, T. (1898). Sobre algunos puntos dudosos de la estructura del bulbo olfatorio. *Rev Trim Microg*, 3:99-127.
- Blight, A.R., and Decrescito, V. (1986). Morphometric analysis of experimental spinal cord

- injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. *Neuroscience* 19, 321-341.
- Blits, B., Boer, G.J., and Verhaagen, J. (2002). Pharmacological, cell, and gene therapy strategies to promote spinal cord regeneration. *Cell transplantation* 11, 593-613.
- Bode, H.R. (2003). Head regeneration in Hydra. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 226, 225-236.
- Boruch, A.V., Connors, J.J., Pipitone, M., Deadwyler, G., Storer, P.D., Devries, G.H., and Jones, K.J. (2001). Neurotrophic and migratory properties of an olfactory ensheathing cell line. *Glia* 33, 225-229.
- Boulanger, L.M. (2009). Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64, 93-109.
- Boulet, T., Kelso, M.L., and Othman, S.F. (2011). Microscopic magnetic resonance elastography of traumatic brain injury model. *Journal of neuroscience methods* 201, 296-306.
- Bourne, H.R., and Weiner, O. (2002). A chemical compass. *Nature* 419, 21.
- Bovolenta, P., and Feraud-Espinosa, I. (2000). Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Progress in neurobiology* 61, 113-132.
- Bovolenta, P., Wandosell, F., and Nieto-Sampedro, M. (1993). Characterization of a neurite outgrowth inhibitor expressed after CNS injury. *The European journal of neuroscience* 5, 454-465.
- Boyd, J.G., Doucette, R., and Kawaja, M.D. (2005). Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 694-703.
- Boyd, J.G., Lee, J., Skihar, V., Doucette, R., and Kawaja, M.D. (2004). LacZ-expressing olfactory ensheathing cells do not associate with myelinated axons after implantation into the compressed spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2162-2166.
- Bradbury, E.J., Moon, L.D., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., and McMahon, S.B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416, 636-640.
- Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science (New York, NY)* 283, 1931-1934.
- Bradke, F., Fawcett, J.W., and Spira, M.E. (2012). Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nature reviews Neuroscience* 13, 183-193.
- Brann, J.H., and Firestein, S.J. (2014). A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Frontiers in neuroscience* 8, 182.
- Bretscher, M.S. (2008). On the shape of migrating cells--a 'front-to-back' model. *Journal of cell science* 121, 2625-2628.
- Brockes, J.P., Kumar, A., and Velloso, C.P. (2001). Regeneration as an evolutionary variable. *Journal of anatomy* 199, 3-11.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.
- Bruck, W., Bruck, Y., Maruschak, B., and Friede, R.L. (1995). Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta neuropathologica* 89, 363-367.
- Brustle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karam, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., and McKay, R.D. (1999). Embryonic stem

- cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science (New York, NY)* 285, 754-756.
- Bu, G., Maksymovitch, E.A., Nerbonne, J.M., and Schwartz, A.L. (1994). Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *The Journal of biological chemistry* 269, 18521-18528.
- Bundesen, L.Q., Scheel, T.A., Bregman, B.S., and Kromer, L.F. (2003). Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 7789-7800.
- Burden, S.J. (2011). SnapShot: Neuromuscular Junction. *Cell* 144, 826-826.e821.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297-308.
- Butler, J.P., Tolic-Norrelykke, I.M., Fabry, B., and Fredberg, J.J. (2002). Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *American journal of physiology Cell physiology* 282, C595-605.
- Caballero, S.N.-S., M (2005). Fisiopatología de la lesión medular. Revisión literaria. *Vet Mex* 36(1), 75-87.
- Cafferty, W.B., Duffy, P., Huebner, E., and Strittmatter, S.M. (2010). MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 6825-6837.
- Cai, D., Deng, K., Mellado, W., Lee, J., Ratan, R.R., and Filbin, M.T. (2002). Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. *Neuron* 35, 711-719.
- Cajal, S.R. (1891). Significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de las células de la sustancia gris. *Rev Cienc Méd Barc* 27, 1-15.
- Cao, L., Su, Z., Zhou, Q., Lv, B., Liu, X., Jiao, L., Li, Z., Zhu, Y., Huang, Z., Huang, A., et al. (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration. *Glia* 54, 536-544.
- Carbonetto, S., Evans, D., and Cochard, P. (1987). Nerve fiber growth in culture on tissue substrata from central and peripheral nervous systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7, 610-620.
- Caroni, P., Savio, T., and Schwab, M.E. (1988). Central nervous system regeneration: oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. *Progress in brain research* 78, 363-370.
- Caroni, P., and Schwab, M.E. (1988). Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1, 85-96.
- Carulli, D., Laabs, T., Geller, H.M., and Fawcett, J.W. (2005). Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Current opinion in neurobiology* 15, 116-120.
- Coates, T.D., Watts, R.G., Hartman, R., and Howard, T.H. (1992). Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of cell biology* 117, 765-774.
- Coggeshall, R.E., and Youngblood, C.S. (1983). Recovery from spinal transection in fish: re-growth of axons past the transection. *Neuroscience letters* 38, 227-231.
- Conde, C., and Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons

- and dendrites. *Nature reviews Neuroscience* 10, 319-332.
- Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annual review of cell biology* 9, 411-444.
- Costa, L.M., Pereira, J.E., Filipe, V.M., Magalhaes, L.G., Couto, P.A., Gonzalo-Orden, J.M., Raimondo, S., Geuna, S., Mauricio, A.C., Nikulina, E., et al. (2013). Rolipram promotes functional recovery after contusive thoracic spinal cord injury in rats. *Behavioural brain research* 243, 66-73.
- Court, F.A., Gillingwater, T.H., Melrose, S., Sherman, D.L., Greenshields, K.N., Morton, A.J., Harris, J.B., Willison, H.J., and Ribchester, R.R. (2008). Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *Journal of cell science* 121, 3901-3911.
- Cregg, J.M., DePaul, M.A., Filous, A.R., Lang, B.T., Tran, A., and Silver, J. (2014). Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology* 253, 197-207.
- Cullen, D.K., Simon, C.M., and LaPlaca, M.C. (2007). Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal-astrocytic co-cultures. *Brain research* 1158, 103-115.
- Chan, C.C., Khodarahmi, K., Liu, J., Sutherland, D., Oschipok, L.W., Steeves, J.D., and Tetzlaff, W. (2005). Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury. *Experimental neurology* 196, 352-364.
- Chehrehasa, F., Windus, L.C., Ekberg, J.A., Scott, S.E., Amaya, D., Mackay-Sim, A., and St John, J.A. (2010). Olfactory glia enhance neonatal axon regeneration. *Molecular and cellular neurosciences* 45, 277-288.
- Chen, C.S., Tan, J., and Tien, J. (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annual review of biomedical engineering* 6, 275-302.
- Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F., and Schwab, M.E. (2000). Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403, 434-439.
- Chen, W.T. (1981). Surface changes during retraction-induced spreading of fibroblasts. *Journal of cell science* 49, 1-13.
- Chen, Y., Zeng, J., Cen, L., Chen, Y., Wang, X., Yao, G., Wang, W., Qi, W., and Kong, K. (2009). Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *The Journal of international medical research* 37, 281-288.
- Cheng, B., Christakos, S., and Mattson, M.P. (1994). Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12, 139-153.
- Cheng, H., Cao, Y., and Olson, L. (1996). Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science (New York, NY)* 273, 510-513.
- Cheriyian, T., Ryan, D.J., Weinreb, J.H., Cheriyian, J., Paul, J.C., Lafage, V., Kirsch, T., and Errico, T.J. (2014). Spinal cord injury models: a review. *Spinal cord* 52, 588-595.
- Chuah, M.I., and Au, C. (1993). Cultures of ensheathing cells from neonatal rat olfactory bulbs. *Brain research* 601, 213-220.
- Chuah, M.I., Hale, D.M., and West, A.K. (2011). Interaction of olfactory ensheathing cells with other cell types in vitro and after transplantation: glial scars and inflammation. *Experimental neurology* 229, 46-53.
- Chuah, M.I., and Zheng, D.R. (1992). The human primary olfactory pathway: fine structural and cytochemical aspects during development and in adults. *Microscopy research and techni-*



que 23, 76-85.

Chuderland, D., and Seger, R. (2008). Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. *Communicative & integrative biology* 1, 4-5.

Chung, B.M., Rotty, J.D., and Coulombe, P.A. (2013). Networking galore: intermediate filaments and cell migration. *Current opinion in cell biology* 25, 600-612.

David, S., and Lacroix, S. (2003). Molecular approaches to spinal cord repair. *Annual review of neuroscience* 26, 411-440.

DeBellard, M.E., Tang, S., Mukhopadhyay, G., Shen, Y.J., and Filbin, M.T. (1996). Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Molecular and cellular neurosciences* 7, 89-101.

Dedhar, S., and Hannigan, G.E. (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Current opinion in cell biology* 8, 657-669.

Defeu Soufo, H.J., and Graumann, P.L. (2004). Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO reports* 5, 789-794.

Dembo, M., and Wang, Y.L. (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical journal* 76, 2307-2316.

Deng, C., Gorrie, C., Hayward, I., Elston, B., Venn, M., Mackay-Sim, A., and Waite, P. (2006). Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord. *Journal of neuroscience research* 83, 1201-1212.

Dent, M. (2003). Daño y reparación del sistema nervioso. *Ciencia Ergo Sum* 10.

Dey, P., Togra, J., and Mitra, S. (2014). Intermediate filament: structure, function, and applications in cytology. *Diagnostic cytopathology* 42, 628-635.

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

Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science (New York, NY)* 298, 1959-1964.

DiMilla, P.A., Barbee, K., and Lauffenburger, D.A. (1991). Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophysical journal* 60, 15-37.

DiMilla, P.A., Stone, J.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M., and Lauffenburger, D.A. (1993). Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *The Journal of cell biology* 122, 729-737.

Dimou, L., Schnell, L., Montani, L., Duncan, C., Simonen, M., Schneider, R., Liebscher, T., Gulllo, M., and Schwab, M.E. (2006). Nogo-A-deficient mice reveal strain-dependent differences in axonal regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 5591-5603.

Diz-Munoz, A., Krieg, M., Bergert, M., Ibarlucea-Benitez, I., Muller, D.J., Paluch, E., and Heisenberg, C.P. (2010). Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment. *PLoS biology* 8, e1000544.

Dodd, D.A., Niederoest, B., Bloechlinger, S., Dupuis, L., Loeffler, J.P., and Schwab, M.E. (2005). Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *The Journal of biological chemistry* 280, 12494-12502.

Dogterom, M., Kerssemakers, J.W., Romet-Lemonne, G., and Janson, M.E. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Current opinion in cell biology* 17, 67-74.

Domeniconi, M., Cao, Z., Spencer, T., Siva-

- sankaran, R., Wang, K., Nikulina, E., Kimura, N., Cai, H., Deng, K., Gao, Y., et al. (2002). Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35, 283-290.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8, 1454-1468.
- Doucette, J.R. (1984). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *The Anatomical record* 210, 385-391.
- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3, 433-449.
- Doucette, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *The Journal of comparative neurology* 312, 451-466.
- Doucette, R. (1996). Immunohistochemical localization of laminin, fibronectin and collagen type IV in the nerve fiber layer of the olfactory bulb. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 14, 945-959.
- Dunning, M.D., Lakatos, A., Loizou, L., Kettunen, M., French-Constant, C., Brindle, K.M., and Franklin, R.J. (2004). Superparamagnetic iron oxide-labeled Schwann cells and olfactory ensheathing cells can be traced in vivo by magnetic resonance imaging and retain functional properties after transplantation into the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 9799-9810.
- Dusart, I., and Schwab, M.E. (1994). Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *The European journal of neuroscience* 6, 712-724.
- Eisthen, H.L. (1997). Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain, behavior and evolution* 50, 222-233.
- Ekberg, J.A., Amaya, D., Mackay-Sim, A., and St John, J.A. (2012). The migration of olfactory ensheathing cells during development and regeneration. *Neuro-Signals* 20, 147-158.
- Engel, A.G., Ohno, K., and Sine, S.M. (2003). Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nature reviews Neuroscience* 4, 339-352.
- Esko, J.D., Kimata, K., and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California).
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Ewald, A.J., Brenot, A., Duong, M., Chan, B.S., and Werb, Z. (2008). Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Developmental cell* 14, 570-581.
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., and Chen, C.S. (2011). A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Developmental cell* 21, 35-47.
- Farooqui, R., and Fenteany, G. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *Journal of cell science* 118, 51-63.
- Fawcett, J.W., and Keynes, R.J. (1990). Peripheral nerve regeneration. *Annual review of neuroscience* 13, 43-60.
- Fenrich, K., and Gordon, T. (2004). Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* 31, 142-156.

- Feron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T., and Mackay-Sim, A. (2005). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* 128, 2951-2960.
- Fey, P., Stephens, S., Titus, M.A., and Chisholm, R.L. (2002). SadA, a novel adhesion receptor in Dictyostelium. *The Journal of cell biology* 159, 1109-1119.
- Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M.E., and Skerra, A. (2002). An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein engineering* 15, 931-941.
- Filbin, M.T. (2003). Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature reviews Neuroscience* 4, 703-713.
- Filoni, S., and Bosco, L. (1981). Comparative analysis of the regenerative capacity of caudal spinal cord in larvae of several Anuran amphibian species. *Acta embryologiae et morphologiae experimentalis ("Halocynthia" Association)* 2, 199-226.
- Finger, J.H., Bronson, R.T., Harris, B., Johnson, K., Przyborski, S.A., and Ackerman, S.L. (2002). The netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 10346-10356.
- Fisher, D., Xing, B., Dill, J., Li, H., Hoang, H.H., Zhao, Z., Yang, X.L., Bachoo, R., Cannon, S., Longo, F.M., et al. (2011). Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 14051-14066.
- Fitch, M.T., and Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology* 209, 294-301.
- Folch, A. (2007). BioMEMS and cellular biology: perspectives and applications. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 300.
- Forni, P.E., and Wray, S. (2012). Neural crest and olfactory system: new prospective. *Molecular neurobiology* 46, 349-360.
- Fouad, K., Schnell, L., Bunge, M.B., Schwab, M.E., Liebscher, T., and Pearse, D.D. (2005). Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 1169-1178.
- Fournier, A.E., Gould, G.C., Liu, B.P., and Strittmatter, S.M. (2002). Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 8876-8883.
- Fournier, A.E., GrandPre, T., and Strittmatter, S.M. (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341-346.
- Fox, M.A., Sanes, J.R., Borza, D.B., Eswarakumar, V.P., Fassler, R., Hudson, B.G., John, S.W., Ninomiya, Y., Pedchenko, V., Pfaff, S.L., et al. (2007). Distinct target-derived signals organize formation, maturation, and maintenance of motor nerve terminals. *Cell* 129, 179-193.
- Fraher, J.P. (2000). The transitional zone and CNS regeneration. *Journal of anatomy* 196 ( Pt 1), 137-158.
- Fraley, S.I., Feng, Y., Krishnamurthy, R., Kim, D.H., Celedon, A., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2010). A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nature cell biology* 12, 598-604.

- Franceschini, I.A., and Barnett, S.C. (1996). Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Developmental biology* 173, 327-343.
- Franssen, E.H., de Bree, F.M., and Verhaagen, J. (2007). Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain research reviews* 56, 236-258.
- Franz, C.M., Jones, G.E., and Ridley, A.J. (2002). Cell migration in development and disease. *Developmental cell* 2, 153-158.
- Franze, K. (2013). The mechanical control of nervous system development. *Development (Cambridge, England)* 140, 3069-3077.
- Franze, K., and Guck, J. (2010). The biophysics of neuronal growth. *Reports on Progress in Physics* 73, 094601.
- Franze, K., Janmey, P.A., and Guck, J. (2013). Mechanics in neuronal development and repair. *Annual review of biomedical engineering* 15, 227-251.
- Friedl, P. (2004). Preshpecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current opinion in cell biology* 16, 14-23.
- Friedl, P., Borgmann, S., and Brocker, E.B. (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *Journal of leukocyte biology* 70, 491-509.
- Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., and Zanker, K.S. (1998). CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *European journal of immunology* 28, 2331-2343.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 445-457.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews Cancer* 3, 362-374.
- Fry, E.J., Ho, C., and David, S. (2007). A role for Nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve. *Neuron* 53, 649-662.
- Funahashi, S., Hasegawa, T., Nagano, A., and Sato, K. (2008). Differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo receptors and their ligands in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 506, 141-160.
- Furlan, J.C., Sakakibara, B.M., Miller, W.C., and Krassioukov, A.V. (2013). Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* 40, 456-464.
- Galtrey, C.M., and Fawcett, J.W. (2007). The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain research reviews* 54, 1-18.
- Galliot, B., and Ghila, L. (2010). Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Molecular reproduction and development* 77, 837-855.
- Gao, Y., Nikulina, E., Mellado, W., and Filbin, M.T. (2003). Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11770-11777.
- Garcia-Alias, G., Lopez-Vales, R., Fores, J., Navarro, X., and Verdu, E. (2004). Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *Journal of neuroscience research* 75, 632-641.

- Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C.M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 315-333.
- Garrido, J., and Díaz, M. (2009). Mecanismos implicados en la axonogénesis, el crecimiento axonal y la localización de proteínas en el axón. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXV: Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas*.
- Gaultier, A., Wu, X., Le Moan, N., Takimoto, S., Mukandala, G., Akassoglou, K., Campana, W.M., and Gonias, S.L. (2009). Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for myelin phagocytosis. *Journal of cell science* 122, 1155-1162.
- Gautam, M., Noakes, P.G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R.H., Merlie, J.P., and Sanes, J.R. (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85, 525-535.
- Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 21-33.
- Ghashghaei, H.T., Lai, C., and Anton, E.S. (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nature reviews Neuroscience* 8, 141-151.
- Ghysen, A., and Dambly-Chaudiere, C. (2007). The lateral line microcosmos. *Genes & development* 21, 2118-2130.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Rossier, O., Cai, Y., Chaga, O., Jiang, G., Beaver, W., Dobreiner, H.G., Freund, Y., Borisy, G., et al. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128, 561-575.
- Giger, R.J., Pasterkamp, R.J., Heijnen, S., Holtmaat, A.J., and Verhaagen, J. (1998). Anatomical distribution of the chemorepellent semaphorin III/collapsin-1 in the adult rat and human brain: predominant expression in structures of the olfactory-hippocampal pathway and the motor system. *Journal of neuroscience research* 52, 27-42.
- Gil, V., Bichler, Z., Lee, J.K., Seira, O., Llorens, F., Bribian, A., Morales, R., Claverol-Tinture, E., Soriano, E., Sumoy, L., et al. (2010). Developmental expression of the oligodendrocyte myelin glycoprotein in the mouse telencephalon. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 20, 1769-1779.
- Gil, V., Nicolas, O., Mingorance, A., Urena, J.M., Tang, B.L., Hirata, T., Saez-Valero, J., Ferrer, I., Soriano, E., and del Rio, J.A. (2006). Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 65, 433-444.
- Gilmour, D.T., Maischein, H.M., and Nusslein-Volhard, C. (2002). Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* 34, 577-588.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology* 14, 392-404.
- Goh, E.L., Young, J.K., Kuwako, K., Tessier-Lavigne, M., He, Z., Griffin, J.W., and Ming, G.L. (2008). beta1-integrin mediates myelin-associated glycoprotein signaling in neuronal growth cones. *Molecular brain* 1, 10.
- Goldberg, J.L., Vargas, M.E., Wang, J.T., Mandemakers, W., Oster, S.F., Sretavan, D.W., and Barres, B.A. (2004). An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 4989-4999.
- Goldman, J., and Kennedy, T.E. (2011). Neuronal domains.



- Gomez, N., Winter, J.O., Shieh, F., Saunders, A.E., Korgel, B.A., and Schmidt, C.E. (2005). Challenges in quantum dot-neuron active interfacing. *Talanta* 67, 462-471.
- Gonias, S.L., and Campana, W.M. (2014). LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. *The American journal of pathology* 184, 18-27.
- Gordon, T. (2009). The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurgical focus* 26, E3.
- Gordon, T., and Gordon, K. (2010). Nerve regeneration in the peripheral nervous system versus the central nervous system and the relevance to speech and hearing after nerve injuries. *Journal of communication disorders* 43, 274-285.
- Goritz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., and Frisen, J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science (New York, NY)* 333, 238-242.
- Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 777-788.
- Grados-Munro, E.M., and Fournier, A.E. (2003). Myelin-associated inhibitors of axon regeneration. *Journal of neuroscience research* 74, 479-485.
- GrandPre, T., Li, S., and Strittmatter, S.M. (2002). Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417, 547-551.
- GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., and Strittmatter, S.M. (2000). Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403, 439-444.
- Graziadei, G.A., and Graziadei, P.P. (1979a). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of neurocytology* 8, 197-213.
- Graziadei, P.P., and Graziadei, G.A. (1979b). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *Journal of neurocytology* 8, 1-18.
- Griffiths, I.R., and McCulloch, M.C. (1983). Nerve fibres in spinal cord impact injuries. Part 1. Changes in the myelin sheath during the initial 5 weeks. *Journal of the neurological sciences* 58, 335-349.
- Gruss, H.J., and Dower, S.K. (1995). The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines and molecular therapy* 1, 75-105.
- Gudino-Cabrera, G., Pastor, A.M., de la Cruz, R.R., Delgado-Garcia, J.M., and Nieto-Sampedro, M. (2000). Limits to the capacity of transplants of olfactory glia to promote axonal growth in the CNS. *Neuroreport* 11, 467-471.
- Guerout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., and Marie, J.P. (2010). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58, 1570-1580.
- Gueye, Y., Ferhat, L., Sbai, O., Bianco, J., Ould-Yahoui, A., Bernard, A., Charrat, E., Chauvin, J.P., Risso, J.J., Feron, F., et al. (2011). Trafficking and secretion of matrix metalloproteinase-2 in olfactory ensheathing glial cells: A role in cell migration? *Glia* 59, 750-770.
- Guntinas-Lichius, O., Angelov, D.N., Tomov, T.L., Dramiga, J., Neiss, W.F., and Wewetzer, K. (2001). Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Experimental neurology* 172, 70-80.
- Guo, X., Gonzalez, M., Stancescu, M., Vandenberg, H.H., and Hickman, J.J. (2011). Neuro-

- muscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system. *Biomaterials* 32, 9602-9611.
- Habib, A.A., Marton, L.S., Allwardt, B., Gulcher, J.R., Mikol, D.D., Hognason, T., Chattopadhyay, N., and Stefansson, K. (1998). Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *Journal of neurochemistry* 70, 1704-1711.
- Haemmerli, G., Arnold, B., and Strauli, P. (1983). Cellular motility on glass and in tissues: similarities and dissimilarities. *Cell biology international reports* 7, 709-725.
- Hagino, S., Iseki, K., Mori, T., Zhang, Y., Hikake, T., Yokoya, S., Takeuchi, M., Hasimoto, H., Kikuchi, S., and Wanaka, A. (2003). Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia* 42, 130-138.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, NY)* 279, 509-514.
- Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. (2009). Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science* 122, 159-163.
- Harris, A.K., Stopak, D., and Wild, P. (1981). Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290, 249-251.
- Harris, A.K., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science (New York, NY)* 208, 177-179.
- Harunaga, J.S., and Yamada, K.M. (2011). Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 30, 363-368.
- Harvey, A., and Plant, G. (2006). Olfactory ensheathing glia and spinal cord injury: basic mechanisms to transplantation. *Future Neurol* 1, 453-463.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4, 61-85.
- Hefti, F. (1997). Neurotrophic factor therapy--keeping score. *Nature medicine* 3, 497-498.
- Hershenov, P.A.L., B (2010). Push it, pull it. *Nature* 470.
- Higginson, J.R., and Barnett, S.C. (2011). The culture of olfactory ensheathing cells (OECs)--a distinct glial cell type. *Experimental neurology* 229, 2-9.
- Hill, C.E., Beattie, M.S., and Bresnahan, J.C. (2001). Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Experimental neurology* 171, 153-169.
- Hisaoka, T., Morikawa, Y., Kitamura, T., and Senba, E. (2003). Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing mouse brain. *Brain research Developmental brain research* 143, 105-109.
- Hisaoka, T., Morikawa, Y., and Senba, E. (2006). Characterization of TROY/TNFRSF19/TAJ-expressing cells in the adult mouse forebrain. *Brain research* 1110, 81-94.
- Horner, P.J., and Gage, F.H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963-970.
- Horton, A.C., and Ehlers, M.D. (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40, 277-295.
- Houle, J.D., and Ye, J.H. (1997). Changes occur in the ability to promote axonal regeneration as the post-injury period increases. *Neuroreport* 8, 751-755.
- Howard, J., and Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753-758.



- Hu, F., and Strittmatter, S.M. (2008). The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 1262-1269.
- Huang, J.K., Phillips, G.R., Roth, A.D., Pedraza, L., Shan, W., Belkaid, W., Mi, S., Fex-Svenningsen, A., Florens, L., Yates, J.R., 3rd, et al. (2005). Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science (New York, NY)* 310, 1813-1817.
- Huang, Z.H., Wang, Y., Cao, L., Su, Z.D., Zhu, Y.L., Chen, Y.Z., Yuan, X.B., and He, C. (2008). Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay. *Cell research* 18, 479-490.
- Huang, Z.H., Wang, Y., Su, Z.D., Geng, J.G., Chen, Y.Z., Yuan, X.B., and He, C. (2011). Slit-2 repels the migration of olfactory ensheathing cells by triggering Ca<sup>2+</sup>-dependent cofilin activation and RhoA inhibition. *Journal of cell science* 124, 186-197.
- Huber, A.B., Weinmann, O., Brosamle, C., Oertle, T., and Schwab, M.E. (2002). Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 3553-3567.
- Hunt, D., Coffin, R.S., and Anderson, P.N. (2002). The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *Journal of neurocytology* 31, 93-120.
- Hunt, D., Coffin, R.S., Prinjha, R.K., Campbell, G., and Anderson, P.N. (2003). Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Molecular and cellular neurosciences* 24, 1083-1102.
- Hynes, R.O., and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a004903.
- Hyun, J.K., and Kim, H.W. (2010). Clinical and experimental advances in regeneration of spinal cord injury. *Journal of tissue engineering* 2010, 650857.
- Iozzo, R.V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual review of biochemistry* 67, 609-652.
- Iwashita, Y., Crang, A.J., and Blakemore, W.F. (2000). Redistribution of bisbenzimidazole Hoechst 33342 from transplanted cells to host cells. *Neuroreport* 11, 1013-1016.
- J.A.D.R (unpublished results1). Olfactory Ensheathing Cells & PLA Nanofibers
- J.A.D.R (unpublished results2). OECs & Like-Streams Migration.
- Jaalouk, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 63-73.
- Jagielska, A., Norman, A.L., Whyte, G., Vliet, K.J., Guck, J., and Franklin, R.J. (2012). Mechanical environment modulates biological properties of oligodendrocyte progenitor cells. *Stem cells and development* 21, 2905-2914.
- Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., and Moolenaar, W.H. (1994). Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *The Journal of cell biology* 126, 801-810.
- James, N.D., Bartus, K., Grist, J., Bennett, D.L., McMahon, S.B., and Bradbury, E.J. (2011). Conduction failure following spinal cord injury: functional and anatomical changes from acute to chronic stages. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 18543-18555.
- Jennett, B., and Lindsay, K. (1994). *An Introduction to Neurosurgery*.
- Jeong, S.I., Kwon, J.H., Lim, J.I., Cho, S.W.,

- Jung, Y., Sung, W.J., Kim, S.H., Kim, Y.H., Lee, Y.M., Kim, B.S., et al. (2005). Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds. *Biomaterials* 26, 1405-1411.
- Ji, B., Case, L.C., Liu, K., Shao, Z., Lee, X., Yang, Z., Wang, J., Tian, T., Shulga-Morskaya, S., Scott, M., et al. (2008a). Assessment of functional recovery and axonal sprouting in oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) null mice after spinal cord injury. *Molecular and cellular neurosciences* 39, 258-267.
- Ji, L., Lim, J., and Danuser, G. (2008b). Fluctuations of intracellular forces during cell protrusion. *Nature cell biology* 10, 1393-1400.
- Jin, Z., and Strittmatter, S.M. (1997). Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 6256-6263.
- Jones, L.L., Oudega, M., Bunge, M.B., and Tuszynski, M.H. (2001). Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *The Journal of physiology* 533, 83-89.
- Josephson, A., Trifunovski, A., Widmer, H.R., Widenfalk, J., Olson, L., and Spenger, C. (2002). Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *The Journal of comparative neurology* 453, 292-304.
- Kafitz, K.W., and Greer, C.A. (1999). Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* 25, 99-110.
- Kanagasabapathi, T.T., Massobrio, P., Barone, R.A., Tedesco, M., Martinoia, S., Wadman, W.J., and Decre, M.M. (2012). Functional connectivity and dynamics of cortical-thalamic networks co-cultured in a dual compartment device. *Journal of neural engineering* 9, 036010.
- Kanagasabapathi, T.T., Wang, K., Mellace, M., Ramakers, G.J., and Decre, M.M. (2009). Dual compartment neurofluidic system for electrophysiological measurements in physically isolated neuronal cell cultures. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference 2009*, 1655-1658.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., and Hudspeth, A. (2012). *Principles of Neural Science*, Fifth Edition edn.
- Keirstead, H.S., Hasan, S.J., Muir, G.D., and Steeves, J.D. (1992). Suppression of the onset of myelination extends the permissive period for the functional repair of embryonic spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 11664-11668.
- Kempf, A., Montani, L., Petrinovic, M.M., Schroeter, A., Weinmann, O., Patrignani, A., and Schwab, M.E. (2013). Upregulation of axon guidance molecules in the adult central nervous system of Nogo-A knockout mice restricts neuronal growth and regeneration. *The European journal of neuroscience* 38, 3567-3579.
- Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.
- Key, B., Treloar, H.B., Wangerek, L., Ford, M.D., and Nurcombe, V. (1996). Expression and localization of FGF-1 in the developing rat olfactory system. *The Journal of comparative neurology* 366, 197-206.
- Khosravi-Far, R., Campbell, S., Rossman, K.L., and Der, C.J. (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Advances in cancer research* 72, 57-107.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance re-

ceptors. *Cell* 92, 205-215.

Kim, H.J., Park, J.W., Byun, J.H., Vahidi, B., Rhee, S.W., and Jeon, N.L. (2012). Integrated microfluidics platforms for investigating injury and regeneration of CNS axons. *Annals of biomedical engineering* 40, 1268-1276.

Kim, S., and Coulombe, P.A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes & development* 21, 1581-1597.

Kim, S., Kim, H.J., and Jeon, N.L. (2010). Biological applications of microfluidic gradient devices. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2, 584-603.

Kitada, M., Chakraborty, S., Matsumoto, N., Taketomi, M., and Ide, C. (2001). Differentiation of choroid plexus ependymal cells into astrocytes after grafting into the pre-lesioned spinal cord in mice. *Glia* 36, 364-374.

Knoll, B., Weinl, C., Nordheim, A., and Bonhoeffer, F. (2007). Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. *Nature protocols* 2, 1216-1224.

Koch, D., Rosoff, W.J., Jiang, J., Geller, H.M., and Urbach, J.S. (2012). Strength in the periphery: growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. *Biophysical journal* 102, 452-460.

Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Senba, E., and Kitamura, T. (2000). TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *The Journal of biological chemistry* 275, 20742-20747.

Kolega, J. (1981). The movement of cell clusters in vitro: morphology and directionality. *Journal of cell science* 49, 15-32.

Koprivica, V., Cho, K.S., Park, J.B., Yiu, G.,

Atwal, J., Gore, B., Kim, J.A., Lin, E., Tessier-Lavigne, M., Chen, D.F., et al. (2005). EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science (New York, NY)* 310, 106-110.

Kott, J.N., Westrum, L.E., Raines, E.W., Sasahara, M., and Ross, R. (1994). Olfactory ensheathing glia and platelet-derived growth factor B-chain reactivity in the transplanted rat olfactory bulb. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 12, 315-323.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 15, 1942-1952.

Kruger, R.P., Aurandt, J., and Guan, K.L. (2005). Semaphorins command cells to move. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 789-800.

Kuhn, T.B., Brown, M.D., Wilcox, C.L., Raper, J.A., and Bamberg, J.R. (1999). Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of rac1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 1965-1975.

Kulesa, P.M., Bailey, C.M., Kasemeier-Kulesa, J.C., and McLennan, R. (2010). Cranial neural crest migration: new rules for an old road. *Developmental biology* 344, 543-554.

Kumar, R., Hayat, S., Felts, P., Bunting, S., and Wigley, C. (2005). Functional differences and interactions between phenotypic subpopulations of olfactory ensheathing cells in promoting CNS axonal regeneration. *Glia* 50, 12-20.

Kuo, C.W., Shiu, J.Y., Chien, F.C., Tsai, S.M., Chueh, D.Y., and Chen, P. (2010). Polymeric nanopillar arrays for cell traction force measurements. *Electrophoresis* 31, 3152-3158.

- Kury, P., Abankwa, D., Kruse, F., Greiner-Petter, R., and Muller, H.W. (2004). Gene expression profiling reveals multiple novel intrinsic and extrinsic factors associated with axonal regeneration failure. *The European journal of neuroscience* 19, 32-42.
- Kwok, J.C., Warren, P., and Fawcett, J.W. (2012). Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 582-586.
- Kwon, B.K., Tetzlaff, W., Grauer, J.N., Beiner, J., and Vaccaro, A.R. (2004). Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 4, 451-464.
- LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1999). Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annual review of cell and developmental biology* 15, 81-112.
- Lafrenie, R.M., and Yamada, K.M. (1996). Integrin-dependent signal transduction. *Journal of cellular biochemistry* 61, 543-553.
- Lai Wing Sun, K., Correia, J.P., and Kennedy, T.E. (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development (Cambridge, England)* 138, 2153-2169.
- Lakatos, A., Franklin, R.J., and Barnett, S.C. (2000). Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* 32, 214-225.
- Lammermann, T., and Sixt, M. (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Current opinion in cell biology* 21, 636-644.
- Lara Rodriguez, L., and Schneider, I.C. (2013). Directed cell migration in multi-cue environments. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 5, 1306-1323.
- Lasiecka, Z.M., Yap, C.C., Vakulenko, M., and Winckler, B. (2009). Compartmentalizing the neuronal plasma membrane from axon initial segments to synapses. *International review of cell and molecular biology* 272, 303-389.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Lee, G.Y., and Lim, C.T. (2007). Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends in biotechnology* 25, 111-118.
- Lee, I.H., Bulte, J.W., Schweinhardt, P., Douglas, T., Trifunovski, A., Hofstetter, C., Olson, L., and Spenger, C. (2004). In vivo magnetic resonance tracking of olfactory ensheathing glia grafted into the rat spinal cord. *Experimental neurology* 187, 509-516.
- Lee, J.K., Chan, A.F., Luu, S.M., Zhu, Y., Ho, C., Tessier-Lavigne, M., and Zheng, B. (2009). Re-assessment of corticospinal tract regeneration in Nogo-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 8649-8654.
- Lee, J.K., Geoffroy, C.G., Chan, A.F., Tolentino, K.E., Crawford, M.J., Leal, M.A., Kang, B., and Zheng, B. (2010). Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron* 66, 663-670.
- Legant, W.R., Miller, J.S., Blakely, B.L., Cohen, D.M., Genin, G.M., and Chen, C.S. (2010). Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nature methods* 7, 969-971.
- Leonardo, E.D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S.L., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386, 833-838.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science (New York, NY)* 237, 1154-1162.
- Li, J., and Lepski, G. (2013). Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review. *BioMed research international* 2013, 786475.

- Li, M., Shibata, A., Li, C., Braun, P.E., McKeeracher, L., Roder, J., Kater, S.B., and David, S. (1996). Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *Journal of neuroscience research* 46, 404-414.
- Li, S., Liu, B.P., Budel, S., Li, M., Ji, B., Walus, L., Li, W., Jirik, A., Rabacchi, S., Choi, E., et al. (2004a). Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 10511-10520.
- Li, Y., Carlstedt, T., Berthold, C.H., and Raisman, G. (2004b). Interaction of transplanted olfactory-ensheathing cells and host astrocytic processes provides a bridge for axons to regenerate across the dorsal root entry zone. *Experimental neurology* 188, 300-308.
- Li, Y., Field, P.M., and Raisman, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science (New York, NY)* 277, 2000-2002.
- Li, Y., Huang, G., Zhang, X., Wang, L., Du, Y., Lu, T.J., and Xu, F. (2014). Engineering cell alignment in vitro. *Biotechnology advances* 32, 347-365.
- Li, Y., Li, D., and Raisman, G. (2005). Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *Journal of neurocytology* 34, 343-351.
- Li, Y., and Raisman, G. (1994). Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14, 4050-4063.
- Liesi, P. (1985). Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *The EMBO journal* 4, 2505-2511.
- Linhardt, R.J., and Toida, T. (2004). Role of glycosaminoglycans in cellular communication. *Accounts of chemical research* 37, 431-438.
- Lipson, A.C., Widenfalk, J., Lindqvist, E., Ebenal, T., and Olson, L. (2003). Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Experimental neurology* 180, 167-171.
- Liu, X., Lu, Y., Zhang, Y., Li, Y., Zhou, J., Yuan, Y., Gao, X., Su, Z., and He, C. (2012). Slit2 regulates the dispersal of oligodendrocyte precursor cells via Fyn/RhoA signaling. *The Journal of biological chemistry* 287, 17503-17516.
- Lopez-Bendito, G., Flames, N., Ma, L., Fouquet, C., Di Meglio, T., Chedotal, A., Tessier-Lavigne, M., and Marin, O. (2007). Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 3395-3407.
- Lopez-Fagundo, C., Bar-Kochba, E., Livi, L.L., Hoffman-Kim, D., and Franck, C. (2014). Three-dimensional traction forces of Schwann cells on compliant substrates. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 11, 20140247.
- Lopez-Vales, R., Fores, J., Navarro, X., and Verdu, E. (2006). Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 24, 443-454.
- Lotan, M., Solomon, A., Ben-Bassat, S., and Schwartz, M. (1994). Cytokines modulate the inflammatory response and change permissiveness to neuronal adhesion in injured mammalian central nervous system. *Experimental neurology* 126, 284-290.
- Low, K., Culbertson, M., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., and Tuszynski, M.H. (2008). Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 1099-1108.



- Lu, K.W., Chen, Z.Y., Jin, D.D., Hou, T.S., Cao, L., and Fu, Q. (2002). Cationic liposome-mediated GDNF gene transfer after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 19, 1081-1090.
- Lu, P., Yang, H., Culbertson, M., Graham, L., Roskams, A.J., and Tuszynski, M.H. (2006a). Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 11120-11130.
- Lu, Y.B., Franze, K., Seifert, G., Steinhauser, C., Kirchhoff, F., Wolburg, H., Guck, J., Janmey, P., Wei, E.Q., Kas, J., et al. (2006b). Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17759-17764.
- Lledo, P.M., Alonso, M., and Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews Neuroscience* 7, 179-193.
- Ma, Y.H., Zhang, Y., Cao, L., Su, J.C., Wang, Z.W., Xu, A.B., and Zhang, S.C. (2010). Effect of neurotrophin-3 genetically modified olfactory ensheathing cells transplantation on spinal cord injury. *Cell transplantation* 19, 167-177.
- Mackay-Sim, A., and Kittel, P.W. (1991). On the Life Span of Olfactory Receptor Neurons. *The European journal of neuroscience* 3, 209-215.
- Mallik, R., and Gross, S.P. (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Current biology : CB* 14, R971-982.
- Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current opinion in cell biology* 7, 72-81.
- Manitt, C., Colicos, M.A., Thompson, K.M., Rousselle, E., Peterson, A.C., and Kennedy, T.E. (2001). Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 3911-3922.
- Mar, F.M., Bonni, A., and Sousa, M.M. (2014). Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO reports* 15, 254-263.
- Marin, O., Plump, A.S., Flames, N., Sanchez-Camacho, C., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2003). Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development (Cambridge, England)* 130, 1889-1901.
- Marin, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001834.
- Markus, A., Patel, T.D., and Snider, W.D. (2002). Neurotrophic factors and axonal growth. *Current opinion in neurobiology* 12, 523-531.
- Martinez, A., and Soriano, E. (2005). Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain research Brain research reviews* 49, 211-226.
- Martini, F.J., Valiente, M., Lopez Bedito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolmillos, M., and Marin, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development (Cambridge, England)* 136, 41-50.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 446-454.
- Mayor, R., and Carmona-Fontaine, C. (2010). Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends in cell biology* 20, 319-328.
- McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., and Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 11, 3398-3411.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J., and Braun, P.E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13, 805-811.
- Means, E.D., and Anderson, D.K. (1983). Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 42, 707-719.
- Mehta, N.R., Lopez, P.H., Vyas, A.A., and Schnaar, R.L. (2007). Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 27875-27886.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., and Smal, I. (2012). Methods for cell and particle tracking. *Methods in enzymology* 504, 183-200.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I., and van Cappellen, W.A. (2009). Tracking in cell and developmental biology. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 894-902.
- Mellitzer, G., Xu, Q., and Wilkinson, D.G. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400, 77-81.
- Meyvantsson, I., and Beebe, D.J. (2008). Cell culture models in microfluidic systems. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif)* 1, 423-449.
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., et al. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nature neuroscience* 7, 221-228.
- Mi, S., Miller, R.H., Lee, X., Scott, M.L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., et al. (2005). LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nature neuroscience* 8, 745-751.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et biophysica acta* 1830, 4719-4733.
- Miki, H., and Takenawa, T. (2003). Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *Journal of biochemistry* 134, 309-313.
- Mikol, D.D., Gulcher, J.R., and Stefansson, K. (1990). The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *The Journal of cell biology* 110, 471-479.
- Mikol, D.D., and Stefansson, K. (1988). A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *The Journal of cell biology* 106, 1273-1279.
- Millet, L.J., and Gillette, M.U. (2012). New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends in neurosciences* 35, 752-761.
- Mingorance, A., Soriano-Garcia, E., and del Rio, J.A. (2004). [Nogo-A functions during the development of the central nervous system and in the adult]. *Revista de neurologia* 39, 440-446.
- Miyaoka, Y., and Miyajima, A. (2013). To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell division* 8, 8.
- Miyata, S., Nishimura, Y., Hayashi, N., and Oohira, A. (2005). Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. *Neuroscience* 136, 95-104.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675-686.
- Montell, D.J. (2003). Border-cell migration: the race is on. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 13-24.



- Moreau-Fauvarque, C., Kumanogoh, A., Camand, E., Jaillard, C., Barbin, G., Boquet, I., Love, C., Jones, E.Y., Kikutani, H., Lubetzki, C., et al. (2003). The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 9229-9239.
- Moreno-Flores, M.T., and Avila, J. (2006). The quest to repair the damaged spinal cord. *Recent patents on CNS drug discovery* 1, 55-63.
- Moreno-Flores, M.T., Bovolenta, P., and Nieto-Sampedro, M. (1993). Polymorphonuclear leukocytes in brain parenchyma after injury and their interaction with purified astrocytes in culture. *Glia* 7, 146-157.
- Moreno-Flores, M.T., Bradbury, E.J., Martin-Bermejo, M.J., Agudo, M., Lim, F., Pastrana, E., Avila, J., Diaz-Nido, J., McMahon, S.B., and Wandosell, F. (2006). A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 598-608.
- Morgenstern, D.A., Asher, R.A., and Fawcett, J.W. (2002). Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Progress in brain research* 137, 313-332.
- Morikawa, Y., Hisaoka, T., Kitamura, T., and Senba, E. (2008). TROY, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1126, A1-10.
- Morin, N.A., Oakes, P.W., Hyun, Y.M., Lee, D., Chin, Y.E., King, M.R., Springer, T.A., Shi-maoka, M., Tang, J.X., Reichner, J.S., et al. (2008). Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA-1 de-adhesion during T lymphocyte migration. *The Journal of experimental medicine* 205, 195-205.
- Moshayedi, P., Costa Lda, F., Christ, A., Lacour, S.P., Fawcett, J., Guck, J., and Franze, K. (2010). Mechanosensitivity of astrocytes on optimized polyacrylamide gels analyzed by quantitative morphometry. *Journal of physics Condensed matter : an Institute of Physics journal* 22, 194114.
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R., and Filbin, M.T. (1994). A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13, 757-767.
- Murase, S., and Horwitz, A.F. (2004). Directions in cell migration along the rostral migratory stream: the pathway for migration in the brain. *Current topics in developmental biology* 61, 135-152.
- Navarro, X., Valero, A., Gudino, G., Fores, J., Rodriguez, F.J., Verdu, E., Pascual, R., Cuadras, J., and Nieto-Sampedro, M. (1999). Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Annals of neurology* 45, 207-215.
- Naya, F.J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J.A., Williams, R.S., and Olson, E.N. (2000). Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *The Journal of biological chemistry* 275, 4545-4548.
- Nedelec, S., Dubacq, C., and Trembleau, A. (2005). Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *Journal of neurocytology* 34, 49-64.
- Neukomm, L.J., and Freeman, M.R. (2014). Diverse cellular and molecular modes of axon degeneration. *Trends in cell biology* 24, 515-523.
- Neumann, S., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., and Basbaum, A.I. (2002). Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34, 885-893.
- Nguyen Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Marillat, V., Kidd, T., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M.,

- Sotelo, C., and Chedotal, A. (1999). Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22, 463-473.
- Nieto-Sampedro, M. (2003). Central nervous system lesions that can and those that cannot be repaired with the help of olfactory bulb ensheathing cell transplants. *Neurochemical research* 28, 1659-1676.
- Nikulina, E., Tidwell, J.L., Dai, H.N., Bregman, B.S., and Filbin, M.T. (2004). The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8786-8790.
- Nobes, C.D., and 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.
- Nocentini, S., Reginensi, D., Garcia, S., Carulla, P., Moreno-Flores, M.T., Wandosell, F., Trepat, X., Bribian, A., and del Rio, J.A. (2012). Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 1689-1703.
- Norton, W.T., and Poduslo, S.E. (1973). Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *Journal of neurochemistry* 21, 759-773.
- O'Toole, D.A., West, A.K., and Chuah, M.I. (2007). Effect of olfactory ensheathing cells on reactive astrocytes in vitro. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 1303-1309.
- Oertle, T., and Schwab, M.E. (2003). Nogo and its paRTNers. *Trends in cell biology* 13, 187-194.
- Oertle, T., van der Haar, M.E., Bandtlow, C.E., Robeva, A., Burfeind, P., Buss, A., Huber, A.B., Simonen, M., Schnell, L., Brosamle, C., et al. (2003). Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 5393-5406.
- Orlando, K., and Guo, W. (2009). Membrane organization and dynamics in cell polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a001321.
- Oudega, M., and Xu, X.M. (2006). Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *Journal of neurotrauma* 23, 453-467.
- Ould-Yahoui, A., Sbai, O., Baranger, K., Bernard, A., Gueye, Y., Charrat, E., Clement, B., Gignes, D., Dive, V., Girard, S.D., et al. (2013). Role of matrix metalloproteinases in migration and neurotrophic properties of nasal olfactory stem and ensheathing cells. *Cell transplantation* 22, 993-1010.
- Paluch, E.K., and Raz, E. (2013). The role and regulation of blebs in cell migration. *Current opinion in cell biology* 25, 582-590.
- Parent, C.A., and Devreotes, P.N. (1999). A cell's sense of direction. *Science (New York, NY)* 284, 765-770.
- Park, J.B., Yiu, G., Kaneko, S., Wang, J., Chang, J., He, X.L., Garcia, K.C., and He, Z. (2005). A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45, 345-351.
- Pasterkamp, R.J., Ruitenberg, M.J., and Verhaagen, J. (1999). Semaphorins and their receptors in olfactory axon guidance. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 45, 763-779.
- Pasterkamp, R.J., and Verhaagen, J. (2006). Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361, 1499-1511.
- Pearse, D.D., Sanchez, A.R., Pereira, F.C., An-

- drade, C.M., Puzis, R., Pressman, Y., Golden, K., Kitay, B.M., Blits, B., Wood, P.M., et al. (2007). Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia* 55, 976-1000.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., and Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience letters* 565, 30-38.
- Pellitteri, R., Spatuzza, M., Stanzani, S., and Zaccheo, D. (2010). Biomarkers expression in rat olfactory ensheathing cells. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2, 289-298.
- Perry, E.C., 3rd, Ahmed, H.M., and Oritano, T.C. (2014). *Neurotraumatology. Handbook of clinical neurology* 121, 1751-1772.
- Perry, V.H., Andersson, P.B., and Gordon, S. (1993). Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends in neurosciences* 16, 268-273.
- Petit, V., and Thiery, J.P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 92, 477-494.
- Petrie, R.J., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 538-549.
- Pignot, V., Hein, A.E., Barske, C., Wiessner, C., Walmsley, A.R., Kaupmann, K., Mayeur, H., Sommer, B., Mir, A.K., and Frenzel, S. (2003). Characterization of two novel proteins, NgRH1 and NgRH2, structurally and biochemically homologous to the Nogo-66 receptor. *Journal of neurochemistry* 85, 717-728.
- Pixley, S.K. (1992). The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia* 5, 269-284.
- Plotnikov, S.V., and Waterman, C.M. (2013). Guiding cell migration by tugging. *Current opinion in cell biology* 25, 619-626.
- Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33, 219-232.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Polleux, F., and Snider, W. (2010). Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001925.
- Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, A., and Silberzan, P. (2007). Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15988-15993.
- Prieto, M., Chauvet, N., and Alonso, G. (2000). Tanycytes transplanted into the adult rat spinal cord support the regeneration of lesioned axons. *Experimental neurology* 161, 27-37.
- Prinjha, R., Moore, S.E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D.L., and Walsh, F.S. (2000). Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403, 383-384.
- Properzi, F., Asher, R.A., and Fawcett, J.W. (2003). Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochemical Society transactions* 31, 335-336.
- Puklin-Faucher, E., and Sheetz, M.P. (2009). The mechanical integrin cycle. *Journal of cell science* 122, 179-186.
- Qian, H. (2000). Single-particle tracking: Brownian dynamics of viscoelastic materials. *Biophysical journal* 79, 137-143.
- Quarles, R.H. (2009). A hypothesis about the relationship of myelin-associated glycoprotein's

- function in myelinated axons to its capacity to inhibit neurite outgrowth. *Neurochemical research* 34, 79-86.
- Quinn, C.C., and Wadsworth, W.G. (2008). Axon guidance: asymmetric signaling orients polarized outgrowth. *Trends in cell biology* 18, 597-603.
- Raisman, G. (2003). A promising therapeutic approach to spinal cord repair. *Journal of the Royal Society of Medicine* 96, 259-261.
- Raisman, G., Barnett, S.C., and Ramon-Cueto, A. (2012). Repair of central nervous system lesions by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Handbook of clinical neurology* 109, 541-549.
- Ramer, L.M., Au, E., Richter, M.W., Liu, J., Tetzlaff, W., and Roskams, A.J. (2004a). Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *The Journal of comparative neurology* 473, 1-15.
- Ramer, L.M., Richter, M.W., Roskams, A.J., Tetzlaff, W., and Ramer, M.S. (2004b). Peripherally-derived olfactory ensheathing cells do not promote primary afferent regeneration following dorsal root injury. *Glia* 47, 189-206.
- Ramer, M.S., Priestley, J.V., and McMahon, S.B. (2000). Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* 403, 312-316.
- Ramon-Cueto, A., and Nieto-Sampedro, M. (1992). Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47, 213-220.
- Ramon-Cueto, A., and Nieto-Sampedro, M. (1994). Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Experimental neurology* 127, 232-244.
- Ramon-Cueto, A., Perez, J., and Nieto-Sampedro, M. (1993). In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *The European journal of neuroscience* 5, 1172-1180.
- Ramon-Cueto, A., Plant, G.W., Avila, J., and Bunge, M.B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 3803-3815.
- Ramon-Cueto, A., and Valverde, F. (1995). Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* 14, 163-173.
- Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velan, G.J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., et al. (1998). Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nature medicine* 4, 814-821.
- Raper, J.A. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Current opinion in neurobiology* 10, 88-94.
- Reginensi, D., Carulla, P., Nocentini, S., Seira, O., Serra-Picamal, X., Torres-Espín, A., Gavín, R., Moreno-Torres, M., Wandosell, F., Samitier, J., et al. (Submitted). Increased migratory potential of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord. *PNAS*.
- Reier, P.J., Perlow, M.J., and Guth, L. (1983). Development of embryonic spinal cord transplants in the rat. *Brain research* 312, 201-219.
- Rela, L., Bordey, A., and Greer, C.A. (2010). Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* 58, 665-678.
- Renkawitz, J., Schumann, K., Weber, M., Lammermann, T., Pflücke, H., Piel, M., Polleux, J., Spatz, J.P., and Sixt, M. (2009). Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nature cell biology* 11, 1438-1443.

- Renkawitz, J., and Sixt, M. (2010). Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *EMBO reports* 11, 744-750.
- Resnick, D.K., Cechvala, C.F., Yan, Y., Witwer, B.P., Sun, D., and Zhang, S. (2003). Adult olfactory ensheathing cell transplantation for acute spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 20, 279-285.
- Richter, M., Westendorf, K., and Roskams, A.J. (2008). Culturing olfactory ensheathing cells from the mouse olfactory epithelium. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 438, 95-102.
- Richter, M.W., Fletcher, P.A., Liu, J., Tetzlaff, W., and Roskams, A.J. (2005). Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 10700-10711.
- Ridley, A.J. (2004). Pulling back to move forward. *Cell* 116, 357-358.
- Ridley, A.J., and 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, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods* 5, 605-607.
- Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M., and Waterman-Storer, C.M. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature cell biology* 5, 599-609.
- Roet, K.C., and Verhaagen, J. (2014). Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheathing cells. *Experimental neurology*.
- Roitbak, T., and Sykova, E. (1999). Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia* 28, 40-48.
- Roloff, F., Ziege, S., Baumgartner, W., Wewetzer, K., and Bicker, G. (2013). Schwann cell-free adult canine olfactory ensheathing cell preparations from olfactory bulb and mucosa display differential migratory and neurite growth-promoting properties in vitro. *BMC neuroscience* 14, 141.
- Rolls, A., Shechter, R., and Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature reviews Neuroscience* 10, 235-241.
- Rorth, P. (2012). Fellow travellers: emergent properties of collective cell migration. *EMBO reports* 13, 984-991.
- Rubio, M.P., Munoz-Quiles, C., and Ramon-Cueto, A. (2008). Adult olfactory bulbs from primates provide reliable ensheathing glia for cell therapy. *Glia* 56, 539-551.
- Ruitenber, M.J., Levison, D.B., Lee, S.V., Verhaagen, J., Harvey, A.R., and Plant, G.W. (2005). NT-3 expression from engineered olfactory ensheathing glia promotes spinal sparing and regeneration. *Brain : a journal of neurology* 128, 839-853.
- Ruitenber, M.J., Plant, G.W., Christensen, C.L., Blits, B., Niclou, S.P., Harvey, A.R., Boer, G.J., and Verhaagen, J. (2002). Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene therapy* 9, 135-146.
- Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64, 867-869.
- Salbreux, G., Charras, G., and Paluch, E. (2012). Actin cortex mechanics and cellular morpho-



- genesis. *Trends in cell biology* 22, 536-545.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L.B., Butt, A., and Logan, A. (2004). Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46, 225-251.
- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual review of neuroscience* 22, 389-442.
- Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Yamashita, N., Nakamura, F., Arie, Y., Kawasaki, T., Hirata, T., Abe, T., et al. (2011). Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science (New York, NY)* 333, 769-773.
- Saxton, M.J., and Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 26, 373-399.
- Scott, G. (2003). *Development Biology*, 7th edn. Schachner, M., and Bartsch, U. (2000). Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 29, 154-165.
- Schaeffer, L., de Kerchove d'Exaerde, A., and Changeux, J.P. (2001). Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron* 31, 15-22.
- Schmidt, A., and Hall, M.N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual review of cell and developmental biology* 14, 305-338.
- Schnell, L., and Schwab, M.E. (1990). Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343, 269-272.
- Schwab, J.M., Bernard, F., Moreau-Fauvarque, C., and Chedotal, A. (2005). Injury reactive myelin/oligodendrocyte-derived axon growth inhibition in the adult mammalian central nervous system. *Brain research Brain research reviews* 49, 295-299.
- Schwab, J.M., Brechtel, K., Mueller, C.A., Failli, V., Kaps, H.P., Tuli, S.K., and Schluesener, H.J. (2006). Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Progress in neurobiology* 78, 91-116.
- Schwab, M.E., and Caroni, P. (1988). Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8, 2381-2393.
- Schwartz, N.B., and Domowicz, M. (2004). Proteoglycans in brain development. *Glycoconjugate journal* 21, 329-341.
- Selzer, M.E. (2003). Promotion of axonal regeneration in the injured CNS. *Lancet neurology* 2, 157-166.
- Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffmann, E., and Martin, G.R. (1982). Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. *The Journal of cell biology* 92, 584-588.
- Shao, Z., Browning, J.L., Lee, X., Scott, M.L., Shulga-Morskaya, S., Allaire, N., Thill, G., Levesque, M., Sah, D., McCoy, J.M., et al. (2005). TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 45, 353-359.
- Sharma, K., Selzer, M.E., and Li, S. (2012). Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS. *Experimental neurology* 237, 370-378.
- Shearer, M.C., Niclou, S.P., Brown, D., Asher, R.A., Holtmaat, A.J., Levine, J.M., Verhaagen, J., and Fawcett, J.W. (2003). The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signaling pathways. *Molecular and cellular neurosciences* 24, 913-925.
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre,



- G., and Poo, M.M. (2007). LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565-577.
- Shen, Y., Tenney, A.P., Busch, S.A., Horn, K.P., Cuascut, F.X., Liu, K., He, Z., Silver, J., and Flanagan, J.G. (2009). PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science (New York, NY)* 326, 592-596.
- Shi, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112, 63-75.
- Shimizu, I., Oppenheim, R.W., O'Brien, M., and Shneiderman, A. (1990). Anatomical and functional recovery following spinal cord transection in the chick embryo. *Journal of neurobiology* 21, 918-937.
- Silver, J., and Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews Neuroscience* 5, 146-156.
- Simon, A., and Tanaka, E.M. (2013). Limb regeneration. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 2, 291-300.
- Simonen, M., Pedersen, V., Weinmann, O., Schnell, L., Buss, A., Ledermann, B., Christ, F., Sangsig, G., van der Putten, H., and Schwab, M.E. (2003). Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38, 201-211.
- Simpson, S.B., Jr. (1968). Morphology of the regenerated spinal cord in the lizard, *Anolis carolinensis*. *The Journal of comparative neurology* 134, 193-210.
- Small, J.V., and Kaverina, I. (2003). Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Current opinion in cell biology* 15, 40-47.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends in cell biology* 12, 112-120.
- Sniadecki, N.J., Desai, R.A., Ruiz, S.A., and Chen, C.S. (2006). Nanotechnology for cell-substrate interactions. *Annals of biomedical engineering* 34, 59-74.
- Snow, D.M., Lemmon, V., Carrino, D.A., Caplan, A.I., and Silver, J. (1990). Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Experimental neurology* 109, 111-130.
- Sofroniew, M.V. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 11, 400-407.
- Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. (1998). Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science (New York, NY)* 281, 1515-1518.
- Song, H., and Poo, M. (2001). The cell biology of neuronal navigation. *Nature cell biology* 3, E81-88.
- Sonigra, R.J., Brighton, P.C., Jacoby, J., Hall, S., and Wigley, C.B. (1999). Adult rat olfactory nerve ensheathing cells are effective promoters of adult central nervous system neurite outgrowth in coculture. *Glia* 25, 256-269.
- Southam, K.A., King, A.E., Blizzard, C.A., McCormack, G.H., and Dickson, T.C. (2013). Microfluidic primary culture model of the lower motor neuron-neuromuscular junction circuit. *Journal of neuroscience methods* 218, 164-169.
- Spillmann, A.A., Bandtlow, C.E., Lottspeich, F., Keller, F., and Schwab, M.E. (1998). Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220). *The Journal of biological chemistry* 273, 19283-19293.
- Squires, T. (2005). *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. Review of Modern physics*, vol 77
- Steiner, P., Kulangara, K., Sarria, J.C., Glauser,

- L., Regazzi, R., and Hirling, H. (2004). Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *Journal of neurochemistry* 89, 569-580.
- Steuble, M., Gerrits, B., Ludwig, A., Mateos, J.M., Diep, T.M., Tagaya, M., Stephan, A., Schatzle, P., Kunz, B., Streit, P., et al. (2010). Molecular characterization of a trafficking organelle: dissecting the axonal paths of calyculin-1 transport vesicles. *Proteomics* 10, 3775-3788.
- Steward, O., Sharp, K., Yee, K.M., and Hofstadter, M. (2008). A re-assessment of the effects of a Nogo-66 receptor antagonist on regenerative growth of axons and locomotor recovery after spinal cord injury in mice. *Experimental neurology* 209, 446-468.
- Stiles, T.L., Dickendesher, T.L., Gaultier, A., Fernandez-Castaneda, A., Mantuano, E., Giger, R.J., and Gonias, S.L. (2013). LDL receptor-related protein-1 is a sialic-acid-independent receptor for myelin-associated glycoprotein that functions in neurite outgrowth inhibition by MAG and CNS myelin. *Journal of cell science* 126, 209-220.
- Straley, K.S., Foo, C.W., and Heilshorn, S.C. (2010). Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *Journal of neurotrauma* 27, 1-19.
- Strickland, D.K., Gonias, S.L., and Argraves, W.S. (2002). Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13, 66-74.
- Su, Z., Cao, L., Zhu, Y., Liu, X., Huang, Z., Huang, A., and He, C. (2007). Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *Journal of cell science* 120, 1877-1887.
- Su, Z., Yuan, Y., Chen, J., Cao, L., Zhu, Y., Gao, L., Qiu, Y., and He, C. (2009). Reactive astrocytes in glial scar attract olfactory ensheathing cells migration by secreted TNF-alpha in spinal cord lesion of rat. *PloS one* 4, e8141.
- Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., Huber, J., Szarek, D., Okurowski, S., Szewczyk, P., et al. (2013). Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell transplantation*.
- Takami, T., Oudega, M., Bates, M.L., Wood, P.M., Kleitman, N., and Bunge, M.B. (2002). Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 6670-6681.
- Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 37-48.
- Tanaka, E.M., and Ferretti, P. (2009). Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 10, 713-723.
- Tanaka, E.M., and Reddien, P.W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. *Developmental cell* 21, 172-185.
- Tang, S., Qiu, J., Nikulina, E., and Filbin, M.T. (2001). Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration. *Molecular and cellular neurosciences* 18, 259-269.
- Tang, S., Woodhall, R.W., Shen, Y.J., deBellard, M.E., Saffell, J.L., Doherty, P., Walsh, F.S., and Filbin, M.T. (1997). Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *Molecular and cellular neurosciences* 9, 333-346.
- Tator, C.H., and Fehlings, M.G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery* 75, 15-26.
- Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., and Jeon, N.L.

- (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nature methods* 2, 599-605.
- Taylor, A.M., Dieterich, D.C., Ito, H.T., Kim, S.A., and Schuman, E.M. (2010). Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron* 66, 57-68.
- Tee, S.Y., Bausch, A.R., and Janmey, P.A. (2009). The mechanical cell. *Current biology : CB* 19, R745-748.
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A.G., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336, 775-778.
- Thomas, R., Favell, K., Morante-Redolat, J., Pool, M., Kent, C., Wright, M., Daignault, K., Ferraro, G.B., Montcalm, S., Durocher, Y., et al. (2010). LGI1 is a Nogo receptor 1 ligand that antagonizes myelin-based growth inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 6607-6612.
- Thumkeo, D., Watanabe, S., and Narumiya, S. (2013). Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *European journal of cell biology* 92, 303-315.
- Thuret, S., Moon, L.D., and Gage, F.H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature reviews Neuroscience* 7, 628-643.
- Tisay, K.T., and Key, B. (1999). The extracellular matrix modulates olfactory neurite outgrowth on ensheathing cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 9890-9899.
- Tong, Z., Seira, O., Reginensi, D., Casas, C., Homs, A., Samitier, J., and Del Rio, J. (Submitted). Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip.
- Tozaki, H., Kawasaki, T., Takagi, Y., and Hirata, T. (2002). Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain research Molecular brain research* 104, 111-119.
- Trapp, B.D. (1990). Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 605, 29-43.
- Treloar, H.B., Nurcombe, V., and Key, B. (1996). Expression of extracellular matrix molecules in the embryonic rat olfactory pathway. *Journal of neurobiology* 31, 41-55.
- Tuszynski, M.H. (1997). Gene therapy for nervous system disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 835, 1-11.
- Tuszynski, M.H., and Steward, O. (2012). Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* 74, 777-791.
- Umemori, H., Linhoff, M.W., Ornitz, D.M., and Sanes, J.R. (2004). FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell* 118, 257-270.
- Valiente, M., and Marin, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Current opinion in neurobiology* 20, 68-78.
- van den Pol, A.N., and Santarelli, J.G. (2003). Olfactory ensheathing cells: time lapse imaging of cellular interactions, axonal support, rapid morphologic shifts, and mitosis. *The Journal of comparative neurology* 458, 175-194.
- Varela, F. (1995). The emergent self. Extract from *The Third Culture: Beyond the Scientific Revolution* by John Brockman Chapter 12.
- Varela, F.G., Maturana, H.R., and Uribe, R. (1974). Autopoiesis: the organization of living systems, its characterization and a model. *Currents in modern biology* 5, 187-196.
- Varma, A.K., Das, A., Wallace, G.t., Barry, J., Vertegel, A.A., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2013). Spinal cord injury: a review of current

- therapy, future treatments, and basic science frontiers. *Neurochemical research* 38, 895-905.
- Venkatesh, K., Chivatakarn, O., Lee, H., Joshi, P.S., Kantor, D.B., Newman, B.A., Mage, R., Rader, C., and Giger, R.J. (2005). The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 808-822.
- Venugopal, J.R., Zhang, Y., and Ramakrishna, S. (2006). In vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone collagen nanofibrous membrane. *Artificial organs* 30, 440-446.
- Verdu, E., Garcia-Alias, G., Fores, J., Gudino-Cabrera, G., Muneton, V.C., Nieto-Sampedro, M., and Navarro, X. (2001). Effects of ensheathing cells transplanted into photochemically damaged spinal cord. *Neuroreport* 12, 2303-2309.
- Verdu, E., Garcia-Alias, G., Fores, J., Lopez-Vales, R., and Navarro, X. (2003). Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia* 42, 275-286.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 778-790.
- Vincent, A.J., West, A.K., and Chuah, M.I. (2005). Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *Journal of neurocytology* 34, 65-80.
- Vinson, M., Strijbos, P.J., Rowles, A., Facci, L., Moore, S.E., Simmons, D.L., and Walsh, F.S. (2001). Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *The Journal of biological chemistry* 276, 20280-20285.
- Vitriol, E.A., and Zheng, J.Q. (2012). Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* 73, 1068-1081.
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 124, 573-586.
- Volpi, N., and Tarugi, P. (1999). Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate. *Journal of biochemistry* 125, 297-304.
- Vourc'h, P., and Andres, C. (2004). Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp): evolution, structure and function. *Brain research Brain research reviews* 45, 115-124.
- Vukovic, J., Ruitenber, M.J., Roet, K., Franssen, E., Arulpragasam, A., Sasaki, T., Verhaagen, J., Harvey, A.R., Busfield, S.J., and Plant, G.W. (2009). The glycoprotein fibulin-3 regulates morphology and motility of olfactory ensheathing cells in vitro. *Glia* 57, 424-443.
- Vyas, A.A., Patel, H.V., Fromholt, S.E., Heffer-Laue, M., Vyas, K.A., Dang, J., Schachner, M., and Schnaar, R.L. (2002). Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8412-8417.
- Vyas, A.A., and Schnaar, R.L. (2001). Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration. *Biochimie* 83, 677-682.
- Wang, J., Ren, L., Li, L., Liu, W., Zhou, J., Yu, W., Tong, D., and Chen, S. (2009). Microfluidics: a new cosset for neurobiology. *Lab on a chip* 9, 644-652.
- Wang, J.J., Chuah, M.I., Yew, D.T., Leung, P.C.,

- and Tsang, D.S. (1995). Effects of astrocyte implantation into the hemisectioned adult rat spinal cord. *Neuroscience* 65, 973-981.
- Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L., and He, Z. (2002a). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417, 941-944.
- Wang, X., Chun, S.J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C.A., and Strittmatter, S.M. (2002b). Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 5505-5515.
- Wang, Y., and Huang, Z.H. (2012). Morphological phenotypes of olfactory ensheathing cells display different migratory responses upon Slit-2. *Experimental cell research* 318, 1889-1900.
- Watari, A., and Yutsudo, M. (2003). Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4: apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8, 5-9.
- Wehrle, R., Camand, E., Chedotal, A., Sotelo, C., and Dusart, I. (2005). Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. *The European journal of neuroscience* 22, 2134-2144.
- Weiner, O.D. (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Current opinion in cell biology* 14, 196-202.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368-373.
- Wilson, I.B. (2004). The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61, 794-809.
- Windle, W.F., and Chambers, W.W. (1950). Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. *The Journal of comparative neurology* 93, 241-257.
- Windus, L.C., Claxton, C., Allen, C.L., Key, B., and St John, J.A. (2007). Motile membrane protrusions regulate cell-cell adhesion and migration of olfactory ensheathing glia. *Glia* 55, 1708-1719.
- Windus, L.C., Lineburg, K.E., Scott, S.E., Claxton, C., Mackay-Sim, A., Key, B., and St John, J.A. (2010). Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 1735-1750.
- Winton, M.J., Dubreuil, C.I., Lasko, D., Leclerc, N., and McKerracher, L. (2002). Characterization of new cell permeable C3-like proteins that inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth on inhibitory substrates. *The Journal of biological chemistry* 277, 32820-32829.
- Winzeler, A.M., Mandemakers, W.J., Sun, M.Z., Stafford, M., Phillips, C.T., and Barres, B.A. (2011). The lipid sulfatide is a novel myelin-associated inhibitor of CNS axon outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 6481-6492.
- Woodhall, E., West, A.K., and Chuah, M.I. (2001). Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain research Molecular brain research* 88, 203-213.
- Worter, V., Schweigreiter, R., Kinzel, B., Mueller, M., Barske, C., Bock, G., Frentzel, S., and Bandtlow, C.E. (2009). Inhibitory activity of myelin-associated glycoprotein on sensory neurons is largely independent of NgR1 and NgR2 and resides within Ig-Like domains 4 and 5. *PloS one* 4, e5218.
- Wozniak, M.A., and Chen, C.S. (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 34-43.
- Wu, H., Xiong, W.C., and Mei, L. (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*



(Cambridge, England) 137, 1017-1033.

Xie, J., MacEwan, M.R., Schwartz, A.G., and Xia, Y. (2010). Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale* 2, 35-44.

Xu, N.J., and Henkemeyer, M. (2009). Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nature neuroscience* 12, 268-276.

Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., and Wilkinson, D.G. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 399, 267-271.

Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., and Suzuki, S. (1968). Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *The Journal of biological chemistry* 243, 1523-1535.

Yan, P., Li, Q., Kim, G.M., Xu, J., Hsu, C.Y., and Xu, X.M. (2001). Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *Journal of neurotrauma* 18, 563-568.

Yang, X.F., Wang, H., and Wen, L. (2011). From myelin debris to inflammatory responses: a vicious circle in diffuse axonal injury. *Medical hypotheses* 77, 60-62.

Yim, S.H., and Quarles, R.H. (1992). Biosynthesis and expression of the myelin-associated glycoprotein in cultured oligodendrocytes from adult bovine brain. *Journal of neuroscience research* 33, 370-378.

Yiu, G., and He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature reviews Neuroscience* 7, 617-627.

Young, W., and Koreh, I. (1986). Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain research* 365, 42-53.

Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., and Chedotal, A. (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development*

(Cambridge, England) 137, 1939-1952.

Yucel, D., Kose, G.T., and Hasirci, V. (2010). Polyester based nerve guidance conduit design. *Biomaterials* 31, 1596-1603.

Zamir, E., and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* 114, 3583-3590.

Zhang, L., and Esko, J.D. (1994). Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *The Journal of biological chemistry* 269, 19295-19299.

Zhang, L., Zheng, S., Wu, H., Wu, Y., Liu, S., Fan, M., and Zhang, J. (2009). Identification of BLYS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 6348-6352.

Zhang, S., Zhang, Q., Zhang, J.H., and Qin, X. (2008). NgR acts as an inhibitor to axonal regeneration in adults. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 2030-2040.

Zheng, B., Atwal, J., Ho, C., Case, L., He, X.L., Garcia, K.C., Steward, O., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1205-1210.

Zuo, J., Neubauer, D., Dyess, K., Ferguson, T.A., and Muir, D. (1998). Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Experimental neurology* 154, 654-662.

Zurn, A.D., Nick, H., and Monard, D. (1988). A glia-derived nexin promotes neurite outgrowth in cultured chick sympathetic neurons. *Developmental neuroscience* 10, 17-24.





## Informe factor de impacto

Con la presente, hago constar el factor de impacto correspondiente a las revistas asociados a los artículos científicos que conforman la Tesis Doctoral presentada por Diego Reginensi para optar a Doctor en Biomedicina por la Universidad de Barcelona, España.

### Capítulo I: “Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy.”

Authors: Nocentini S\*, Reginensi D\*, García S, Carulla P, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Trepas X, Bribian A, del Río JA.

Published in: Cellular and Molecular Life Science. 2012 May;69(10):1689-703.

doi: 10.1007/s00018-011-0893-1. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22205212

*Nocentini S. and Reginensi D. contributed equally to this study\**

**FACTOR DE IMPACTO: 5.893**

### Capítulo II: “Increased migratory potential of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord.”

Authors: Reginensi D, Carulla P, Nocentini S, Seira , Serra-Picamal X, Torres-Espín A, Gavín R, Moreno-Torres M, Wandosell F, Samitier J, Trepas X, Navarro X, Del Río JA.

Accepted in: Cellular and Molecular Life Science (CMLS).

**FACTOR DE IMPACTO: 5.893**

### Capítulo III: “Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip.”

Authors: Tong Z, Seira O, Reginensi D, Casas C, Homs A, Samitier J and Del Río JA.

Published in: RSC Adv., 2014,4, 54788-54797

doi: 10.1039/C4RA10219C. Received 11 Sep 2014, Accepted 17 Oct 2014

**FACTOR DE IMPACTO: 3.807**



**Director de Tesis**

Dr. José Antonio del Río Fernández



De: "Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)" <em@editorialmanager.com>  
Para: José Antonio Del Río <jadelrio@ibecbarcelona.eu>  
Fecha: 17 de febrero de 2015.

Your manuscript entitled **Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord**  
**"Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)"** <cmlsedit@springer.com>  
CC: cmlsedit@springer.com

Ref.: Ms. No. CMLS-D-14-01055R1

*Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord*  
*Cellular and Molecular Life Sciences*

Dear Prof. del Río,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Cellular and Molecular Life Sciences.

Your article will now be handed over to the production department and typeset within the next three to four weeks. Then you will receive the proofs for correction. Kindly let us know if you cannot be reached at the above-mentioned e-mail address during that time.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

*Johannes Korn*  
*on behalf of Klaus Eichmann*  
*Editor-in-Chief*  
*Cellular and Molecular Life Sciences*  
*Springer Basel AG*  
*Picassoplatz 4*  
*CH-4052 Basel*  
*T+41.61.205 07 69*  
*F+41.61.205 07 99*

*cmlsedit@springer.com*  
*www.springer.com/18*



## Informe de participación.

El Dr. José Antonio del Río Fernández director de la Tesis Doctoral: “Modulación de las propiedades migratorias de las células de la glia envolvente olfatoria” elaborada por Diego Reginensi, informan la participación del doctorando en los artículos científicos que conforman la tesis ha sido la siguiente:

En el artículo titulado: **“Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy”** publicado en *Cellular and Molecular Life Science (CMLS)* ha participado como co-autor principal en el diseño experimental y el desarrollo de los mismos. El doctorando ha desarrollado el trabajo experimental de videomicroscopía en tiempo real y microscopía de fuerza de tracción.

Este artículo ha sido utilizado en la Tesis Doctoral con título: “Potencial of genetically modified ensheathing cells for regeneration after spinal cord injury” elaborada por Sara Nocentini para optar al grado de Doctor en Biomedicina por la Universidad de Barcelona, España.

En el artículo titulado: **“Increased migratory potential of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord”** aceptado en *Cellular and Molecular Life Science (CMLS)* ha participado como autor principal en el diseño y el desarrollo experimental. El doctorando ha desarrollado el trabajo de microscopía de fluorescencia, videomicroscopía en tiempo real y microscopía de fuerza tracción.

Este artículo no ha sido utilizado en la elaboración de otras Tesis Doctorales.

En el artículo titulado: **“Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip”** publicado en *RSC Advanced* ha participado como autor colaborador. El doctorando ha desarrollado el trabajo experimental en la confección de plataformas microfluídicas para implementación neurobiológica.

Este artículo no ha sido utilizado en la elaboración de otras Tesis Doctorales.



**Director de Tesis**  
Dr. José Antonio del Río Fernández









