



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Factores físicos y moleculares implicados en la migración celular y en el desarrollo de la corteza cerebral

Ana López Mengual



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

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

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

A fluorescence microscopy image showing a dense network of neurons. The neurons are stained with a red dye, highlighting their cell bodies and long, branching processes. The background is dark, making the glowing red structures stand out. The neurons are distributed across the frame, with a higher concentration on the left side.

Tesis Doctoral
Universidad de Barcelona

**Factores físicos y moleculares implicados en la
migración celular y en el desarrollo de la
corteza cerebral**

Ana López Mengual

Barcelona, 2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Factores físicos y moleculares implicados en la migración celular y en el desarrollo de la corteza cerebral

ANA LÓPEZ MENGUAL

Universidad de Barcelona
Facultad de Biología
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC)

Parc Científic de Barcelona (PCB)

Factores físicos y moleculares implicados en la migración celular y en el desarrollo de la corteza cerebral

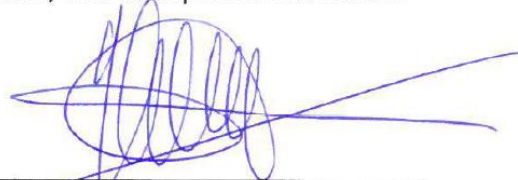
Memoria presentada por la graduada en Biología Humana

ANA LÓPEZ MENGUAL

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del Programa de doctorado de Biomedicina de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y redacción de la siguiente memoria han sido realizadas en el *Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC)*, bajo la dirección del Dr. José Antonio del Río Fernández, catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Barcelona.

En Barcelona, a 28 de septiembre del 2021



Director y tutor de la Tesis

Dr. José Antonio del Río Fernández



La candidata a Doctor

Ana López Mengual

**A tots els que m'ajudeu a créixer,
fins i tot sense saber-ho.
A la família.**

Defiende tu derecho a pensar,
porque incluso pensar de manera
errónea es mejor que no pensar.

– Hipatia de Alejandría –

Agradecimientos

Como toda buena historia literaria, esta tesis también tiene un final digno de mentes despiertas. Esta etapa empezó con mi decisión de irme de Valencia para realizar el Trabajo de fin de Máster en el laboratorio del José Antonio del Río, mi director de tesis. Desde bien temprano tuve el apoyo de mi familia y amigos, en especial de mis padres, mi hermana Irene y mi hermano Fede y de Ester. Mi abuela Irene, que siempre me dice que haga lo que yo quiera, que no dependa de nadie y que vuele, gracias también por tus palabras. Mis amigos, que entendieron que mi vuelta a casa había sido efímera y me despedida de nuevo de ellos, y esta vez de forma indefinida. A Ada y Leia, ¡guau!

Cambiando de etapa, gracias a Carmel y Teresa por acogerme de nuevo en el piso de siempre, la que ha sido y será mi casa en Barcelona. En el laboratorio tuve el placer de coincidir por primera vez con Andreu, Arnau, Miriam, Ana, Ágata, Laura, Laia, Vane e Ina. Que buenas tardes cerrando el Ágora a base de ciencia y cerveza... y bravas. Con vosotros he compartido algo más que laboratorio, la ilusión por la ciencia y el conocimiento. Vane, gracias por esa comida que me pasas de contrabando en Pubilla, por la distensión y los buenos momentos en el lab, y por todo lo que he aprendido de ti. A Ina, muchas gracias por enseñarme que con tranquilidad las cosas salen igual de bien y por todas las veces que te he ido a preguntar protocolos y me has explicado desde el principio con gran sabiduría. A Arnau, que entró a la par en el laboratorio, gracias por todas las charlas científicas y de montaña, compartir es el mejor regalo, y contigo hemos ganado la lotería. ¡Gracias a todos vosotros!

A mi director de tesis Toni, que me enseñó a diseccionar CH, que me cambiaba los planes experimentales para que no metiera la pata y me explicaba con paciencia porque mi propuesta no estaba bien. Gracias por esa paciencia infinita y por darme esta oportunidad que los demás se negarían por mi CV. Espero haber sido una buena alumna.

A Andreu, que me ha enseñado a “xalar a base de bé”. Qui anava a dir-me que tant a prop tenia un germà major que m’ajudaria i m’ensenyaria a ser millor científica. Moltes gràcies per els teus mil consells, per les xarrades filosòfiques i els ànims al voltant de les palmeres de xocolata de la màquina. Gràcies! Moltes gràcies també a la Míriam per tots els seus consells sobre el laboratori, amb tu he après que hi ha molt més darrere de la ciència, i que la feina ben feta es beneficiosa per tots. Gràcies per les teues xarrades i esmorzars

per Barna o la muntanya, realment valore molt aquests moments amb tu. Gracies Laia per sempre tindre un somriure fins i tot als pitjor moments. Sabem que no tot ha estat fàcil, però que sempre tindrem el suport d'una i l'altra pel que necessitem.

Con todo el trajín de tesis, muchos de mis compañeros se despidieron: Laura, Ágata y Andreu terminaron sus tesis. A Laura, que recuerdos de ti y de cuando llegabas al lab por las mañanas. ¡Que alegría! A Ágata, ya sabes que te tengo mucho cariño, primero por lo buena persona que eres, y luego porque me has enseñado mucho, aunque te pillara al final de tu tesis. Siempre recordaré tus abrazos. Por suerte entraron nuevas personas en mi vida, que llegaron para quedarse: Francina, Júlia, Karen y Sara. A Karen, muchos ánimos, ahora empieza la etapa más interesante y emocionante de la tesis doctoral, y se que lo puedes conseguir. A Júlia, gracias por escucharme en esos momentos de locura en cultivos, sabes que esta etapa es complicada, y tu tienes todos los elementos para superarla con éxito. A Sara molta sort amb la teua nova etapa, ha estat un plaer coincidir amb tu de nou després de 4 anys de biologia humana y ABPs.

A Francina, que tantíssimes vesprades ens hem anat a "berenar", que ja sabem que bereneu moltes vegades, vos agrada molt menjar als mallorquins. Gracies per acollir-me a casa teua tantes vegades, per totes les escapades, pels viatges, per tot! Ja saps que et tinc en gran estima, i que això no canvia amb el temps. No només de ciència s'alimenta el científic, també de tots els llocs possibles de Collblanc i Hospitalet, i de tapes a les festes de l'H. Perquè al lab parlem de menjar, però amb el menjar davant sempre parlem de ciència... I com no, als meus companys de rutes: Dani, Gerard, Carlos i Carmen, em perdria mil vegades a la muntanya amb vosaltres, incloent un altre Carros de Foc amb pedra, neu, pluja, etc. Also, thanks to my friend Hari! Hari, you know how much I'm going to miss you. You're an inspiration for me every day. I hope the best for your next step, you will have a home here always.

Por último, agradecer a mi pareja José Carlos estos últimos meses, que tanto me ha apoyado con la tesis, durmiendo tarde, bebiendo atole, preparándome quesadillas y enseñándome a preparar tacos, aunque no me queden como a ti. Eres muy chido, contigo he crecido mucho, y espero que tu encuentres el mismo soporte en mi para tus últimos meses de tesis. Se que eres muy capaz de todo, pero mi ayuda la vas a tener siempre. Gracias, amor.

Comença una nova etapa, amb moltes ganes.

INDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos	6
Índice de contenido.....	9
Resumen	13
Preámbulo.....	14
Introducción.....	15
La migración celular	16
Tipos de migración: individual y colectiva	16
El proceso de migración celular	18
La matriz extracelular y la migración celular	23
Migración en 1D, 2D y 3D	24
Moléculas implicadas en la migración celular	27
Adhesión célula-matriz extracelular: Integrinas	27
Adhesión célula-célula: Cadherinas	31
Adhesión célula-material	32
Las Rho GTPasas	33
Receptores tirosina quinasa	33
Factores que regulan la migración celular	34
Factores químicos: la quimiotaxis	35
Angiopoyetinas	35
VEGF	38
CXCL12	39
Semaforinas	42
Factores físicos: la durotaxis	42
Metodología para medir factores físicos en biología	46
Mecanorreceptores	50

Hipótesis de la tesis	52
Objetivos de la tesis	54
Capítulo 1. Migración de las OECs sobre nanofibras funcionalizadas con SDF-1α	56
Introducción	57
El daño neural y los procesos que derivan	58
Fisiopatología temporal de la lesión medular	59
Factores inhibitorios de la regeneración axonal.....	62
Las <i>olfactory ensheathing cells</i> o OECs	70
Función fisiológica de las OECs	71
Papel de las OECs en la reparación del sistema nervioso central y periférico	73
Biomateriales en regeneración neural	74
Las nanofibras en regeneración neural	77
Biomateriales y OECs usados en regeneración neural	78
Materiales y métodos	79
Resultados	87
Capítulo 2. Factores que regulan la migración de las células de Cajal-Retzius en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario del ratón	97
Introducción.....	98
El desarrollo neural	98
Desarrollo del telencéfalo	98
Corteza cerebral	100
Desarrollo temporal de la corteza cerebral	101
Capa I: las células de Cajal Retzius y las interneuronas GABAérgicas.	105

Células de Cajal-Retzius: desde su inicio hasta la etapa adulta.	106
Regulación de la migración de las células de Cajal-Retzius	111
Regulación del posicionamiento subpial de las CRcs en capa I	112
Regulación de la migración tangencial de las CRcs	113
Factores físicos y sistema nervioso: papel en el desarrollo cerebral	113
Materiales y métodos	116
Resultados	130
Discusión general de la tesis.....	141
Conclusiones generales de la tesis	153
Bibliografía.....	155

Resumen

La migración celular adquiere especial relevancia durante el desarrollo embrionario y la regeneración tisular. Durante el desarrollo del individuo adulto, las células se multiplican, se diferencian y maduran, debiéndose de desplazar a sus regiones de destino mediante la migración. Una vez se ha formado el individuo adulto, estos tejidos de los que forman parte pueden sufrir daños, que conlleven a un estado alterado del mismo. En este proceso de regeneración del tejido en un intento de reestablecer la homeostasis tisular, la migración celular es fundamental.

Por ellos, en esta tesis se analizan los factores mecánicos durante la migración celular en desarrollo cerebral y en regeneración neural, como una herramienta fundamental para entender estos procesos. En primer lugar, se analiza la idoneidad del uso de nanofibras de PLA 80/20 funcionalizadas con la quimiocina CXCL12 como sistema andamio para la migración de las células de la glía envolvente olfatoria (OECs). Las OECs migran mayores distancias sobre las nanofibras funcionalizadas, respondiendo así al gradiente quimiotáctico. Además, al sembrar las OECs y disponer las nanofibras funcionalizadas paralelas y suspendidas, nos aporta un buen sistema para trasplantar las células de forma direccionada en procesos de daño neural como terapia. En segundo lugar, se analiza el papel de los factores físicos en la migración y disposición de las células de Cajal-Retzius (CRcs) y de su origen migratorio. Se realizan mediciones mediante BIO-AFM del cerebro embrionario de ratón, obteniendo diferencias entre el palio y el subpalio. Estas diferencias determinan las tasas de migración diferenciales al trasplantar explantes de diversos orígenes fuera de su sitio habitual y analizar la migración de las CRcs. Además, las CRcs responden mediante entrada de calcio a la inhibición de canales catiónicos mecanosensibles, cambiando su tasa de migración.

Preámbulo

A lo largo de la historia, la biología ha ido estudiando desde los procesos más sencillos a los más complejos, abriendo un enorme abanico de conocimientos. Juntos con otras áreas científicas se han ido sumando técnicas que han permitido un estudio en mayor profundidad que nos permite evaluar de manera molecular lo que ocurre en los seres vivos, desde su desarrollo hasta las etapas senescentes de la vida. Muchos son los factores químicos estudiados por la biología que influyen en estos procesos. Aunque no resulte evidente, la aplicación de técnicas y modelos físicos nos ha permitido explicar algunos de estos procesos químicos y biológicos que tienen lugar en los seres vivos. Gracias a las diferentes mediciones de los procesos biológicos simples, podemos establecer modelos para explicar procesos complejos. Para ello, también se requiere de una gran comprensión de las técnicas de simulación informática.

Como resultado de todas las ciencias participantes en la generación de nuevo conocimiento tenemos un gran la comprensión de los seres vivos a muchos niveles. Por suerte, el ámbito de la ciencia sigue estudiando con especial énfasis los procesos que nos convierten en seres vivos desarrollados a los que llegamos de adultos. El estudio del desarrollo embrionario de los seres vivos nos aporta la información biológica que necesitamos para entender los seres vivos desde todos estos ámbitos. Aunque los rumbos en los que ahora derivan los organismos financiadores sean predominantemente aplicados a la tecnología, la ingeniería y la medicina, no debemos caer en el error de eliminar las ciencias básicas y la generación de nuevo conocimiento del ámbito financiable, puesto que estas ciencias se desarrollan en base siempre a las ciencias primarias, y al conocimiento de los procesos vitales básicos. ¿Como entenderíamos la regeneración axonal sin conocer que factores influyen en su guiado en procesos fisiológicos y de desarrollo? ¿Cómo entenderíamos la demencia senil y todas sus variantes, sin el conocimiento de sus conexiones, funciones y formación embrionaria? ¿Cómo encontraríamos nuevas terapias sin el estudio de nuevos materiales que permitan mejorar estas terapias?

Esta tesis pretende ser una llamada de atención para no olvidar la ciencia básica, los factores primarios, los procesos fisiológicos primarios del desarrollo. Por ello, vamos a incidir en los factores físicos y moleculares implicados en la migración celular y en el desarrollo de la corteza cerebral.

Introducción

Introducción

Durante el desarrollo embrionario los procesos de migración adquieren especial relevancia, por el proceso de construcción del organismo que se está creando. Una vez formado el organismo, puede ocurrir que se produzca un daño, con su proceso de destrucción tisular, en este caso también es de suma importancia la migración celular, para reconstruir el tejido que se formó durante el proceso de desarrollo.

1. La migración celular

La migración celular es un proceso fundamental tanto durante el desarrollo embrionario como a lo largo de la vida del organismo. Juega un importante papel en una gran variedad de procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la regeneración tisular y la respuesta inmune. Estos procesos requieren de un movimiento en una dirección determinada y hacia una localización específica (Allena, 2013; Horwitz, 1997). Además de estos procesos, la migración celular también está presente en algunos procesos patológicos, como enfermedades vasculares, enfermedades inflamatorias crónicas y metástasis (Friedl et al., 2004).

Las células tienden a moverse en una misma dirección en la ausencia de señales quimiotácticas durante un periodo de tiempo prolongado en un proceso conocido como persistencia en el movimiento (Huttenlocher, 2005). Cuando las células pierden la persistencia, la migración direccional se transforma en un movimiento aleatorio. Para coordinar el movimiento direccional, las células poseen regiones específicas en la membrana plasmática conocidas como 'plataformas corticales' que permiten la activación de ciertas vías de señalización (Kodama et al., 2004). A través de todas las vías de señalización activadas, de las señales direccionales y con la participación del citoesqueleto y las moléculas de adhesión, se produce la migración celular tanto a nivel individual como colectivo.

2.1. Tipos de migración: individual y colectiva

En la migración individual, las células sufren una transición epitelio-mesénquima (EMT) donde migran desde los epitelios. Tienen lugar cambios en la polaridad y adhesión

celular, por lo que se delaminan y se convierten en células mesenquimales adquiriendo así la capacidad de migrar. Este no es un proceso irreversible, la célula mesenquimal puede volver a adquirir propiedades epiteliales mediante una transición mesénquima-epitelio (MET), y formar parte nuevamente de un epitelio. La migración celular individual es el tipo de migración celular más estudiado *in vitro*, por ello, se conoce si activa participación en los procesos fisiológicos *in vivo* (Ridley et al., 2003). Este tipo de migración permite a las células individuales localizarse en tejidos o en tumores de origen metastásico, entre otros procesos (Friedl y Gilmour, 2009).

Se entiende por migración colectiva al movimiento de varias células en grupo, en fila o formando parte de una capa, que mantienen características similares a las células epiteliales (Friedl et al., 2004). Las células permanecen funcionales y físicamente conectadas entre ellas para mantener la integridad del grupo que componen. Por tanto, no se considera que la migración colectiva sea un proceso iniciado mediante una transición EMT. Es importante destacar que la unión entre células que migran colectivamente se conserva durante el movimiento, lo que permite mantener la integridad del grupo ya que las células permanecen funcional y físicamente conectadas. Este tipo de migración se presenta *in vivo* como parte de los programas morfogénicos normales del desarrollo embrionario (Rørth, 2009; Weijer, 2009) que inducen a la formación de órganos y tejidos en condiciones fisiológicas, y en la diseminación de células cancerígenas o la neovascularización de tumores entre otras situaciones patológicas (Friedl and Gilmour, 2009b; Friedl et al., 2012).

La migración individual y colectiva comparten muchos rasgos en común, pero hay algunos rasgos diferenciales en la migración colectiva (Rørth, 2012) que hacen que migren mientras permanecen conectadas unas a otras. En la migración colectiva, las células permanecen física y funcionalmente conectadas, debido a que se preserva la integridad de las uniones célula-célula durante el movimiento (Carmona-Fontaine et al., 2008; Friedl et al., 2004; Montell, 2008). Además, la polaridad tisular y la organización supracelular del citoesqueleto de actina genera fuerzas de tracción y protrusión que conllevan migración mientras mantiene la unión intercelular (Friedl and Gilmour, 2009a). Esta migración en grupos acaba induciendo una remodelación de la matriz extracelular en la mayoría de los casos (Friedl and Gilmour, 2009b).

El proceso de migración celular colectiva requiere de cohesión celular, polarización colectiva, coordinación de la actividad del citoesqueleto, orientación celular inducida por señales químicas y físicas y cambio en la posición colectiva con respecto al sustrato. Este comportamiento precisa una dinámica del citoesqueleto celular que se comparta entre las múltiples células que migran colectivamente para funcionar como una sola unidad, generando de forma conjunta la fuerza, migración y remodelación de la matriz extracelular. Además, la migración colectiva resulta en una interacción íntima con el estroma celular que está directamente implicado en la inducción de la polaridad y en la liberación de factores promigratorios (Friedl and Gilmour, 2009a).

Existen ciertas características que producen el inicio de la migración colectiva. Para ello se requiere de unas células líderes que guían la migración y otras células posteriores. Las células líderes presentan características morfológicas diferentes siendo capaces de detectar señales extracelulares y generar una mayor dinámica del citoesqueleto que el resto de las células del grupo, induciendo así la migración colectiva (Vitorino and Meyer, 2008).

En la migración colectiva la adhesión célula-célula es mediada por proteínas de uniones adherentes como las cadherinas, que conectan con la actina y/o con los filamentos intermedios del citoesqueleto proporcionando un acoplamiento mecánico robusto y dinámico (Friedl and Gilmour, 2009a). Estas uniones entre las células cambian rápidamente permitiendo a las células cambiar su posición dentro del grupo (Kametani and Takeichi, 2007; Yamada and Nelson, 2007). Por último, a nivel supramolecular, durante la migración colectiva las células del frente muestran lamelipodios (a través de la activación de Rac), filopodios y/o blebs, mientras que las células que se encuentran tras el frente, o células secundarias, raramente extienden protrusiones (Diz- Muñoz et al., 2010; Friedl and Gilmour, 2009a; Wang et al., 2010).

2.2. El proceso de migración celular

La migración celular puede entenderse como un proceso cíclico (Horwitz, 1997). Este proceso biológico comienza con la adquisición de una polaridad celular, generándose una asimetría espacial entre las partes frontal y trasera de la célula, y con la extensión de protrusiones de membrana hacia la dirección de migración en respuesta a un agente

promotor. Se puede resumir en una serie de fases: polarización celular, protrusiones de membrana en el frente de avance, adhesión al sustrato y fuerzas de tracción, y, por último, contracción y retracción celular (Figura 1).

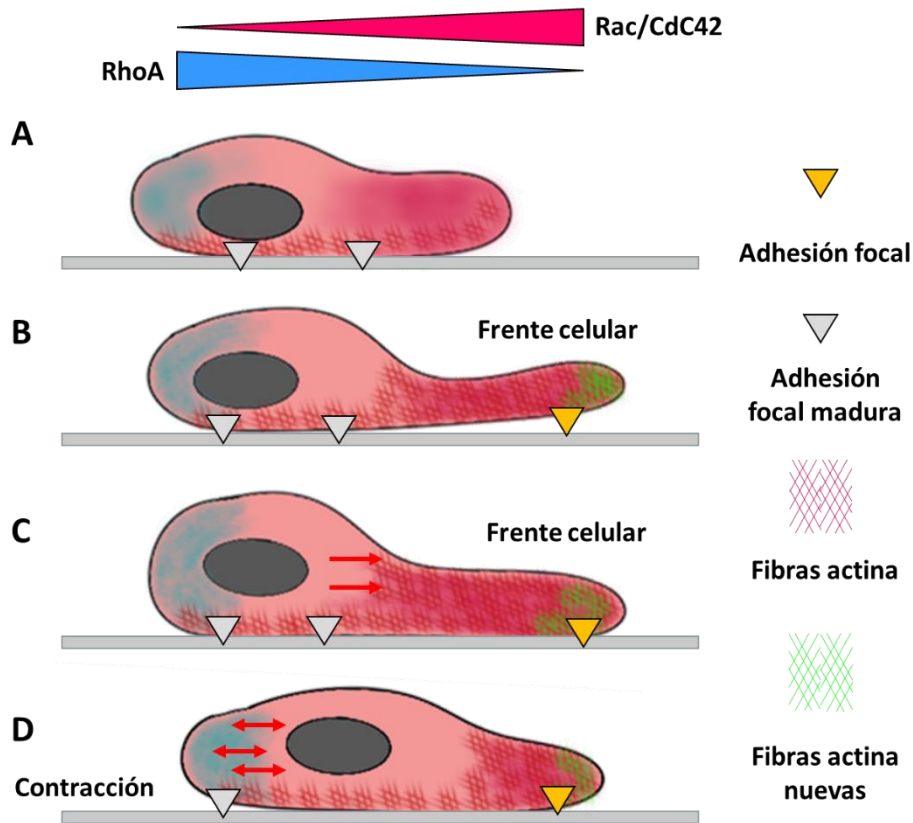


Figura 1. Esquema del proceso migratorio de una célula. El proceso de migración implica una polarización molecular (A) en la dirección de la señal correspondiente. Este proceso permite emitir protuberancias en esta dirección (B) para responder a esta señal. Las protuberancias que permaneces cierto tiempo maduran, estableciendo adhesiones maduras y permitiendo que la célula empiece a traccionar por el flujo retrógrado de actina (C). Por último, se produce una contracción en el polo posterior de la célula, desplazando así el cuerpo celular en la dirección de las nuevas adhesiones establecidas en el frente de avance (D).

i. Polarización celular

La respuesta inicial de una célula a un agente promotor de la migración es polarizarse permitiendo el tráfico vesicular direccionado desde el aparato de Golgi hacia el frente de avance, la organización de los microtúbulos y el anclaje en plataformas corticales. Esta

respuesta esta mediada por un conjunto de moléculas que incluye las GTPasas de la familia Rho (Cdc42), PI3Ks (Phosphoinositide 3-kinases) y PTEN (Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate 3-phosphatase), integrinas, microtúbulos y transporte de vesículas.

Una de las proteínas clave en la polarización celular es Cdc42, que actúa tanto restringiendo la dirección de formación de las protrusiones en el frente celular (Srinivasan et al., 2003), como modificando la localización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi en el frente de avance. Al cambiar la localización del MTOC se favorece el crecimiento de los microtúbulos hacia las protrusiones de membrana. La presencia de los microtúbulos ayuda a transportar las proteínas asociadas a membrana necesarias en la formación de las nuevas protrusiones mediante la liberación de vesículas por parte del aparato de Golgi (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Rodriguez et al., 2003) (ver Figura 1 A).

La polarización no sólo ocurre a nivel celular, también a nivel molecular con la creación de pequeños gradientes de moléculas pequeñas entre el frente celular y la parte posterior de la célula (Figura 1A). Los fosfoinosítoles PIP3 (fosfoinositol trifosfato) y PIP2 (fosfoinositol bifosfato) son moléculas pequeñas de señalización celular que generan una rápida polarización de la célula en respuesta a gradientes quimiotácticos. Estos procesos son amplificados e implican la activación de la quinasa PI3Ks para fosforilar y activar PIP3/PIP2, y la fosfatasa PTEN que revierte esta fosforilación (Ridley et al., 2003).

ii. Frente de avance: protrusiones de membrana

La acción de los factores promotores de la migración desemboca en una cascada de señalización que incluye la activación de proteínas G o tirosina quinasas, la estimulación de GEFs (guanine nucleotide exchange factors) por Cdc42, y la activación de quinasas lipídicas con el reclutamiento de Rac. Estas moléculas inician el ciclo de la migración con la formación de una expansión en el polo anterior de la célula llamado frente de avance.

Seguida de la polarización se produce la formación de prolongaciones transitorias de la membrana celular en el frente de migración que son las responsables del movimiento celular. Estas protrusiones generalmente conducen a una polimerización de actina y se estabilizan mediante la adhesión a la matriz extracelular o células adyacentes mediante los receptores de membrana asociados al citoesqueleto de actina (Figura 1B). Gracias a

estas adhesiones, la célula es capaz de ejercer una tracción para migrar, y se desensamblan a medida que avanza para facilitar su movimiento (Ridley et al., 2003). La polimerización de actina está regulada tanto por proteínas que controlan la disponibilidad de monómeros de actina como por proteínas que despolimerizan la actina.

Las células pueden generar cuatro tipos diferentes de protrusiones de la membrana plasmática en el frente celular: lamelipodios, filopodios, protuberancias irregulares (blebs) e invadopodios. Estas estructuras son características de la migración en circunstancias específicas, aunque no son excluyentes entre sí, y se pueden encontrar varios tipos a la vez en el frente celular. Por ejemplo, los lamelipodios se extienden sobre la matriz extracelular *in vivo* en la migración a través de los tejidos (Friedl and Gilmour, 2009a). Por otra parte, los filopodios exploran el ambiente, siendo de especial importancia en la guía del crecimiento neuronal y la angiogénesis (Eilken and Adams, 2010; Gupton and Gertler, 2007). Por último, las protuberancias irregulares (blebs) son importantes como conductores direccionales de la migración celular durante el desarrollo (Charras and Paluch, 2008), mientras que los invadopodios permiten la degradación puntual de la matriz extracelular, probablemente para facilitar la invasión a través de los tejidos (Buccione et al., 2009) (ver Figura 1 B).

Para formar estas protuberancias de la membrana plasmática celular se requiere de la polimerización de actina, que está regulada por proteínas como WASP/WAVE y el complejo Arp2/3. Al producirse la activación local de Rac y de Cdc42, la actividad de Rho disminuye e incrementa la actividad de PI3K, generando PIP2/PIP3 en el frente celular. Además, esta activación localizada de Rac y/o Cdc42 junto con otros activadores como las proteínas del tipo WASP/WAVE y el complejo Arp2/3, estimula la formación y ramificación de la red de filamentos de actina en el frente celular, induciendo la formación de una protrusión de la membrana en la dirección de la señal migratoria (Ridley et al., 2003). Las expansiones de la membrana plasmática se estabilizan por la formación de adhesiones focales. Este proceso requiere la activación de integrinas y el reclutamiento de componentes estructurales y de señalización para el establecimiento de nuevas adhesiones.

iii. Fuerzas de tracción

Los puntos de adhesión de las protuberancias de la membrana plasmática celular se conocen como adhesiones focales, y deben ser dinámicas para permitir establecer un frente de migración. La función principal de las adhesiones focales es la de permitir a la célula ejercer fuerzas de tracción para efectuar un desplazamiento, pero también deben permitir que se desenganche con cierta facilidad en la parte trasera para permitir su avance. Todo ello depende de la fuerza de la adhesión celular, que a su vez viene determinada por la densidad de ligandos en el sustrato, la densidad de receptores en la célula y la afinidad de los receptores por los ligandos (Horwitz, 1997). Las fuerzas de tracción se producen al interaccionar dos elementos del citoesqueleto: la miosina II y los filamentos de actina (Ridley et al., 2003). Durante la migración, las fuerzas de tracción se localizan en los complejos focales del frente de avance y en la parte posterior de la célula (Beningo et al., 2001) (ver Figura 1 C).

En el frente celular se están creando y destruyendo continuamente nuevas adhesiones focales, mientras que en la parte posterior se desensamblan permitiendo la retracción celular (Figura 1C). En el frente de avance las adhesiones de la base de la protrusión se separan a la vez que se forman nuevas adhesiones en el frente celular (Webb et al., 2002). Los principales reguladores del recambio de las moléculas de adhesión y de su estabilidad son tanto las proteína quinasas como las fosfatasas (Larsen et al., 2003).

iv. Contracción y retracción celular

La desestabilización de las adhesiones focales en la parte trasera de la célula produce la retracción y contracción del cuerpo celular, lo que induce la migración. Para ello, se deben de desestabilizar en la parte lateral y trasera de la célula y establecerse en el frente de migración (Figura 1D). Este desensamblaje está controlado por la dinámica de los microtúbulos y por vías de señalización que incluyen FAK, ERK, Src y proteasa calpaína. La retracción observada en la parte posterior de la célula requiere de la actividad de Rho quinasa y es un proceso dependiente de miosina (Ridley et al., 2003).

Aunque existe una gran variedad de receptores implicados en la migración de diferentes tipos celulares, las integrinas son la principal familia de receptores promotores de la migración. En general, los receptores actúan como vínculo de unión entre las proteínas de

la MEC y los filamentos de actina mediante proteínas adaptadoras (Ridley et al., 2003). Esto inicia vías de señalización intracelular que regulan la formación y la fuerza de los sitios de unión, la organización y dinámica del citoesqueleto y la polaridad celular durante la migración (Geiger et al., 2001). Las integrinas se localizan en el frente celular, donde se están formando continuamente nuevas adhesiones (Kiosses et al., 2001).

Al desensamblarse las adhesiones focales en la parte trasera de la célula se genera una tensión suficiente como para romper la unión física entre la integrina y el citoesqueleto de actina, dejando la integrina atrás (Horwitz, 1997), lo cual puede contribuir a exacerbar la polarización celular y el incremento de la formación de protrusiones en el frente celular (Ridley et al., 2003) (ver Figura 1 D).

2.3. La matriz extracelular y la migración celular

La matriz extracelular (MEC) es un conjunto de proteínas secretadas que forman una malla que rodea diferentes órganos y tejidos, proporcionando un soporte estructural y bioquímico (Hynes, 2009). La MEC está presente, desde el desarrollo embrionario hasta la edad adulta de los organismos. Se compone de glicoproteínas de gran tamaño como colágeno IV, laminina, nidogen y perlecan que se asocian formando fibras u otros complejos macromoleculares; y están implicadas en un sin fin de mecanismos celulares, como son la diferenciación, la adhesión, la supervivencia, la morfología y la migración (Daley y Yamada, 2013; De Arcangelis y Georges-Labouesse, 2000; Domínguez-Giménez et al., 2007; Meyer et al., 2014; Perris y Perissinotto, 2000; Suh y Han, 2010). Las interacciones de la célula con la matriz extracelular se inician con la unión de receptores de adhesión a moléculas de la MEC y la posterior agregación de estos receptores en los puntos de unión. El reclutamiento de moléculas adaptadoras permite la unión de los receptores a los filamentos de actina, permitiendo la maduración de la adhesión a la MEC (Dao et al., 2013).

La conexión de la MEC con el citoesqueleto se produce a través de las integrinas, que sirven como sitios de tracción sobre los que las células se mueven y como mecanosensores, transmitiendo información sobre el estado físico de la matriz extracelular al interior de la célula y alterando las dinámicas del citoesqueleto (Beningo et al., 2001; Galbraith et al., 2002; Horwitz, 1997). En la mayoría de los casos, las células

migran sobre una MEC-exógena ya presente por donde se mueven. No obstante, en algunos casos *in vitro* se ha observado que las células pueden usar una MEC-endógena depositada por ellas mismas mientras migran (Kawataki et al., 2007; Oikawa et al., 2011).

2.4. Migración en 1D, 2D y 3D

Las células en migración sobre la MEC pueden o no estar embebidas dentro de la misma, según el tejido o la situación en la que se encuentren, es decir, puede migrar en 1D (sobre una fibra), en 2D (o sustrato plano) o en 3D (embebidas en la MEC). Sobre los mecanismos que componen cada tipo de migración, aún hay muchos estudios en marcha puesto que se ha descubierto que hay una clara diferencia. En estudios sobre migración en sustratos 3D se ha demostrado que las integrinas participan en la adhesión con la MEC pero que difieren en composición, tamaño y longitud en comparación con los mecanismos de migración en 2D (Doyle et al., 2016). De hecho, se ha demostrado una desregulación de la integrina $\beta 3$ y de la fosforilación de FAK en la migración en 3D, respaldando así la idea de que los mecanismos moleculares involucrados en la detección de los factores físicos en el ambiente (*Mecanosensing*) son diferentes según la célula migre en un entorno 2D o 3D (Cukierman et al., 2001).

Hasta el momento se conocen algunas diferencias básicas, aunque quizás la más llamativa sea la incapacidad de formar adhesiones focales en sustratos 3D. Este hecho se atribuye a una menor generación de fuerzas contráctiles y la ausencia de fibras en la matriz, lo cual es clave, junto con la viscoelasticidad del sustrato para promover adhesiones focales. Por ello, se ha observado cómo a través de las integrinas, las células causan un alineamiento de las fibras, que a su vez regula la agrupación de integrinas y la formación de las adhesiones focales (Lou et al., 2017).

La migración 1D es aquella en la que la célula migra sobre una fibra o estructura lineal estrecha como podría ser una fibrilla de colágeno. En este tipo de migración las fibras suelen estar alineadas y se denomina "*contact-guided*" o migración guiada mediada por contacto, y se conocen casos tanto *in vitro* como *in vivo* (Weiss, 1945; Doyle et al., 2009; Weigelin et al., 2012; Sharma et al., 2012). Este tipo de migración se parece mucho al tipo 3D ya que su desplazamiento es parecido al tipo mesenquimal. En cambio, no tiene características comunes con la migración 2D tanto en morfología celular, en la capacidad

contráctil de la miosina II, la posición del centrosoma ni la velocidad de migración (Doyle et al., 2009) (Figura 2A).

En los modelos clásicos de migración en 2D (cubreobjetos de vidrio) los mecanismos moleculares de la migración están bien estudiados (Ridley et al., 2003; Parson et al., 2010), pero este no es un entorno fisiológico (con algunas excepciones) donde la célula si adquiere cierta flexibilidad en cuando a migración se refiere (Figura 2B). En un entorno fisiológico la célula puede migrar como una célula mesenquimal, en forma lobopodial, ameboide o incluso de forma colectiva. En este aspecto, el entorno fisiológico es aquel en el que las células están embebidas en una matriz, fibrilar o no, y con diferentes propiedades químicas y mecánicas, y a través de la cual van a migrar. Por tanto, la mayoría de las células que migran a través de los tejidos en contexto fisiológico lo hacen mediante migración 3D.

En la migración 3D encontramos varios modos de migrar que dependen de los requisitos funcionales de las células y tejidos, de la MEC y del entorno en el que migran las células, tanto individual como colectivamente. Todo ello conlleva una serie de retos a superar para garantizar la migración: microambientes complejos que se deben de sortear, capacidad de contracción y deformación del cuerpo celular y compresión del núcleo a través de poros y la MEC. Para ello, las células necesitan eludir las barreras impuestas por la MEC mientras mantienen las interacciones para migrar (revisado en Yamada y Sixt, 2019).

Los diferentes modos en los que las células pueden migrar en 3D son mesenquimal, ameboide y lobopodial o basada en lobopodios (Figura 2C). En la migración mesenquimal la polimerización de actina genera lamelipodios y adhesiones mediadas por integrinas y asociadas a adhesiones focales (Doyle et al., 2009; Caswell et al., 2018). La migración ameboide se caracteriza por un morfología celular redondeada, adhesiones de baja intensidad y extensas deformaciones del cuerpo celular, y que se propulsa mediante protuberancias de actina o presión hidrostática. Por último, la migración por lamelipodios utiliza la presión intracelular irregular para generar protuberancias en forma de ampolla llamadas lobopodios mientras las células se adhieren a un sustrato y ejercen fuerzas de tracción sobre la MEC y el núcleo se mueve hacia adelante para generar una presión anterior.

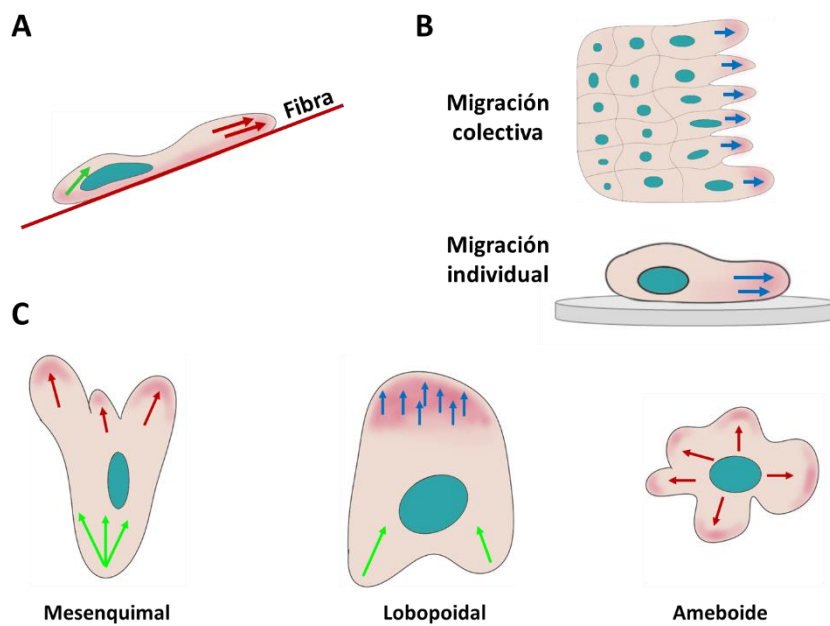


Figura 2. Tipos de migración según su entorno y patrón de fuerzas generadas. En la migración en 1D (A) se denomina guiada por contacto ya que son pocos los puntos de anclaje al sustrato. Esta migración presenta ciclos de propulsión y retracción (flechas rojas) y una retracción en la parte posterior de la célula (flechas en verde) similares a la migración mesenquimal. Por otra parte, en la migración en 2D (B) encontramos tanto migración individual como colectiva, que viene determinada por protrusiones persistentes (flechas azules) en el frente de avance. Por último, en la migración 3D (C) encontramos los tres modelos de migración en condiciones fisiológicas: mesenquimal, lobopoidal y ameboide.

A pesar de estas estrategias de locomoción muy diferentes, el principio subyacente de generación de fuerza y transmisión parece conservado ya que todas dependen de la dinámica del citoesqueleto de actina-miosina para el movimiento (Ridley et al., 2003; Case and Waterman, 2015; Lehtimaki et al., 2017; Krause and Gautreau, 2014). La forma y el modo en que migra una célula está determinado por tres parámetros principales: la adhesión al sustrato, la protrusión de actina y la contracción de miosina II. Y el modo se puede determinar por factores intrínsecos, como la expresión de genes, y extrínsecos, como los factores ambientales (químicos, mecánicos y/o geométricos).

2.5. Moléculas implicadas en la migración celular

Los procesos de adhesión célula-célula o célula-matriz y la proteólisis de la matriz extracelular son vitales para el desarrollo normal de procesos biológicos como la morfogénesis tisular y la cicatrización de heridas, y en procesos patológicos, como la invasión de células tumorales y la metástasis (Gould y cols, 1990; Wolfsberg y cols, 1995). Estos fenómenos se encuentran mediados por proteínas de adhesión de superficie celular, tales como las cadherinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, las selectinas, las integrinas y sindecanos.

2.5.1. Adhesión célula-matriz extracelular: Integrinas

Durante el proceso de migración, las células deben de adherirse a la matriz extracelular (MEC) mediante moléculas específicas para poder a continuación activar el mecanismo contráctil y hacer efectivo el desplazamiento. Estas moléculas receptoras suelen interaccionar con diferentes componentes de la MEC y se encuentran íntimamente unidas a los componentes del citoesqueleto. Dentro de las adhesiones encontramos complejos proteicos (integrina, talina, vinculina, paxilina, FAK, etc.) encargados de transducir las señales extracelulares al interior de la célula para activar una respuesta a través de la unión con el citoesqueleto. Existen dos tipos de estructuras responsables de las uniones entre la célula y la MEC: los hemidesmosomas y las uniones focales.

Los hemidesmosomas son complejos multiproteicos encargados de anclar las células epiteliales a la membrana basal permitiendo su polarización, su organización espacial y la arquitectura tisular (Borradori and Sonnenberg, 1999). Son adhesiones estables que proporcionan resistencia al estrés mecánico mediante la unión del citoesqueleto de actina y la MEC (de Pereda et al., 2009).

Las uniones focales son agrupaciones de integrinas y proteínas adaptadoras que unen mecánicamente el citoesqueleto de actina con la MEC. La capacidad de generar y transmitir fuerza depende de la potencia de la conexión entre las integrinas y el citoesqueleto de actomiosina. Están compuestas por las integrinas, la vinculina y talina entre las más importantes (Ciobanasu et al., 2014; Mierke, 2009).

Integrinas

Dentro de la gran variedad de receptores implicados en la migración celular, las integrinas son la principal familia de receptores promotores de la migración. Las integrinas tienen un papel dual actuando como vínculo de unión entre las proteínas de la MEC y el citoesqueleto de actina por medio de proteínas adaptadoras (Ridley et al., 2003).

Las integrinas son receptores transmembrana cuya principal función es la de mediar la adhesión entre el citoesqueleto celular y la MEC (Brown, 2000; De Arcangelis y Georges-Labouesse, 2000; Gumbiner, 1996). Son proteínas heterodiméricas altamente conservadas formadas por dos subunidades (α y β) (Hynes, 1992) y se han descrito hasta ocho subunidades β diferentes y dieciocho subunidades α (Bökel y Brown, 2002) en mamíferos. Las integrinas reconocen la secuencia tripeptídica conservada RGD (arginina-glicina-aspartato) presente en varios tipos de proteína, aunque no garantiza que dos proteínas que posean esta secuencia puedan ser reconocidas por un mismo receptor. De hecho, varios estudios apuntan a que las secuencias flanqueantes del RGD y sus conformaciones definen la unión al receptor (Dzamba, 2001).

En la migración celular, los dominios extracelulares de las integrinas establecen conexión con la MEC mayoritariamente en el frente de avance (Sheetz et al., 1998; Kiosses et al., 2001) mientras los dominios intracelulares de las integrinas se anclan a los filamentos de actina para estimular el recambio rápido de actina para permitir la migración. Al mismo tiempo, en la parte trasera de la célula migrando las integrinas se inactivan para permitir el avance de la migración en una acción coordinada de activación/inactivación de la adhesión mediada por integrinas (Lauffenburger et al., 1996).

La unión del ligando a la porción extracelular de las integrinas produce un cambio conformacional que modifica las interacciones entre los dominios citoplasmáticos de las subunidades α y β (Emsley et al., 2000), promoviendo su agrupamiento. Esto inicia señales intracelulares que regulan la formación y la fuerza de los sitios de unión, la organización y dinámica del citoesqueleto y la polaridad celular (Geiger et al., 2001). Además, las integrinas pueden actuar como receptores para las moléculas de señalización Rho GTPasa, Erk y JNK (Hynes, 1992). De hecho, las integrinas regulan la migración celular generando un gradiente de Rho que inhibe Rac en la parte trasera de la célula y activando Rac, Cdc42 y PI3K en el frente de avance (Ridley et al., 2003).

Las funciones de las integrinas como mediadoras de adhesión y fusión celular se llevan a cabo a través de dos tipos de sistemas de señalización. En el primero, la propia célula portadora de la integrina señala hacia el exterior mediante el aumento de afinidad de los receptores, por cambios conformacionales, a través de la modificación de la expresión génica propia, y se conoce como "*inside-out signaling*". En el segundo, el medio exterior señala hacia el interior celular al interactuar la célula con los ligandos extracelulares para mediar el ciclo celular, la expresión génica, la migración celular y el reordenamiento del citoesqueleto, y se conoce como "*outside-in signaling*" (Dzamba, 2001).

Talina

La talina es una proteína de 250-270 kDa que actúa como nexo de unión y regulación entre el citoesqueleto de actina y las integrinas, formando parte de un complejo junto con otras proteínas reguladoras como la vimentina y FAK (Calderwood et al., 2013; Campbell and Ginsberg, 2004). Por tanto, tiene gran importancia en la activación de las integrinas y en la formación de las adhesiones focales, además de regular el spreading, la migración y la proliferación celular (Moser et al., 2009). En vertebrados se expresan dos isoformas de talina: la talina 1, que está implicada en adhesión celular y spreading (Priddle et al., 1998); y la talina 2, que se expresa principalmente en corazón (Monkley et al., 2001), y se requiere para la fusión de mioblastos (Conti et al., 2009).

La talina 1 está formada por un dominio N-terminal globular (Talin Head Domain, THD) que contiene los subdominios: F1, F2 y F3, formando el dominio FERM, seguido de un largo dominio C-terminal. La unión entre el dominio citoplásmico de las integrinas y este dominio FERM induce cambios conformacionales en los dominios extracelulares de las integrinas. Esta unión estabiliza la conformación de alta afinidad activando las integrinas (Kim et al., 2011). Más concretamente, la talina se une a través del motivo NPxY/F y a un residuo Asp, en el dominio citoplásmico de las subunidades β de las integrinas (subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$), regulando la activación de estas moléculas de adhesión (Tadokoro et al., 2003; Anthis et al., 2009; Calderwood et al., 2013).

También se puede unir al fosfolípido fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), lo que aumenta la interacción talina-integrina (Martel et al., 2001), siendo esencial para el clustering de integrinas mediante la formación de un complejo entre las integrinas

activadas, sus ligandos, talina y PIP2. Por último, la talina, mediante el dominio FERM y el C-terminal, posee sitios de unión para la actina, y este último, tiene motivos de interacción con vinculina (Gilmore and Burridge, 1996; Gingras et al., 2008; Patel et al., 2006) y para una segunda interacción con integrinas (Xing et al., 2001; Yan et al., 2001).

Vinculinas

La vinculina es una proteína citoplásmica de 116 kDa que forma parte de los complejos de adhesión asociados a la membrana que unen las células a la matriz extracelular (adhesiones célula-matriz o adhesiones focales) y a las células adyacentes (adhesiones célula-célula o uniones adherentes) (Geiger et al., 1985). La vinculina regula muchos aspectos de la adhesión célula-matriz, como el ensamblaje, el recambio y la fuerza de las adhesiones focales, así como la transmisión de fuerzas a través de su interacción con integrinas y talinas. No obstante, también se está estudiando su función en la regulación de las adhesiones célula-célula basadas en cadherina. La diversidad y complejidad de las uniones y complejos que forma va a determinar su función en la adhesión, y, por tanto, en la migración celular (Bakolitsa et al., 2004; Weekes et al., 1996; Chen et al., 2006; Cohen et al., 2006).

El dominio N-terminal de la vinculina se une a la talina, permitiendo que la vinculina se abra parcialmente y ayude en la agrupación de integrinas para el crecimiento de adhesión focal (Humphries et al., 2007; Ezzell et al., 1997). El dominio C-terminal forma un vínculo mecanosensible entre los receptores de adhesión, como las integrinas, y el citoesqueleto de actina para ayudar a reclutar otros componentes del complejo como α -actinina y paxilina, e influir en la resistencia mecánica de la célula (Mierke et al., 2007; Ezzell et al., 1997; Alenghat et al., 2000). La vinculina contribuye a estabilizar de la adhesión focal cuando están sometidas a elevadas fuerzas regulando la generación de tensión contráctil (Mierke et al., 2007), lo que influye en la velocidad de migración celular (Goldmann et al., 1995).

2.5.2. Adhesión célula-célula: Cadherinas

Entre las proteínas implicadas en la formación de adhesiones intercelulares la familia de las cadherinas es la más importante con más de 80 tipos diferentes descritos en mamíferos (Yagi and Takeichi, 2000; Nollet et al., 2000; Gumbiner, 2000; Tepass et al., 2000; Hirano et al., 2003). Las cadherinas son esenciales para la formación de las uniones adherentes entre células y para mantener la integridad de los tejidos epiteliales.

La gran mayoría de las cadherinas son proteínas transmembrana con un dominio extracelular compuesto por repeticiones en tándem que varían en número entre los miembros de la superfamilia, y que es dependiente de Ca^{2+} (Takeichi, 1990). Además del dominio extracelular que conecta las células entre sí, tienen un dominio citoplasmático que las conecta con los filamentos de actina del citoesqueleto (Shapiro and Weis, 2009). Esta conexión se establece a través de proteínas adaptadoras: las cateninas. Las cateninas (p120 y/o a la β -catenina) se unen a la α -catenina, que media la interacción con el citoesqueleto de actina, estableciendo así el enlace entre células (Halbleib and Nelson, 2006). Esa conexión inicia una serie de señalizaciones intracelulares implicadas en el reconocimiento celular, la coordinación de los movimientos celulares, y la formación y mantenimiento de los tejidos.

Debido a su importante función las podemos encontrar en numerosos tejidos o tipos celulares, y se clasifican en función del tejido donde se expresan de forma mayoritaria: cadherina epitelial (E-cadherina), cadherina neural (N-cadherina), cadherina renal (R-cadherina), cadherina vascular (V-cadherina), entre otras (revisado en Gumbiner, 2005). De hecho, la E-cadherina tienen un papel clave en la migración individual al participar en la EMT y la MET. Al mantener las uniones entre células reprime este proceso, pero al decaer los niveles de E-cadherina se genera un cambio en la polaridad celular lo que promueve la migración y la EMT (Peinado et al., 2004; Acloque et al., 2009). En cambio, al aumentar los niveles de E-cadherina en cierta región celular se fuerza a la célula a formar parte de un epitelio (Hajra and Fearon, 2002). Estas transiciones son de vital importancia durante el desarrollo embrionario, por ejemplo, en el cierre del tubo neural (Nakagawa and Takeichi, 1995), pero también son vitales en la etapa adulta, como el proceso de cáncerígenos como la metástasis (Tang et al., 1994; Hajra and Fearon, 2002; Saha et al., 2007).

Al igual que las integrinas activan o reprimen la expresión de genes durante la dinámica de la migración, la regulación génica de la expresión de cadherinas también es clave en la dinámica de las adhesiones celulares. Entre los factores de transcripción implicados en la activación e inhibición de las cadherinas destacan *snail*, *twist* y *serpent*. Modificando la expresión de los diferentes genes, se puede forzar a una célula a salir de su estado original y emprender una transición EMT o una MET. De hecho, la expresión de estos genes es clave en procesos tanto del desarrollo embrionario como en la edad adulta. Por ejemplo, se conoce que deficiencias en la expresión de *snail* causan defectos de gastrulación en vertebrado (Cano et al., 2000). Por todo ello, las cadherinas y su regulación en migración celular, durante el desarrollo embrionario y en metástasis, tienen un papel clave en el control de la EMT.

2.1. Adhesión célula-material

El principal objetivo de los biomateriales en la medicina regenerativa es desarrollar un producto natural o sintético que mimetice la matriz extracelular para apoyar el crecimiento celular, la diferenciación y la producción de una MEC natural. En el caso de la migración, los biomateriales deben de permitir la migración del tipo celular interesado y aportar sitios de adhesión adecuados a sus características y necesidades. Según el tipo de material encontraremos un tipo u otro de migración celular, como hemos visto anteriormente, ya que estos van a mimetizar un entorno parecido al fisiológico, y, por ende, las funciones celulares deberían ser las mismas. No obstante, la mayoría de los biomateriales son inertes, y deben de aportar sitios de adhesión celular para promover la regeneración de tejidos (García, 2005; Petrie et al., 2010; Petrie et al., 2008; Woolfson y Mahmoud, 2010). La primera interacción de la célula con el biomaterial ocurre después de la adsorción de proteínas de la MEC en el biomaterial, tales como fibronectina (FN), vitronectina (VN) y fibrinógeno (FG) (Grinnell, 1986). Otra característica que va a determinar la migración de las células sobre el biomaterial son sus propiedades fisicoquímicas (rugosidad, hidrofobicidad del sustrato, etc.). Por ejemplo, no tendremos el mismo tipo de migración sobre el biomaterial en fibras que sobre una lámina, o incluso sobre una maya de fibras organizadas o desorganizadas. Todo ello conlleva cambios en la señalización celular, en la expresión de factores de transcripción y en la regulación génica.

2.2. Las Rho GTPasas

Durante la migración celular debe de existir una gran dinamismo molecular, entre el que se incluye como clave la dinámica del citoesqueleto de actina. Esta dinámica (generación de las fibras de estrés) está regulada por las proteínas Rho GTPasas, de la familia Rho y dentro de la superfamilia Ras incluyen proteínas cómo RhoA, Rac1 y Cdc42. Son las proteínas más estudiadas por su relación con la migración celular: Cdc42 produce un incremento en la formación de filopodios, Rac1 genera lamelipodios y ondulaciones en la membrana (Ridley et al., 1992; Machesky and Hall, 1997), y Cdc42 tiene un papel clave en la polaridad celular y en procesos de cicatrización (Nobes y Hall en 1999). De hecho, al inhibir Rho en neuronas se induce su migración y se induce el crecimiento del cono neural y las extensiones de los axones ya que se activa Rac1 y Cdc42, mientras que la activación de Rho produce un colapso de los axones cuando llegan a su destino (Kozma et al., 1997; Leeuwen et al., 1997). Por otra parte, Rho tiene un papel clave en el proceso contráctil de la célula, ya que interacciona con la miosina, y en la desestabilización de las uniones adherentes al sustrato (Ridley and Hall, 1992; Ridley and Hall, 1994; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996).

La organización de la activación espaciotemporal de las Rho GTPasas durante la migración celular determina cuál molécula se va a activar. Por ejemplo, en el frente de avance, en las primeras etapas de la migración, encontramos Cdc42 y Rac1, mientras que Rho se activa en la parte trasera de la célula polarizada en migración. También encontramos que, según el estado de maduración de las adhesiones, se activan más Cdc42 y Rac1 durante la formación de las protrusiones, pero que una vez estabilizadas, al retraerse la protrusión, se activa Rho (Nalbant et al., 2004; Pertz et al., 2006; Machacek et al., 2009). Las Rho GTPasas también interaccionan con las cadherinas, influyendo en su tráfico y reciclaje a lo largo de la migración. Se conoce que según la activación de las Rho GTPasas tendremos una inhibición o inducción de la migración mediante la alteración de los niveles de cadherinas (Braga et al., 1997; Takaishi et al., 1997; Braga, 2002; Hage et al., 2009).

2.3. Receptores tirosina quinasas

Las proteínas tirosina quinasas activan rutas de señalización que intervienen en el crecimiento celular, la diferenciación, la adhesión, la migración y la muerte celular

(apoptosis o anoikis). Más concretamente, los receptores tirosina quinasa están implicados en la orientación de la migración en respuesta a señales externas. Dentro de los receptores tirosina quinasa encontramos gran variedad de receptores como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) o el receptor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF), entre otros. Los receptores tirosina quinasa son capaces de promover y regular la migración celular a través de procesos de quimiotaxis (Forsberg-Nilsson et al., 1998; Simpson and Armstrong, 1999). De hecho, alteraciones en la expresión de estos receptores o su ligandos generan defectos en la migración y malformación de órganos por su implicación en el desarrollo.

Los receptores tirosina quinasa poseen dos dominios: uno extracelular con regiones de unión a sus ligandos, y otro intracelular, o citoplasmático, que regula la actividad catalítica quinasa. Cuando el ligando se une al receptor, este dimeriza lo que activa el receptor y estimula la actividad quinasa mediante fosforilación del receptor. Una vez activado y fosforilado, el receptor se une a proteínas citoplasmáticas adaptadoras como las GEFs, y realizan su función gracias a la interacción con las Rho GTPasas. Por ejemplo, VEGFR en células endoteliales interacciona con Vav2, lo fosforila, e induce así la activación de Rac1 con la consiguiente inducción de la migración celular (Garrett et al., 2007).

3. Factores que regulan la migración celular

Como hemos visto en apartados anteriores, la migración celular depende de una multitud de procesos dinámicos coordinados que logran desplazar la célula a través de su microentorno. No obstante, esta migración se verá regulada, tanto positiva como negativamente, por otros factores presentes en el ambiente, que van a modificar migratoria de la célula per se. Estos factores los hemos clasificado en químicos, físicos y geométricos (ver apartado 1). En la presente tesis vamos a centrar nuestra atención en los factores físicos y físicos que modulan la migración celular tanto en un ambiente fisiológico o natural como en un ambiente sintético o de biomateriales.

3.1. Factores químicos: la quimiotaxis

La quimiotaxis es el fenómeno biológico mediante el cual la dirección de la migración de una célula se determina por un gradiente extracelular de sustancias químicas. Las primeras observaciones registradas de quimiotaxis fueron hechas en 1888 por Leber, por sus trabajos sobre migración leucocitaria, y se han seguido encontrando ejemplos a lo largo de los años (Clark y Clark, 1920; Clark y Clark, 1922; Boyden, 1962; Zigmond, 1977; Tauber, 2003; por ejemplo). Hoy en día sabemos muchas más cosas sobre este fenómeno en células eucariotas y de su papel en muchos procesos fisiológicos como el reclutamiento de leucocitos, el tráfico de linfocitos y la disposición neural en el desarrollo. De hecho, una alteración en las funciones de la quimiotaxis puede dar lugar a diversas patologías como el cáncer, la metástasis, asma, etc. (Liehn et al., 2006; Silva et al., 2007; Koizumi et al., 2007; Roussos et al., 2011). Las señales extracelulares que guían la migración son principalmente un conjunto de péptidos cortos llamados quimiocinas que se unen a receptores acoplados a proteína G (GPCR), aunque hay otras señales que pueden modificar la migración celular como las semaforinas, las angiopoyetinas y los factores de crecimiento. Independientemente de la molécula que guíe la migración celular y de su efecto (atrayente o quimiotáctico, o repulsivo), todos van a cambiar la dinámica del citoesqueleto de actina, logrando que se modifique el frente de avance de la célula en migración. En este apartado comentaremos los diferentes factores químicos (peptídicos) que hemos estudiado en la tesis, tanto en la migración de células de la glía envolvente olfativa (OECs) como en células de Cajal-Retzius (CR).

3.1.1. Angiopoyetinas

Las angiopoyetinas Ang1, Ang2 y Ang4 (el ortólogo en humano de Ang3 en ratón) son ligandos del receptor Tie2/TEK (RTK), que se expresa mayoritariamente en células endoteliales (Partanen et al., 1992; Dumont et al., 1992). El receptor Tie1 modula la actividad de Tie2, de hecho, se requiere Tie1 para la activación completa de Tie2 por Ang1 y Ang2 en ratón (Yuan et al., 2007). Los receptores TIE1 y TIE2 (también conocidos como TEK), forman una pequeña subfamilia de receptores tirosina quinasas, se expresan casi exclusivamente en el endotelio, pero también en células hematopoyéticas (Batard et al., 1996; Hashiyama et al., 1996; Eklund and Saharinen, 2013) y, TIE2, también se expresa

en monocitos M2, en ciertas poblaciones de células madre hematopoyéticas y en células satélites musculares (De Palma et al., 2005; Abou-Khalil et al., 2009; Ito et al., 2016).

La señalización Ang1/Tie2 actúa mediante la activación de la vía ERK/MAPK y de la vía PI3K-Akt (ver esquema), que conduce a la inhibición del factor de transcripción FOXO1 y la represión de sus genes diana, como Ang2 (Kim et al., 2000; Kontos et al., 2002; Daly et al., 2004; Sharinen et al., 2008; Wilhelm et al., 2016). Por el contrario, Ang2 compite con Ang1 para unirse a Tie2 y desestabilizar los vasos sanguíneos (Scharpfenecker et al., 2005). Además, se ha demostrado que ANG3 es un antagonista de TIE2, mientras que ANG4 se ha identificado como un agonista de TIE2 (Valenzuela et al., 1999). La vía Ang1-Tie2 promueve la estabilidad vascular a través de sus efectos sobre las uniones EC-EC y sobre el citoesqueleto de actina (Gavard et al., 2008; David et al., 2011) ya que estabiliza la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina o cadherina 5 (CDH5)) en estas uniones, inhibiendo así la pérdida de VE-cadherina en respuesta a la estimulación de las células endoteliales por VEGF o citocinas inflamatorias (David et al., 2011; Frye et al., 2015). Mientras que Ang1 es un agonista potente de TIE2, Ang2 actúa como un agonista o antagonista débil de TIE2, según del contexto. La expresión de Ang2 aumenta en respuesta a la estimulación del factor de necrosis tumoral (TNF) y VEGF (Mandriota et al., 1998; Oh et al., 1999; Simon et al., 2008). A diferencia de ANG1, ANG2 puede desestabilizar monocapas endoteliales al promover la formación de fibras de estrés de actina (Parikh et al., 2006; Hakanpaa et al., 2015). Según el contexto celular, los receptores Tie1 y Tie2 muestran un mecanismo de acción diferente que determina la respuesta celular en función de su localización subcelular.

La señalización de la vía Ang-Tie también está modulada por integrinas. Algunos ejemplos incluyen la integrina $\alpha 5\beta 1$, que mejora la fosforilación inducida por Ang1 de Tie1 y Tie2, su agrupación, la fosforilación de Akt y la posición extranuclear de FOXO1 (Cascone et al., 2002; Korhonen et al., 2016). Esta interacción se produce a través de los ectodominios de ambos receptores dependientes de fibronectina (Cascone et al., 2002; Dalton et al., 2016). Además, las Ang pueden interactuar directamente con integrinas en células no endoteliales, como Ang1 y la integrina $\alpha \nu\beta 5$ en los astrocitos de la retina y Ang2 con $\alpha 5\beta 1$ en células tumorales o con $\alpha 3\beta 1$ en los pericitos vasculares (Lee et al., 2013; Lee et al., 2014; Park et al., 2014). De hecho, bajos niveles del receptor Tie2 promueven la interacción de Ang2 con las integrinas (Felcht et al., 2012) (Ver esquema en figura 3).

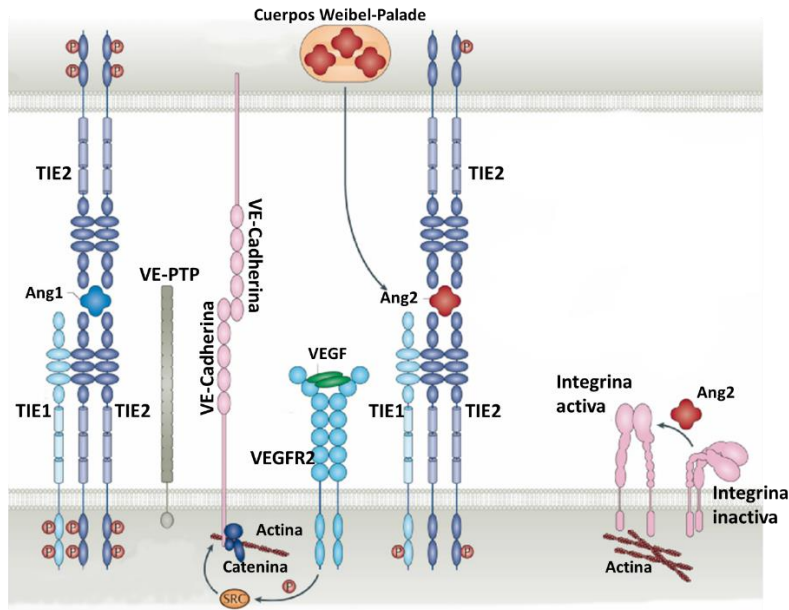


Figura 3. Esquema de señalización de la vía Ang-Tie en células endoteliales. Se observan las diferentes interacciones de las angiopoyetinas con receptores, así como las interacciones de los receptores entre sí. Modificado de: Sharinen et al., 2017.

La vía Ang-Tie es necesaria para el desarrollo de los vasos sanguíneos y linfáticos, además de controlar la permeabilidad vascular, la inflamación y las respuestas angiogénicas patológicas. Pero, además, se sabe que Ang1 y Tie2 se expresan en neuronas (Valable et al., 2003) así como varias subunidades de integrina (Lim et al., 2015). De hecho, se atribuye un papel neuroprotector de Ang al inhibir la apoptosis en neuronas mediante la activación de la vía PI3K (Valable et al., 2003). Por otra parte, Ang1 induce crecimiento neurítico en DRG (Maity et al., 2005) y Ang2 inhibe la neurogénesis en células madre neurales (Léna et al., 2011).

Se conoce que, durante el desarrollo de la retina, YAP1 (*Yes associated protein 1*) regula la expresión de Ang2 dependiente de VE cadherina en las uniones célula-célula (Choi et al., 2015). Esto daría paso al estudio de la interrelación entre los diferentes factores moleculares y físicos, tal y como vamos a ir viendo en el transcurso de esta tesis doctoral.

3.1.2. VEGF

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una proteína implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis, aunque su efecto no sólo abarca las células endoteliales, sino también la migración de macrófagos, las neuronas, las células de Schwann, las células epiteliales renales y las células tumorales. El VEGF engloba a varias proteínas resultantes del del *splicing* alternativo del mRNA del gen de VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 y VEGF206) y factor de crecimiento placentario (PlGF) (Ferrara et al., 2003; Hicklin y Ellis, 2005; Ellis y Hicklin, 2008). La expresión del gen VEGF está regulado por una serie de factores como la hipoxia (Shweiki et al., 1992), factores de crecimiento y citoquinas (Goad et al., 1996; Asano-Kato et al., 2005), hormonas (Sone et al., 1996; Charnock-Jones et al., 2000), entre otros.

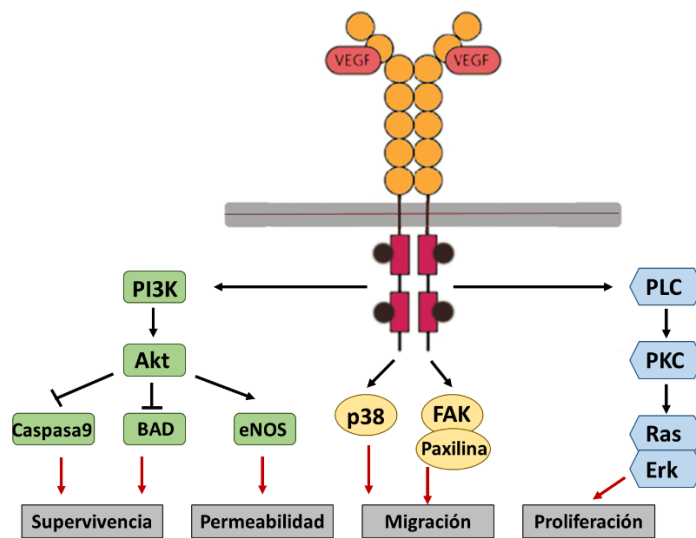


Figura 4. Esquema de señalización de VEGF. A través de la unión al receptor y su autofosforilación, VEGF regula las vías que activan la supervivencia celular, la proliferación, la migración y la permeabilidad.

El VEGF señala a través de receptores tirosin-quinasa de alta afinidad: VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (Flk1 / KDR), y VEGFR-3 (Flt4), que dimerizan y se activan al unirse a su ligando, a menudo junto con sus correceptores neuropilina 1 y neuropilina 2 (NRP1, NRP2) (Neufeld y Kessler, 2008) se produce una dimerización del receptor y su autofosforilación. Estos receptores, que se expresan casi exclusivamente en las células endoteliales, se

caracterizan por siete dominios de tipo inmunoglobulina en su región extracelular, un solo dominio transmembrana, y un dominio tirosina quinasa intracelular. Curiosamente, VEGF puede modificar la estabilidad de las uniones célula-célula mediante fosforilación de la tirosina de la E-cadherina y β -catenina (Weiss et al., 2005; Nelson et al., 2008). Este proceso, es fundamental para permitir la angiogénesis y la migración de las células tanto en la formación de los vasos sanguíneos durante el desarrollo como en los procesos angiogénicos. Además, se relaciona el VEGF con un papel neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer (AD) ya que se han encontrado niveles bajos de VEGF en AD (Storkebaum and Carmeliet, 2004; Mateo et al., 2007; Provias et al., 2014) (Ver esquema en figura 4).

3.1.3. CXCL12

Las quimiocinas son una gran familia de pequeñas proteínas (8 kDa) con propiedades quimioatrayentes que actúan a través de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR, del inglés "G protein couple receptors"). Hay dos principales subgrupos de quimiocinas caracterizadas por la disposición de sus dos primeras cisteínas, ya sea adyacentes entre sí (subfamilia CC) o separados por un aminoácido (subfamilia CXC). Hasta ahora se han identificado 47 quimiocinas y se han identificado 20 receptores de quimiocinas en humanos (Balestrieri et al., 2008). De la quimiocina CXCL12 existen varias isoformas (Janowski, 2009; Stumm et al., 2007; Torres and Ramirez, 2009) aunque la más abundante es el factor derivado de estroma (SDF-1 α , del inglés "*stromal cell-derived factor*"), el cual se expresa altamente en las células del estroma de la médula ósea de ratón (Tashiro et al., 1993), pero también se expresa en diversos órganos, incluidos el cerebro, el corazón, el hígado y los pulmones. En la actualidad, se conocen dos receptores específicos de CXCL12, el CXCR4 (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996) y el CXCR7 (Balabanian et al., 2005). Una vez que se estimula la señalización, la proteína CXCR4 se elimina de la membrana celular (internalizada) y se descompone para que ya no pueda activar las vías de señalización.

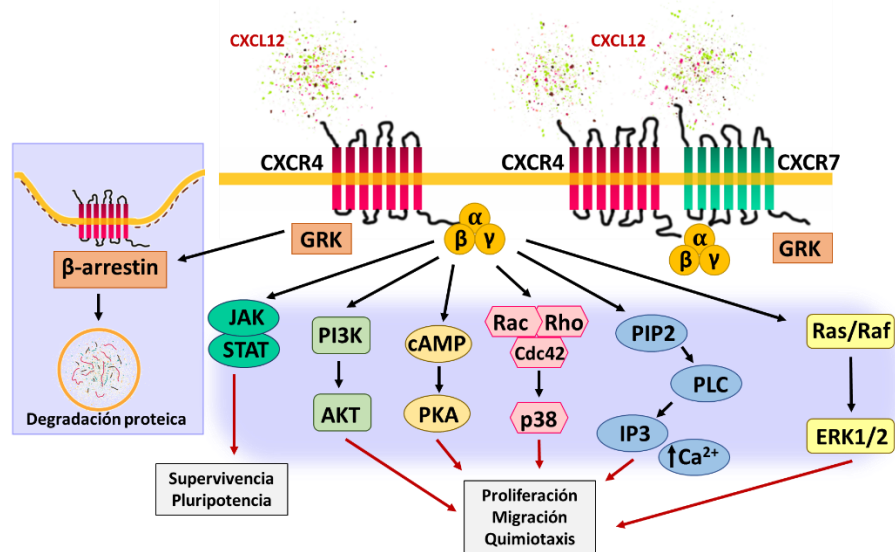


Figura 5. Esquema de señalización de CXCL12 a través de sus receptores. La llegada de CXCL12 a la célula induce la activación de las proteínas G acopladas al receptor CXCR4 o CXCR4/CXCR7 que van a inducir cascadas de señalización implicadas en supervivencia, proliferación, pluripotencia, migración y quimiotaxis. Además, a través de GEK se activa la β -arrestina que induce la endocitosis del receptor CXCR4 mediada por clatrina y su posterior degradación en el endosoma.

El CXCL12 a través de su receptor CXCR4 participa en la localización y la quimiotaxis en los sistemas hematopoyético e inmunológico, en procesos de reparación tisular, en proliferación, la diferenciación, en la supervivencia celular y en la migración celular (Imitola et al., 2004; Doring et al., 2014; Pawig et al., 2015). Sin embargo, CXCR7 señala por mecanismos diferentes a los de CXCR4 (Rajagopal et al., 2010; Xiao et al., 2010) y regula la actividad de CXCR4 a través de complejos heterodiméricos CXCR4/CXCR7 (Levoye et al., 2009) y al captar el CXCL12 extracelular, disminuyendo su biodisponibilidad (Boldajipour et al., 2008). De hecho, el ratón deficiente para CXCR7 presenta diferencias respecto al CXCR4 o al de CXCL12. Estos comparten defectos a nivel de desarrollo durante la hematopoyesis (defectos en linfopoyesis de linfocitos B y en mielopoyesis), en la formación del septum ventricular, en la vascularización del tracto intestinal y en la laminación del cerebelo y de la corteza cerebral (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998; Stumm et al., 2003) (Ver esquema en figura 5).

3.1.4. Semaforinas

Las semaforinas comprenden una gran familia de proteínas compuesta por siete clases y que se encuentran en forma soluble (la subclase de sema3), ancladas a la membrana plasmática (Como las clases sema4 y sema5) o unidas a otras proteínas mediante dominios GPI (sema7A) (Kruger et al., 2005). Están implicadas en todas las etapas de la vida, desde el desarrollo a la edad adulta, tanto en procesos fisiológicos como patológicos. A nivel celular, las semaforinas señalizan sobre la célula para atraer o repeler su migración, durante el guiado axonal, la respuesta inmunitaria o el cáncer (Kolodkin et al., 1993; Luo et al., 1993; Tamagnone & Comoglio, 2000).

Las semaforinas se han descrito como señales inhibitorias principalmente al prevenir la migración celular y el crecimiento axonal, mediante el colapso de los pseudópodos y de los conos de crecimiento axonal. Sin embargo, las semaforinas también pueden promover la quimiotaxis y la atracción o crecimiento axonal (Polleux et al., 2000; Giordano et al., 2002; Moreno-Flores et al., 2003; Pasterkamp et al., 2003). Sus funciones las realizan a través de receptores como las plexinas y las neuropilinas (NPR1 y NPR2) (Tamagnone y Comoglio, 2000). Aunque varios estudios indican que las neuropilinas son prescindibles, hay evidencias en las que el dominio citoplasmático de la neuropilina1 tiene un papel funcional por su asociación con PSD95 a través del dominio PDZ (Wang et al., 2003). Otras moléculas pueden interactuar con las semaforinas, como CD72 y Tim2 (Kumanogoh et al., 2000, 2002), como la integrina- β 1 (Pasterkamp et al., 2003) o el VEGFR (Toshihiko et al., 2004). De hecho, las neuropilinas, además de unirse a las semaforinas secretadas, también son correceptores de VEGF (Soker et al., 1998; Gluzman-Poltorak et al., 2001).

Las semaforinas median la repulsión célula-célula, la adhesión célula-MEC y la polimerización de actina, lo que induce colapso celular y provoca apoptosis. La migración celular se inhibe tanto por la falta de adhesión como por estructuras adhesivas no dinámicas (Webb et al., 2002). De hecho, las semaforinas actúan como señales permisivas e inhibitorias para la migración celular, de la supervivencia y la proliferación celular a través de la integrina (Stupack y Cheresch, 2002) y la apoptosis (Tomizawa et al., 2001).

3.1. Factores físicos: la durotaxis

Las señales mecánicas presentes en el medio activan una serie de señales intracelulares que regulan la migración celular, la proliferación, la morfología y la supervivencia en situaciones fisiológicas y patológicas. Durante los diferentes procesos fisiológicos, la MEC sufre remodelaciones que modifican su estatus químico y físico. Las propiedades mecánicas de la MEC varían en procesos como la cicatrización de heridas, donde los fibroblastos depositan fibrinas y colágenos, y el conjunto ayuda a que las células migren hacia la herida para cerrarla y crear una cicatriz (Xue y Jackson, 2005; Lancerotto y Orgill, 2014).

Estas diferencias mecánicas se presentan en forma de gradientes de dureza, que van a promover la migración celular en un proceso denominado durotaxis (análogo a la quimiotaxis) (Sunyer et al., 2016; Lo et al., 2000). De hecho, sin tener en cuenta los procesos patológicos, todos los tejidos humanos tienen sus propias características mecánicas en forma de dureza: el cerebro ronda desde decenas a centenas de Pa según la región, el hígado tiene una dureza de centenas de KPa, y el hueso ronda decenas de GPa, y entre medio hay toda una serie de gradaciones de dureza según el tejido (Butcher et al., 2009). Además, cada tejido va a tener un comportamiento mecánico concreto por efecto de su función o de sus relaciones anatómicas. Por ejemplo, en los vasos sanguíneos vamos a encontrar un elevado *shear stress* (estrés de flujo) que va a regular la angiogénesis por efecto del flujo sanguíneo constante que soporta este tejido (Galie et al., 2014).

Esta diversidad de factores mecánicos regula procesos muy variados a nivel biológico, como la transición epitelio-mesénquimal (EMT), importante en la formación de tejidos o en desarrollo, así como en procesos metastásicos (Rice et al., 2017). En general, la dureza de la MEC y las fuerzas mecánicas son reguladores de muchos procesos celulares a través de la señalización intracelular por dos vías: la vía YAP/TAP/Hipo y la vía Wnt/ β -catenina, según se conoce hoy en día. En ambos casos, ante el aumento en la dureza de la MEC, se activan a nivel citosólico para permitir su translocación al núcleo y la activación o regulación de genes clave (Landin et al., 2012; Fernandez-Sanchez et al., 2015; Reid et al., 2017).

Dos modelos permiten predecir cual es el mecanismo de acción para el sensado de las propiedades mecánicas como la rigidez o la viscoelasticidad del sustrato sobre el que las

células de adhieren, migran, proliferan, se diferencian, etc. Entre los modelos postulados están el de (a) detección de rigidez a través de embragues moleculares (*molecular clutch*), (b) a través de contracciones locales, (c) a través del remodelado de actina y (d) a través de fuerzas fluctuantes en las adhesiones focales.

a) Detección de rigidez a través de un embrague molecular (*molecular clutch*)

Durante la migración celular, las adhesiones iniciales mediante integrinas se construyen a través del contacto con la MEC. Después, se generan fuerzas de tracción a través de unidades contráctiles locales basadas en actina-miosina (Ghassemi et al., 2012). Y, por último, las adhesiones focales locales maduras se acoplan al flujo de actina para permitir la tracción celular (modelo de 'embrague' de la integrina) (Chan and Odde, 2008; Elosegui-Artola et al., 2014) (Figura 6). La detección de la dureza del sustrato en las etapas iniciales permite decidir y reforzar que adhesiones locales iniciales se refuerzan y maduran, para permitir la migración celular guiada según la dureza del sustrato (Choquet et al., 1997).

El modelo de embrague celular se aplica para explicar la contractilidad celular, la rigidez de la matriz, la densidad y distribución de ligandos en la MEC. Según este modelo, las células detectan la rigidez de la MEC por las fuerzas emitidas por la actina y la miosina a través de proteínas adaptadoras y a las integrinas que se unen a la MEC (Mitchison and Kirschner, 1988). Cuando estas fuerzas generadas por la actina y la miosina llegan a la proteína intermedia o adaptadora transmite la fuerza al sustrato, generando este una resistencia determinada, como si se tratara del embrague de un automóvil. Al acoplarse al sustrato, este genera una tensión según su rigidez, mientras que el flujo retrógrado de actina sigue estirando la célula (Para más información consultar la revisión de Elosegui-Artola et al., 2018 y la figura 6). Así pues, la contracción de la actina y la miosina genera un flujo retrógrado de actina desde el borde de la célula hasta el centro celular. Esta actina conectada a la MEC a través de las integrinas tira del sustrato generando una tensión que lo deforma. La rigidez del sustrato deformado determina cuál es la tasa de carga resultante, es decir, la velocidad de deformación según la rigidez del sustrato.

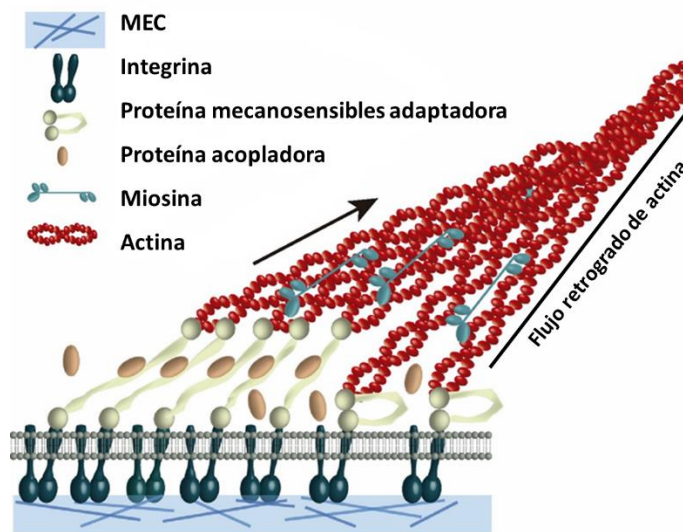


Figura 6. Modelo de *molecular clutch* para la mecanotransducción. Las diferentes proteínas formadas la unidad mecanotransductora con el flujo retrógrado de actina actuando sobre el complejo proteico. Adaptado de Elosegui-Artola et al., 2018

En este modelo, al alterar la afinidad de unión de los ligandos a las proteínas adaptadoras o su número, se alteraba la rigidez óptima necesaria para la transmisión de la fuerza. De hecho, al reducir el número de miosina la fuerza de transmisión óptima se redujo a rigidez más baja (Bangasser et al., 2013). Aquí se suponen una serie de cosas, como que las células son sensibles a la tasa de carga o tasa de aplicación de la fuerza (dinámica de fuerzas) por eventos moleculares sensibles a las fuerzas (Wang et al., 1985; Theriot y Mitchison, 1991; Owen et al., 2017). Por ello, se ha podido modelar como las células detectan factores mecánicos pasivos, entre los cuáles encontramos la rigidez de la MEC, la densidad de ligandos o la viscoelasticidad (Chaudhuri et al., 2015). El modelo del embrague molecular consigue unificar en una sola propuesta la detección celular de factores mecánicos pasivos con la detección de fuerzas aplicadas por la célula.

Recientemente se ha demostrado el papel de la tasa de carga en la detección mecánica al evaluar la localización nuclear de YAP y la rigidez del citoesqueleto al aplicar de forma repetida diferentes deformaciones sobre la célula. Esta tasa de carga produce dos efectos sobre la célula, a tasas intermedias se produce un efecto de refuerzo de la adhesión focal, y a tasas altas se altera el citoesqueleto de actina y se reduce su rigidez (Andreu et al., 2021).

b) Detección de rigidez a través de contracciones locales

Las células sondan el medio extracelular para detectar y responder a señales físicas a través de la aplicación de fuerzas sobre el sustrato. Estas fuerzas se generan en el citoesqueleto de actina-miosina, y se transmiten a través de las adhesiones focales al sustrato que las rodea. La respuesta del sustrato al aplicar estas fuerzas devuelve a la célula una serie de señales que van a activar cascadas de señalización intracelular para responder a las características mecánicas concretas de su ambiente. Aunque hay muchos estudios en marcha, aún no se conocen todas las vías de señalización implicadas.

Las unidades contráctiles se componen de proteínas como α -actina, miosina II y tropomiosina. Estas proteínas producen contracciones locales de 100 nm durante unos 30 segundos, si estas contracciones locales superan un umbral determinado (fuerza contráctil de 20 pN), las adhesiones focales locales inmaduras pasan a ser adhesiones focales maduras (Ghassemi et al., 2012). La maduración de estas adhesiones focales determina la direccionalidad de la migración celular en el proceso de la durotaxis. De hecho, la generación de estas contracciones locales es independiente de la rigidez del sustrato, pero la maduración de las adhesiones focales depende de la capacidad de estas contracciones locales de conectarse entre sí para generar la fuerza necesaria para su maduración (Ghassemi et al., 2012). En estas conexiones locales existe una colocación de tropomiosina 2.1, α -actina y cadena ligera de la miosina fosforilada (p-MLC), resultando en una falla para detectar rigidez tanto en sustratos blandos como rígidos al inhibir la tropomiosina 2.1 en células (Wolfenson et al., 2016). También al inhibir la miosina II se produce un fallo en la maduración de las adhesiones focales (Pasapera et al., 2010) pero independientemente de la tensión detectada (Kuo et al., 2011; Stricker et al., 2013).

c) Detección de rigidez a través de la remodelación de actina

La dinámica de actina es crucial para el proceso migratorio, su formación en el frente de avance y su despolimerización en el frente trasero permite la migración celular. Varios estudios han demostrado la importancia de la rigidez del sustrato en la organización del citoesqueleto de actina (Trichet et al., 2012; Tojkander et al., 2015; Lee et al., 2016). Se

sabe que cambios reológicos en la organización del citoesqueleto de actina explican cómo la célula detecta la rigidez del sustrato, produciéndose un cambio de fase líquida a sólida cuando aumenta la rigidez (Gupta et al., 2015). Según este modelo, en sustratos blandos la actina muestra estructuras altamente móviles, con el citoesqueleto desorganizado e isotrópico, mostrando un comportamiento fluido. Por este hecho, en sustratos blandos las adhesiones focales no madurarían y hay poca resistencia, por lo que se permite la fluidez de la actina. Cuando se supera este umbral de rigidez, las fibras del citoesqueleto de actina se estabilizan y se favorece la maduración de las adhesiones focales, presentando el conjunto un comportamiento más sólido (Zemel et al., 2010).

d) Detección de rigidez a través de fuerzas fluctuantes dentro de las adherencias focales

Según este modelo, la detección de la rigidez de la MEC necesita de fuerzas fluctuantes dentro de las adhesiones focales, ya que estas transmiten la fuerza a la MEC. Tanto a nivel computacional como experimental, se ha demostrado esta distribución de fuerzas dentro de las adhesiones focales. Al aumentar la rigidez de la matriz se detectaron dos puntos de distribución de fuerzas, en un primer pico la fuerza era estable y centrada, mientras que en el segundo pico había cambios bruscos entre el centro y la punta de la adhesión focal. En este caso, la señalización por factores mecánicos promueve la existencia de estas fluctuaciones y permite que el umbral se desplace a rigideces más bajas cuando se modifica esta señalización. De hecho, las fluctuaciones locales promueven la durotaxis pero no son necesarias para madurar la adhesiones focales, ni para la quimiotaxis o la haptotaxis (Plotnikov et al., 2012; Wu et al., 2017).

3.1.1. Metodología para medir factores físicos en biología

Los métodos que se usan habitualmente en las áreas de física encargadas de determinar las propiedades mecánicas de la materia no siempre son adecuados para la biología. Se requiere de una adaptación o modificación de estas para poder tomar medidas en sistemas biológicos, no obstante, con el devenir de los años, estas técnicas se han mejorado hasta el punto de ser de uso habitual y rutinario en algunos campos de la mecanobiología, como la microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés

Atomic Force Microscopy). Por otra parte, algunas otras se han desarrollado a expensas de la necesidad biológica en el estudio de sus propiedades mecánicas, como las pruebas moleculares (*molecular probes*) o las lipoesferas, que usan la ley de Laplace, para determinar a nivel molecular o intracelular las propiedades mecánicas de estos sistemas.

I. Microscopia de fuerza atómica

La microscopia de fuerzas de tracción o AFM se ha usado clásicamente para evaluar la dureza de superficies de materiales y determinar sus propiedades viscoelásticas y magnéticas y eléctricas a nivel microscópico (Binnig et al., 1986). En su adaptación a la biología se han desarrollado nuevos formatos para poder acoplar la muestra o incluso sistemas de incubador para mantener el tejido o las células vivas, entre otras adaptaciones. El principal problema que se ha encontrado a la hora de hacer mediciones de muestras biológicas siempre ha sido la preparación de la muestra.

Una vez fijada adecuadamente la muestra se toman las medidas sobre la superficie de esta con un cantiléver de curvatura de entre 20 y 60 nm terminada con una punta de forma cónica, cilíndrica o esférica (según el tipo de muestra). Las fuerzas interatómicas que contribuyen a la deflexión del cantiléver son las fuerzas de van de Waals. Esta deflexión producida por la muestra se detecta por medio de la incidencia de un láser sobre el cantiléver que detecta su desplazamiento. La magnitud de la deflexión del cantiléver se produce en función de la distancia entre la punta y la muestra (Figura 7).

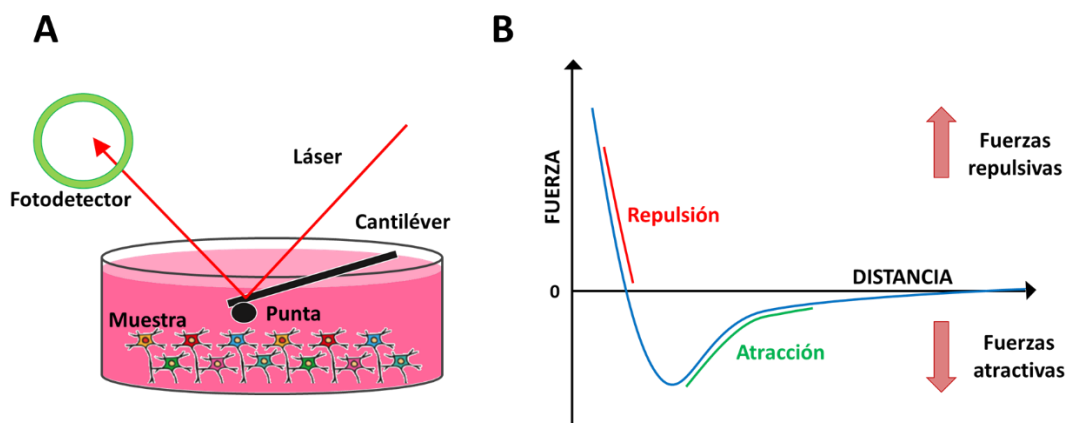


Figura 7. Microscopia de fuerza atómica. Un láser impacta en el cantiléver con una punta acoplada y mide la deflexión por el muestreo mediante la captación de la reflexión del láser con un fotodetector (A). Deflexión del cantiléver en función de la distancia entre la punta y la muestra (B).

Se reconocen dos intervalos, uno en el que el cantiléver se mantiene a pocos angstroms de la muestra y se produce una fuerza interatómica repulsiva. En el segundo intervalo, el cantiléver se mantiene a algunas decenas de angstroms de la superficie, y predominan las fuerzas atractivas.

Para obtener los valores se deben de asumir algunos modelos que nos permitan sacar el valor de la superficie medida. En nuestro caso vamos a asumir el modelo de Hertz (Hertz, 1881), ya que en este se asume una superficie lisa y continua, donde hay una pequeña área de contacto y no hay fuerzas de fricción ni adhesión. Este modelo permite solucionar el problema tridimensional de la deformación del material si estos son elásticos e isotrópicos y asumiendo que la muestra representa un espacio semi-infinito.

$$E=2G(1+\nu)$$

Así pues, usando la fórmula del modelo de Hertz podemos extraer el módulo de elasticidad o de Young (E), asumiendo un coeficiente de Poisson (ν) estandarizado para ciertas muestra biológicas y a partir del módulo de cizalla (G).

II. Reometría

La reología es una rama de la física que se centra en evaluar la deformación y el comportamiento de flujo de los materiales según su velocidad de flujo (fluidos) o su deformación hasta cierto punto (sólidos), es decir, sus propiedades reológicas. El término proviene de la palabra griega "rhei" que significa "fluir", de hecho, los materiales a medir se pueden clasificar como líquidos (comportamiento viscoso), sólidos (comportamiento elástico) y semilíquidos muy viscosos. Todos los materiales están compuestos de diversas moléculas y partículas que cuando fluyen se ponen en movimiento y se deslizan unas entre otras, desarrollando lo que se conoce como resistencia de flujo provocada por la fricción. Cuando los componentes del material son más grandes se obtienen valores de viscosidad mayores (Mezger, 2017).

La reología describe las propiedades viscosas, viscoelásticas y elásticas de materiales influenciadas por fuerzas externas (*shear stress*), deformación (*shear strain*), velocidad de deformación (*shear rate*), temperatura y duración de la cizalla (además del periodo de descanso en comportamientos tixotrópicos). Otros factores pueden estar influenciando

las propiedades viscoelásticas, como el campo magnético o la presión ambiental, pero para ello se requieren de equipos especializados y otros experimentales que los clásicos.

Los reómetros son los instrumentos que sirven para medir la viscosidad de sustancias no newtonianas y determinar su elasticidad. Para ellos hacen pruebas de cizallamiento y de torsión, tanto en rotación continua como oscilatoria. Para las mediciones se utilizan determinadas geometrías que nos aportan valores absolutos de los parámetros reológicos, y nos permite comparar los resultados entre experimentos ya que se rige por unas normas específicas (a diferencia de los sistemas que obtienen valores relativos) (Mezger, 2017).

III. Microscopia de fuerzas de tracción

La microscopia de fuerzas de tracción se basa en un principio de tracción y posterior relajación de un hidrogel con partículas fijas, cuya posición varía de forma eventual según las fuerzas ejercidas por la célula (Dembo y Wang, 1999). Este cambio de posición implica deformación del gel que las contiene, con lo que sabiendo la dureza de este gel y conociendo el desplazamiento que ejercen las células sobre el mismo, podemos determinar la fuerza de tracción que ejerce esta célula sobre el hidrogel. Para obtener los desplazamientos se deben de obtener tres imágenes: una de contraste de fase, que nos da información sobre posición y morfología celular; una segunda de fluorescencia que corresponde a la posición de las partículas fluorescentes con la célula encima; y una tercera de fluorescencia, que corresponde a la posición de las partículas una vez se ha eliminado la célula y el hidrogel ha vuelto a su estado relajado. Con los desplazamientos podemos obtener un mapa de las fuerzas de tracción ejercidas por las células en 2D. En cambio, las medidas de las fuerzas de tracción en 3D se hacen más complicadas por capacidad para remodelar el espacio, modificándolo constantemente, por lo que implementación a nivel computacional aún dista lejos de su aplicación, aunque ya se realizan algunos trabajos técnicamente complejos (Legant et al., 2010; Roca-Cusachs et al., 2017).

3.1.2. Mecanorreceptores

Se desconocen los mecanismos exactos por los que se produce la detección de la rigidez del sustrato por parte de los receptores mecánicos, no obstante, se han propuesto tres modelos que podrían explicar su funcionamiento (Figura 8). En el modelo *Tether* (Figura 8A), un mecanorreceptor (McRc) anclado a la bicapa lipídica celular se encuentra unido mediante links al citoesqueleto por su parte intracelular y a un anclaje por su parte extracelular. Al producirse un cambio en el anclaje, se produce una deflexión en el sistema, que a través de los links mecánicos se modifica la estructura del canal, abriéndolo o cerrándolo según la deflexión producida (Gillespie & Walker, 2001). En el modelo de tensión en la membrana (Figura 8B), las fuerzas extracelulares modifican la tensión de la membrana, produciendo una dilatación del canal, permitiendo su función (Sukharev y Corey, 2004). Por último, en el modelo de ascensor (Figura 8C), los anclajes y los enlaces extracelulares son idénticos a los del modelo *tether*, pero con la particularidad de que se abre el canal por esta misma deflexión, sin que haya un link intracelular ni se transmita directamente al citoesqueleto (Kung, 2005). Estos modelos no han podido ser validados en eucariotas por la falta de estudios.

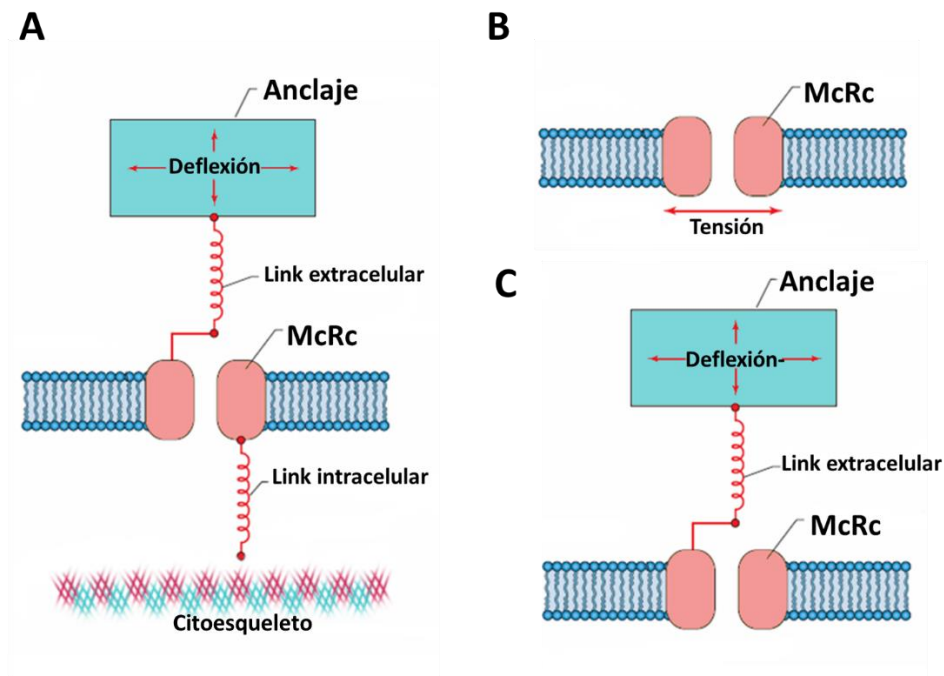


Figura 8. Modelos propuestos de mecanotransducción a partir de mecanorreceptores.

Se han propuesto tres modelos diferentes para explicar la mecanotransducción a través de canales incrustados en la membrana: modelo *tether* (A), modelo de tensión en la

membrana (B) y modelo del ascensor (C). McRc: mecanorreceptores. Adaptado de: Krey y Gillespie, 2012.

En el modelo *thether*, el mecanorreceptor debe de cumplir dos características: que se produzcan cambios conformacionales al estirarse en contra de la dirección del enlace, y que contenga actividad enzimática ligada a dicho mecanorreceptor para transmitir y amplificar la señal mecánica. Dentro de estos mecanorreceptores encontramos proteínas del citoesqueleto, ligandos extracelulares, proteínas de adhesión y canales iónicos. Las proteínas citoesqueléticas implicadas en este modelos son talina (Horwitz et al., 1986; del Rio et al., 2009), las cadherinas (Yao et al., 2014) y otras como filamina A, actina, etc. (Hu et al., 2017). Además, a través de ligandos extracelulares como el factor de crecimiento transformante (TFG) (Robertson et al., 2016) o el factor von Willebrand (VWF) (Lenting et al., 2015), se puede activar la señalización por factores mecánicos. Como ya se ha explicado, las proteínas de adhesión participan en la mecanorecepción, como el PECAM-1, la vimentina o la miosina (Conway et al., 2013). Por último, anclados en la membrana encontramos los canales iónicos que se abren con la fuerza mecánica como el TRPN1 en *Drosophila* (Walker et al., 2000) y transmiten la señal al citoesqueleto.

En el modelo de tensión en la membrana, la bicapa lipídica tiene la capacidad de sensar estos cambios en la tensión producidos por los factores mecánicos al estirarse la membrana y producir desajustes en estas regiones hidrofóbicas. Al estirar la membrana las partes hidrofóbicas estarían expuestas, con lo que la membrana respondería cambiando la configuración de las regiones transmembrana de las proteínas presentes, y en consecuencia modificando su actividad, para que se aliviara esta tensión hidrofóbica (Nyholm et al., 2007; Anishkin et al., 2014). En mamíferos, el canal TREK-1 de entrada de K^+ fue el primero en investigarse como mecanorreceptor (Brohawn et al., 2014; Brohawn, 2015), luego se añadieron a la lista los receptores de la misma familia TRAAK (Maingret et al., 1999) y TREK-2 (Lesage et al., 2000). No se podría terminar esta sección sin mencionar los canales catiónicos mecanosensibles o MSCs (del inglés, *cationic mechanosensitive channels*), que incluyen los receptores Piezo1 y Piezo2 (Coste et al., 2010); u otros como los canales receptores de potencial transitorio o TRPs (del inglés, *transient receptor potential channels*) (Inoue et al., 2009) o los canales activados por señales mecánicas selectivos para K^+ y activados por Ca^{2+} o SAKCa (del inglés, *stretched-activated Ca^{2+} -activated K^+ selective channels*) (Kawakubo et al., 1999).

Hipótesis de la tesis

Hipótesis de la tesis

En el presente estudio se pretende utilizar las funciones de las OECs en condiciones fisiológicas para, mediante un sistema de transporte, direccionalidad de la migración y alineación de las células, mejorar las condiciones de las OECs como terapia en regeneración neural. Además, se pretende analizar los factores físicos y mecánicos encargados de orquestar la migración de las células de Cajal-Retzius durante el desarrollo de la corteza cerebral en ratón; así como analizar el patrón de rigidez de la capa I en el desarrollo del ratón a edad prenatal E12.5.

Por tanto, nuestras hipótesis son:

Se puede direccionar y aumentar la migración de las TEG3 mediante el uso de nanofibras funcionalizadas con CXCL12 en un sistema inerte y fácil de transportar para facilitar posibles usos terapéuticos de las OECs en regeneración.

Las células de Cajal-Retzius migran y se posicionan a lo largo de la corteza cerebral por factores físicos durante el desarrollo embrionario en el ratón.

Objetivos de la tesis

Objetivos de la tesis

Teniendo en cuenta el marco teórico de esta tesis doctoral y su amplitud de campo respecto al estudio de la migración celular, nos centramos en el estudio de la migración de las OECs sobre nanofibras funcionalizadas con agentes quimiotácticos. Así pues, se exploran dos tipos de respuestas, primero la de la migración sobre biomateriales en diversas formas, en este caso en diversos diámetros de nanofibras de PLA. La segunda respuesta que se estudia es la de la quimiotaxis de las OECs por la quimiocina CXCL12. En este segundo objetivo, se determina si la funcionalización de las nanofibras mejora la migración de las OECs por un proceso de quimiotaxis. El otro tema de esta tesis se centra en el estudio de la migración de las células de Cajal-Retzius durante el desarrollo del telencéfalo. Se exploran los factores mecánicos que influyen en la migración de esta población celular, así como el análisis de estos factores en la capa I del cerebro de ratón durante su desarrollo.

Por tanto, los objetivos de esta tesis se resumen en los siguientes:

1. Desarrollar un sistema de guiado y transporte específico para las OECs.
2. Aumentar la capacidad migratoria de las OECs sobre las nanofibras.
3. Estudiar la influencia de factores físicos en la migración de las células de Cajal-Retzius.
4. Estudiar los factores físicos asociados al desarrollo de la corteza cerebral.

Capítulo 1

Migración de las OECs sobre nanofibras funcionalizadas con SDF-1 α

Capítulo 1. Migración de las OECs sobre nanofibras funcionalizadas con SDF-1 α

1. Introducción

La medicina regenerativa se centra en restaurar el estado fisiológico que había antes de la lesión, o del proceso degenerativo. En este campo se aplican una gran variedad de técnicas, como cirugías reconstructivas, trasplantes, terapia farmacológica combinada, entre otras muchas. No obstante, hay un campo en el que los procesos regenerativos son muy limitados y, por tanto, hay que acentuar los esfuerzos para lograr restaurar la función fisiológica. Las lesiones neurales son las grandes desconocidas por la medicina regenerativa, y a nivel social causan muchos problemas socioeconómicos. Las personas que sufren lesiones neurales no vuelven a tener el grado de funcionalidad previo, y el grado de comorbilidad que conlleva produce otro tipo de problemas a la larga. En concreto, las lesiones de médula espinal reflejan este hecho, dónde con una incidencia de 54 casos por millón de personas (17,730 nuevos casos cada año de 328 millones de personas en los Estados Unidos) (Jain et al., 2015), deja un rango de entre de 249,000 a 363,000 personas sólo en Estados Unidos (Lasfargues et al., 1995). De estos casos de lesión de médula espinal o SCI por sus siglas en inglés (*Spinal Cord Injury*), pasan un promedio de 11 días hospitalizados en cuidados intensivos y 31 días en rehabilitación. De estos, el 30% debe de volver a ingresar en el hospital, durante 19 días de media, debido a complicaciones del sistema genitourinario y de enfermedades de la piel. Es común el reingreso por enfermedades respiratorias, digestivas, circulatorias y musculoesqueléticas.

Estas cifras revelan la gran incidencia de SCI en la población, con el alto número de días hospitalizados, que conlleva sin duda un fuerte gasto económico para los sistemas de salud. De hecho, los gastos derivados de la atención médica, los gastos de vida, sin contar con los costes indirectos, se estiman entre 1.8 a 2.7 millones de dólares a los 50 años post lesión dependiendo del tipo de lesión, la educación y el historial de empleo. Con una edad media de 40,7 años entre 2005 a 2010, sólo el 17 % de las personas con SCI están empleadas después del primer año, lo que agrega dificultades económicas a quienes sufren esta patología. Sólo se alcanza una mayor tasa de empleo a los 30 años desde la lesión, con un 32 % de personas empleadas (*National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2011*).

Pocos son los casos en los que el paciente presenta una recuperación neurológica completa en el momento de recibir el alta hospitalaria (el 1%). Lo más frecuente es la tetraplejia incompleta, que se presenta en el 47.6% (en el 2015). En los casos más graves de deterioro neurológico, la mortalidad es elevada dentro del primer año. Además, no se ha logrado mejorar la esperanza de vida de las personas con SCI desde la década de 1980, por lo que se hace patente la necesidad de seguir investigando para mejorar estas patologías, que tantos problemas ocasionan a los pacientes, y que actualmente no tienen ningún tratamiento exitoso (*Economic Impact of SCI, 2011*).

1.1. El daño neural y los procesos que derivan

Los daños causados en nervios resultan en pérdida del control motor, de la capacidad sensorial y de las funciones autónomas en las regiones inervadas por los mismos. Según el grado de daño podemos encontrar desde una inflamación local con daño derivado de ello hasta una sección total con pérdida de las fibras axonales. Estos daños crean un ambiente inhibitorio e inflamatorio en el área de lesión llamado cicatriz glial que impide el normal crecimiento de los axones. Por ello, en su porción distal se produce la degeneración walleriana (SNC), que mediante cambios en el metabolismo neural y en crecimiento de las fibras promueve el recrecimiento axonal para reconectarse y recuperar las funciones motoras, sensoriales y autónomas anteriores a la lesión. El gran problema en la reconexión deriva en la pérdida de direccionalidad y la conectividad desorganizada, por lo que se pueden reinervar fibras sensoriales con motoras o autónomas y viceversa. Aunque la tasa de crecimiento sea elevada, esta desorganización en la conectividad causa que el grado de recuperación funcional sea bajo debido a la mala conexión de las fibras.

Hay varios factores determinantes en la direccionalidad de las fibras y su reconexión. Por ejemplo, se conoce que las neuronas tienen cambios metabólicos que promueven un estado pro-regenerativo. También se conoce el papel de determinados factores solubles y sus receptores que modulan la dirección del crecimiento axonal y su fasciculación. Y no debemos de dejar atrás la influencia del microambiente de la lesión que genera moléculas que dirigen los axones y los protegen de la apoptosis derivada de los factores inhibitorios secretados en la cicatriz glial. Por ejemplo, las células de Schwann secretan factores neurotróficos que modulan la atracción axonal y crean vías favorables en la

porción distal que permiten a los axones adherirse y elongarse. Este intercambio de señales de los axones dañados con el ambiente es esencial para determinar las capacidades intrínsecas de regeneración axonal y reinnervación neural. Por todo ello, es importante determinar el papel de los factores extrínsecos en la modulación de este crecimiento, así como los factores y sus receptores que promueven este estado pro-regenerativo en el axón. En este trabajo, se postula el potencial uso terapéutico de células de la glía envolvente olfatoria (OECs; por su nombre en inglés *olfactory ensheathing cells*) dirigidas mediante nanofibras funcionalizadas con SDF-1a como posible terapia local en la regeneración neural.

1.1.1. Fisiopatología temporal de la lesión medular

Tras una lesión medular se pueden distinguir hasta tres fases temporalmente consecutivas: fase aguda, fase subaguda y fase crónica (Hyun and Kim, 2010; James et al., 2011):

La fase aguda

Esta fase corresponde a los primeros instantes tras la lesión, que se denomina lesión primaria. En esta, según el tipo de lesión se produce una ruptura parcial o total de la estructura anatómica medular, tanto en su componente neural como en la musculatura, estructura ósea y cartilaginosa, y los vasos sanguíneos. Al dañar los vasos sanguíneos se reduce drásticamente el aporte de oxígeno y nutrientes, causando isquemia, anoxia e hipoglucemia, que a su vez conllevan muerte neuronal y degeneración de la mielina en los axones dañados. Estos primeros cambios ocurren entre las 8-24 horas post-lesión, y activan una gran respuesta inflamatoria, donde los fagocitos se encargarán de eliminar los restos durante las siguientes 48 horas. Estas carencias de riego sanguíneo causan cambios metabólicos en las células residentes y edema, causando todo ello un fuerte ambiente anaerobio en las primeras 48 horas después de la lesión (Tator and Fehlings, 1991; Dusart and Schwab, 1994). Una de las consecuencias de la muerte celular es la liberación de iones extracelulares que causan perturbaciones a nivel axonal al modificar la excitabilidad y la transmisión sináptica. Así, en los primeros 30 minutos después de la lesión se produce un importante aumento del Ca^{2+} dentro de los axones que activa las

cascadas de apoptosis, y estimula la liberación de glutamato y aspartato, causando mayor daño en las neuronas (Balentine and Spector, 1997; Young and Koreh, 1986; Lotan et al., 1994). Todos estos cambios se alargan durante varios días después de la lesión y conllevan una respuesta inflamatoria elevada que aumenta el daño en las estructuras circundantes. Por ejemplo, aumenta el daño endotelial, la permeabilidad vascular, la liberación de radicales libres, el edema, la infiltración de células inflamatorias y ocurre una pérdida de mielina en los axones dañados (Caballero, 2005). Estos procesos llevan a un estado de shock a nivel de la lesión medular, que, prolongado durante varios días, produce este estado de fallo fisiológico, disminuyendo las funciones propias del tejido medular y repercutiendo en daños que difícilmente se van a poder regenerar.

La fase subaguda

En esta fase, denominada también lesión secundaria, los efectos de la lesión primaria generan daños secundarios que se prolongan durante semanas, según el tipo de lesión y la zona lesionada. Se considera una fase secundaria porque se crea a consecuencia del daño en la primera lesión, no por la consecuencia directa del acto causante de la lesión. En la fase subaguda se produce la reactivación de la glía por los procesos de necrosis, isquemia y la hemorragia. Además, se localiza la zona de penumbra alrededor de la lesión, caracterizada por baja actividad eléctrica y funcional, y que conlleva muerte neuronal secundaria asociada (Reier et al., 1983).

La fase subaguda se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias, como los leucocitos polimorfonucleares que migran por quimioatracción a la zona de la lesión (Means and Anderson, 1983; Moreno-Flores et al., 1993) y los macrófagos llegan para fagocitar el tejido necrosado (Perry et al., 1993; Ginhoux and Jung, 2014). Además, los macrófagos y los oligodendrocitos fagocitan la mielina, dando inicio el proceso de degeneración walleriana, donde la parte distal del axón lesionado degenera completamente (Bruck et al., 1995). Además, la microglía se activa adquiriendo una forma ameboides, y comienza su función fagocítica de los restos celulares desde el centro de la lesión hacia los bordes (Andersson et al., 1991; Dusart and Schwab, 1994). En cambio, los astrocitos sufren cambios en respuesta al daño que acaban hipertrofiándolos, aumentando la expresión de vimentina y GFAP (Cregg et al., 2014). Estos astrocitos

hipertróficos crean una capa gruesa y extensa que cubre la lesión, y se denomina cicatriz glial o cicatriz meningo-glial.

La cicatriz meningo-glial

En respuesta a los procesos de la fase aguda y subaguda, y dentro de las primeras semanas desde la lesión medular, se crea esta compleja estructura molecular que produce gran cantidad de factores inhibitorios como efrinas, semaforinas, CSPGs y tenascinas (Fitch and Silver, 2008). Este fuerte componente inhibitorio reprime el posible crecimiento axonal en la lesión, eliminando las posibilidades naturales de regeneración de los axones dañados. A nivel celular está compuesta por microglía y precursores de oligodendrocitos, como ya habíamos visto y, en algunos casos, se asocian también células meníngeas, que crean una barrera mecánica que también impide el crecimiento axonal (Windle and Chambers, 1950; Sofroniew, 2015). Otros componentes celulares locales forman parte de la cicatriz meningo-glial como los pericitos (Gortiz et al., 2011). La eliminación de la cicatriz meningo-glial conduce a lesiones más extensas, por lo que tiene un papel protector al aislar la zona y evitar que el daño se extienda (Brush et al., 1999; Penky et al., 2014).

Fase crónica

Se sabe relativamente poco sobre la fase crónica en humanos, solo hay estudios de pacientes que murieron por causas no relacionadas. Debido a que la médula espinal en estos casos no está bien conservada, los axones remielinizados pueden ser difíciles de ver. En un estudio con un modelo de SCI por contusión en médula espinal de ratas adultas, se describió que, un mes después el 64% de las fibras estaban desmielinizadas [58]. Algunos axones pueden permanecer intactos anatómicamente, pero físicamente no son funcionales o progresan hacia los procesos de degeneración Walleriana distal al sitio de la lesión[59]. Cuando todos los procesos empiezan a estabilizarse, entramos en la fase crónica, en la cual no hay grandes cambios y todo el conjunto permanece inalterado. Dependiendo del tipo de lesión, se tarda un tiempo en llegar a esta fase, en la que se observa una cavidad cística carente de células, rodeada por la glía reactiva de la cicatriz meningo-glial y todo embebido en líquido cefalorraquídeo (Hill et al., 2001). Además, los

cambios se extienden más allá de la zona lesionada, ya que se han visto cambios en la expresión neuronal de inhibidores del recrecimiento axonal, de los niveles de nucleótidos cíclicos (cAMP) y del crecimiento axonal (Selzer, 2003; Mar et al., 2014). En esta fase encontramos una cicatriz meningo-glial madura y con un fuerte componente inhibitorio de la regeneración axonal, manteniendo pues un estado estable, sin degeneración ni regeneración, cuyas consecuencias implican a zonas más allá de la lesión.

1.1.2. Factores inhibitorios de la regeneración axonal

El fuerte ambiente inhibitorio que se crea en la zona de la lesión proviene tanto de los restos celulares como de los subproductos secretados por las células residentes e infiltradas: leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, microglía, precursores de oligodendrocitos y astrocitos reactivos. Todos ellos secretan una serie de factores asociados a matriz extracelular (proteoglicanos, etc.), inhibidores asociados a mielina (MAIs, por sus siglas en inglés: *myelin associated inhibitors*), citoquinas (como el TNF α) o moléculas de guía axonal (semaforinas, efrinas, etc.). Los inhibidores de la regeneración del SNC se pueden clasificar en tres categorías principales: (I) Proteoglicanos o factores asociados a la matriz extracelular; (II) Inhibidores asociados a la mielina; y (III) moléculas de guía axonal.

I. Proteoglicanos

Los proteoglicanos son proteínas altamente glicosiladas que encontramos en la matriz extracelular (ECM), en los gránulos de secreción a nivel intracelular, o en una posición intermedia, anclados en la membrana celular (Sandvig et al., 2004). Los proteoglicanos se componen de una proteína central a la que se anclan cadenas repetidas de glucosaminoglicanos (GAGs) (Esko et al., 2009; Mikami and Kitagawa, 2013). Las GAGs están constituidas por repeticiones de disacáridos formados por una glucosamina o una galactoamina y un ácido urónico que se encargan de la unión a ligando (Linhardt and Toida, 2004). Según la longitud del polisacárido y del sulfatado presentará unas características biológicas diferentes (Volpi and Tarugi, 1999). Estructuralmente se distinguen cuatro clases de GAGs: heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y queratán sulfato (QS) (Bandtlow and Zimmermann, 2000).

Cuando existe un daño a nivel neural, si activa la expresión de ECM y otras proteínas de los astrocitos reactivos (Bignami and Dahl, 1976; Eng, 1988; McKeon et al., 1991; Laywell et al., 1992; Eddelston and Mucke, 1993; Brodkey et al., 1995). A nivel neural, los proteoglicanos son secretados por astrocitos, oligodendrocitos y por células de las meninges (Shearer et al., 2003; Silver and Miller, 2004). Mayoritariamente encontramos dos tipos de proteoglicanos en la ECM: el condroitín sulfato proteoglicano (CSPG) y el heparán sulfato proteoglicano (HSPG). Particularmente, el CSPG, junto con la tenascina-c, están positivamente regulados durante el daño en el sistema nervioso central (SNC). La tenascina-C es inhibitoria para muchos tipos de neuronas e inhibe el crecimiento de los axones en la mayoría, aunque puede promover el crecimiento axonal a nivel embrionario en algunos casos (Brenneke et al., 2004). Asociados específicamente a las lesiones de médula espinal encontramos los QSPG o queratán sulfato proteoglicanos (Hilton et al., 2012). De hecho, los ratones *knock-out* (KO) para la enzima crítica para la biosíntesis de QS, tienen una mayor plasticidad y mejoran funcionalmente más que sus compañeros wild-type después de una SCI. De hecho, usando una enzima para degradar específicamente el QS permite una recuperación motora sustancial durante las fases agudas de la SCI (Ito et al., 2010; Imagama et al., 2011).

Condroitín sulfato proteoglicano (CSPG)

Los niveles de CSPG aumentan drásticamente como consecuencia de una lesión del SNC (Andrews EM, et al., 2011). Los principales CSPG que se encuentran en el SNC incluyen lecticanos (neurocano, versicano, agrecano y brevicano), fosfacan y NG2 (Harris NG, et al., 2009). La sobreexpresión de CSPG por los astrocitos reactivos, las células meníngeas y los precursores de oligodendrocitos se produce durante las primeras 24h después de la lesión y la inhibición del crecimiento axonal permanece activa durante meses (Morgenstern et al., 2002; Shearer et al., 2003; Carulli et al., 2005).

El TGF- β se ha identificado como un desencadenante clave de la formación de CSPG en la cicatriz meningo-glial (Mittaud P, et al., 2002). De hecho, se ha demostrado que el bloqueo de la señalización por TGF- β atenúa la formación de la cicatriz meningo-glial después de una lesión de SCI (Davies J, et al., 2004). Después de la rotura vascular y la hemorragia, se libera fibrinógeno sanguíneo en el tejido del SNC y se pueden activar la

astroglisis reactiva y la formación de CSPG a través de la activación de la vía TGF- β Smad2 (Schachtrup C et al., 2010).

Otro regulador de la expresión de CSPG durante la lesión de médula espinal es NF- $\kappa\beta$, según estudios con ratones OMG para expresar I κ B α , un inhibidor de NF- $\kappa\beta$ (promotor de hGFAP). Los investigadores demostraron que la inactivación de NF- $\kappa\beta$ en los astrocitos reactivos redujo la expresión tanto de TGF- β 2 y como de CSPG, dando como resultado una mejor recuperación funcional después de la SCI (Brambilla R et al., 2005).

II. Inhibidores asociados a la mielina

La importancia de la mielina como inhibidor del crecimiento axonal se postuló en el 1987 por Carbonetto al observar que las neuronas solo podían crecer en la materia gris del cerebro. Esta premisa adquirió mayor consistencia en los estudios *in vitro* de ganglios de la raíz dorsal (DRGs), dónde el cultivo con mielina o precursores de oligodendrocitos inhibían la extensión de sus procesos neuríticos (Schwab and Caroni, 1988). La mielina presenta propiedades inhibitorias del SNC debido, fundamentalmente, a tres proteínas asociadas a su composición: MAG, OMgp y Nogo-A y de la presencia de lípidos asociados a la mielina (Schwab et al., 2005; Winzeler et al., 2011).

MAG: glucoproteína glial asociada a mielina

La glucoproteína glial asociada a mielina o MAG se localiza en la superficie celular de oligodendrocitos y células de Schwann, en el SNC y SNP, respectivamente (McKerracher et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1994) y se cree que es importante para la estabilización a largo plazo de los axones mielinizados (Fruttiger et al., 1995). MAG es un componente menor de la mielina y se localiza en la mielina compacta y madura sólo en la membrana más interna en contacto con el axón (Trapp, 1990). Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, y tiene dos isoformas: S-MAG y L-MAG, que difieren en el dominio intracelular. Esta proteína puede tener un doble efecto según el tipo neuronal y el estadio del desarrollo en el que se encuentren (Mukhopadhyay et al., 1994).

Durante la destrucción de los axones se daña la mielina y sólo entonces, cuando los axones estén intentando regenerarse, los conos de crecimiento encontrarán MAG para

tener el efecto inhibitorio (Tang et al., 2001). En el SNP, después de una lesión, se liberan MAG, pero la alta concentración de laminina es suficiente para anular la propiedad inhibitoria del crecimiento de MAG, y permitir una mejor regeneración (David et al., 1995). Por el contrario, el SNC contiene poca laminina u otros sustratos favorables, y la concentración de MAG es mayor (0.1% en SNP y 1% en SNC) (Trapp, 1990). La inhibición del SNC por las MAG se realiza mediante unión al complejo receptor Nogo1 (NgR1), de Nogo2 (NgR2), de la integrina $\beta 1$ y de los gangliósidos GT1b (Vinson et al., 2001; Vyas et al., 2002; Venkatesh et al., 2005). De hecho, el fragmento proteolítico dMAG, consistente en el dominio extracelular completo de MAG, inhibe la regeneración axonal *in vitro* (Sato et al., 1984; Tang et al., 1997). En animales KO para MAG se demostró que la sustancia blanca dañada de los ratones sólo inhibía el crecimiento en los ratones *wild-type*, y la eliminación de MAG eliminaba la inhibición del crecimiento axonal (Tang et al., 1997; Tang et al., 2001). Además de ser uno de los principales inhibidores provenientes de la mielina, su fracción soluble es capaz de difundir y afectar a neuronas más allá de la zona lesionada. Estos hallazgos tienen una implicación importante para enfermedades con alteración de la mielina, como la esclerosis múltiple (Bjartmar y Trapp, 2001).

OMgp: glicoproteína de mielina de oligodendrocitos

La OMgp se expresa en neuronas y en oligodendrocitos en el SNC (Habib et al., 1998), donde media las interacciones entre oligodendrocitos y entre oligodendrocitos y la membrana axonal en los nodos de Ranvier (Mikol et al., 1990). La OMgp es otra proteína capaz de inhibir el crecimiento de las neuritas (Kottis et al., 2002; Wang et al., 2002). La proteína se compone de cuatro dominios: un grupo glucosilfosfatidil inositol (GPI), un dominio rico en residuos de Leucina (LRR), un dominio N-terminal y un dominio C-terminal rico en residuos de Serina-Treonina. Mediante el grupo GPI se ancla a membrana, y es a través del dominio LRR interacciona con el receptor NgR1, iniciando la cascada de señalización para inhibir el crecimiento axonal (Wang et al., 2002).

Los ratones modificados genéticamente para eliminar la expresión de OMgp tienen baja mielinización de los axones (Lee X et al., 2011). Además, se sabe que en estos ratones los axones fallan al conectar con las regiones específicas en las proyecciones talamocorticales (capa IV) y se observan axones ectópicos (capa II y III) (Gil V et al., 2010). Por lo que se ha

propuesto un papel de los OMgp en la regulación de la plasticidad sináptica a nivel postsináptico (Raiker SJ et al., 2010).

Nogo

El anticuerpo monoclonal IN-1 actúa contra una fracción inhibidora de mielina y es capaz de atenuar las propiedades inhibitorias de la mielina del SNC *in vitro* (Caroni y Schwab, 1988a). En ratas adultas, la inyección este anticuerpo IN-1 directamente en la médula espinal demostró que puede promover la regeneración de axones en el tracto corticoespinal, y estos axones crecen más allá de la lesión hacia la médula espinal distal (Schnell y Schwab, 1990). A partir de estos resultados, y mediante experimentos de secuenciación peptídica, se descubrió una proteína de alto peso molecular a la que llamaron Nogo (Chen et al., 2000; GrandPré et al., 2000; Prinjha et al., 2000). Esta proteína Nogo fue una de las tres isoformas (Nogo-A, Nogo-B y Nogo-C) producidas a partir del gen Nogo mediante *splicing* alternativo.

Las proteínas de tipo Nogo pertenecen a una familia de proteínas localizadas en el retículo endoplasmático llamada Reticulón (RTN) (Oertle and Schwab, 2003). Formada principalmente por tres proteínas, se componen de un extremo amino terminal y dos dominios transmembrana Nogo-A es la que se expresa en el SNC, Nogo-B tanto en SNC y SNP, y Nogo-C se expresa en cerebro, entre otros sitios (Huber et al., 2002). Se han identificado dos dominios inhibidores de Nogo: un bucle de 66 aminoácidos (Nogo-66) común a las tres isoformas de Nogo y una región amino-terminal única (NiG) específica de Nogo-A (Prinjha et al., 2000 ; Oertle et al., 2003).

Nogo-A se expresa en oligodendrocitos, fibroblastos y neuronas (Dodd et al., 2005), en concreto se expresa en diversos tipos neuronales en desarrollo y en el adulto, pero no en células de Schwann (Chen et al., 2000; Tozaki et al., 2002; Mingorance et al., 2004; Gil et al., 2006). Aunque Nogo-A se ha caracterizado como inhibidor del crecimiento axonal en la lesión de SNC su función fisiológica aún no se ha aclarado. En los ratones knock-out para Nogo, se observan déficits en la diferenciación de oligodendrocitos, en la formación de las vainas de mielina y en el crecimiento axonal en estadios postnatales (Pernet et al., 2008). Se sabe que su expresión a nivel de los oligodendrocitos en el SNC inhibe el crecimiento de las neuritas por el dominio Nogo-66, a nivel extracelular, y los dominios

amino-Nogo (NiG), a nivel intracelular (Dodd et al., 2005). De hecho, el dominio Nogo-66 ejerce su efecto inhibitorio mediante la unión a NgR1, y el dominio NiG por su unión a integrinas (Hu y Strittmatter, 2008).

Receptores de las proteínas inhibitorias derivadas de mielina

Casi todas las proteínas estudiadas necesitan de un receptor para efectuar su función inhibitoria sobre el sistema nervioso. MAG, Nogo y OMgp envían señales a través de agrupaciones de receptores en la membrana neuronal, y según el tipo neuronal tendrá una composición diferente. No obstante, estas agrupaciones de receptores inhibitorios contienen, como mínimo, el receptor de Nogo-66: NgR1 (Fournier et al., 2001; Domeniconi et al., 2002; Wang et al., 2002; Wang et al., 2002b). NgR1 es una proteína de la superficie celular ligada a GPI, que junto con otros co-receptores transmite esta señal inhibitoria sobre el crecimiento axonal. Junto con NgR1 se han encontrado otros receptores como p75^{NTR} (Wang et al., 2002a), LINGO-1 (Mi et al., 2004), TROY (receptor de TNF α) (Park et al., 2005; Shao et al., 2005) o PirB (Syken et al., 2006). De hecho, las tres moléculas inhibitorias derivadas de mielina se unen a PirB con alta afinidad y se envían señales inhibitorias del crecimiento neurítico (Atwal et al., 2008). Cabe destacar, que todas estas proteínas señalizan a través de Rho, para dar lugar a la inhibición del crecimiento neuronal (ver Figura 1).

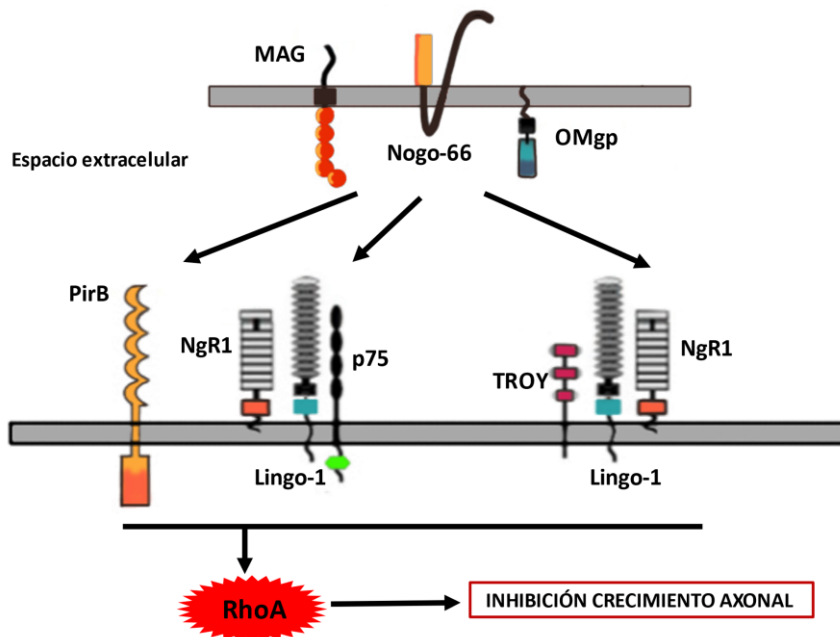


Figura 1. Cascada de señalización de las moléculas inhibitorias del sistema nervioso derivadas de la mielina y sus receptores asociados. Modificado de: McKerracher y Rosen, 2015.

Lípidos asociados a la mielina

La búsqueda de moléculas inhibitorias de la regeneración siempre se ha centrado en las proteínas, sin embargo, los lípidos constituyen el 70-75% de la mielina del SNC (Norton y Poduslo, 1973b). En ratones shiverer (shi), la ausencia de proteína básica de mielina (MBP), da como resultado una falta completa de mielina compacta que se acompaña de un fenotipo grave que comprende temblores, convulsiones y muerte prematura (Rosenbluth, 1980). No obstante, en estos ratones shi se observa que los axones tienen una mayor capacidad para regenerarse a través de la cicatriz glial después de una lesión de la médula espinal, debido a la disminución en los niveles de lípidos asociados a la mielina, específicamente el colesterol y la esfingomielina (Mar FM et al., 2015). Por otra parte, se ha encontrado que la sulfatida puede inhibir el crecimiento neurítico en DRG *in vitro*, y que el inhibidor de la C3 transferasa reduce este efecto inhibitorio (Winzeler AM et al., 2011). Actualmente existe mucha más información sobre la composición de los lípidos de la mielina, y sus funciones dentro del SNP y SNC, pero faltan muchos estudios para determinar sus funciones sobre la regeneración del sistema nervioso después de una lesión neural (Poitelon, et al., 2020).

III. Moléculas de guía axonal

Las moléculas de guía axonal han sido estudiadas ampliamente por su participación en el desarrollo embrionario, no obstante, también adquieren nuevas funciones en el adulto y en su fisiopatología. En este apartado se pretende describir sus implicaciones en la regeneración axonal después de una lesión neural.

Semaforinas

Las semaforinas comprenden una familia de proteínas compuesta por ocho clases y que se encuentran en forma soluble (la subclase de sema3), ancladas a la membrana plasmática (Como las clases sema4 y sema5) o unidas a otras proteínas mediante

dominios GPI (sema7A) (Kruger et al., 2005). Tienen importantes funciones desde el desarrollo hasta la edad adulta, dónde se han encontrado la sobreexpresión de algunas de ellas en zonas lesionadas a nivel neural. La Sema3A puede secretarse a partir de células no neuronales como los astrocitos o células meníngeas, y la expresión de su receptor neuropilina-1 (Nrp-1), se ve afectada en las lesiones neurales, de hecho, la inhibición de su actividad es beneficiosa para la regeneración axonal. De hecho, se sabe que el CSPG aumenta la repulsión de las semaforinas en la cicatriz meningo-glial (Pasterkamp y Verhaagen, 2006; Sharma A et al., 2012; Yamashita N et al., 2016). También se conoce la sobreexpresión de la sema4D en las proximidades de la lesión de médula espinal (Moreau-Fauvarque et al., 2003). Se ha encontrado expresión de varias semaforinas por los fibroblastos residentes en la lesión, como Sema3A, Sema3B, Sema3C, Sema3E y Sema3F (Pasterkamp et al. 1999; De Winter y col. 2002b). Encontramos sobreexpresión de sema5A y sema6D después del SCI y su delección suprime la retracción del axón y la muerte degenerativa de las neuronas en las lesiones corticoespinales (Ueno M, et al., 2020). Diversos estudios sugieren que las neuronas lesionadas detectan y responden a estas semaforinas inhibitorias: a) Las neuronas del SNC y del SNP expresan los receptores de semaforinas y las proteínas de señalización intracelular asociadas. b) Además, los axones sensoriales responden a la inhibición por sema3s tanto *in vitro* como *in vivo*. c) Y, por último, en lesiones de nervios periféricos la expresión de sema3s inhibe la regeneración de los axones a través de la cicatriz meningo-glial. (Wang & Strittmatter 1996; Tanelian y col. 1997; Pasterkamp et al. 1998b, c, 2000, 2001; Reza y col. 1999; Gavazzi et al. 2000; Owesson y col. 2000; De Winter y col. 2002b; Lindholm y col. 2004; Tang y col. 2004; Agudo y col. 2005).

Efrinas

Las efrinas son una moléculas inhibitorias como las semaforinas, de la familia de los receptores tirosina quinasa. Las efrinas y sus receptores se expresan en el SNC tanto en desarrollo como en adultos (Liebl et al. 2003). Hay una fuerte expresión de EfrinaB3 en el SNC, además en las lesiones neurales aumenta la expresión de Efrina B2 por los astrocitos reactivos y en lesiones isquémicas aumenta la expresión de EfrinaB5 (Bundesen et al.2003; Benson et al. 2005; Carmichael y col. 2005). En SCI de rata, se ha encontrado una sobreexpresión de EphA4 en los axones dañados probablemente respondiendo a los

ligandos presentes en la mielina y en la cicatriz meningo-glial (Fabes et al., 2006). Bloqueando EphA4 mediante péptidos específicos no mejora la regeneración de los axones a través de la lesión en la parte distal, aunque si mejora el estado de los axones dañados en la porción rostral (Fabes et al., 2007). También se ha encontrado una sobreexpresión de la Eph3A en astrocitos reactivos después de la SCI en rata (Irizarry-Ramirez et al., 2005); así como de Eph7A también en astrocitos (Figuerola et al., 2006). La señalización por efrinas podría tener un importante papel en la formación de la cicatriz meningo-glial a través de la efrina-B2/EphB2 (Bundesen et al., 2003).

1.2. Las olfactory ensheathing cells o OECs

En el sistema nervioso central encontramos una vía que tiene la excepcional capacidad de regenerarse continuamente. En la vía olfatoria las neuronas sensoriales olfatorias de la periferia de la mucosa olfatoria extienden sus axones e ingresan en el sistema nervioso central. Para ello disponen de una ayuda fundamental, las células de la glía envolvente olfatoria o por su nombre en inglés: *olfactory ensheathing cells* (OECs). Las OECs se localizan en las dos capas más externas del bulbo olfatorio, en el sistema nervioso central, y a lo largo de la vía olfatoria, en el sistema nervioso periférico. De origen ectodérmico, no comparten origen con otros tipos de células gliales, que si derivan de la cresta neural (Acheron et al., 1991; Schwartz Levey et al., 1991). De hecho, derivan de las células precursoras residentes en el epitelio olfativo (Barnett, et al., 1993). Desde el desarrollo y durante la edad adulta las OECs migran del epitelio olfatorio y envuelven los axones mediante prolongaciones celulares (ver Figura 2). Este proceso constante es clave para que las neuronas sensoriales que se producen en el bulbo olfatorio reemplacen las otras a lo largo de la vida adulta (Graziadei et al., 1979).

En análisis histológicos se muestra que las OECs generan canales para el crecimiento de fibras nerviosas en regeneración, tanto en los nervios olfatorios como en modelos de lesiones en médula espinal (Li et al., 2005). En estas, las OECs rodean los paquetes de axones recién formados de las neuronas sensoriales olfatorias en la parte periférica de la cintilla olfativa primaria y cruzan una zona de transición hasta llegar al bulbo olfatorio, donde establecen sinapsis en el glomérulo olfatorio con las neuronas residentes (Doucette et al., 1983; Devon et al., 1995; Doucette et al., 1993).

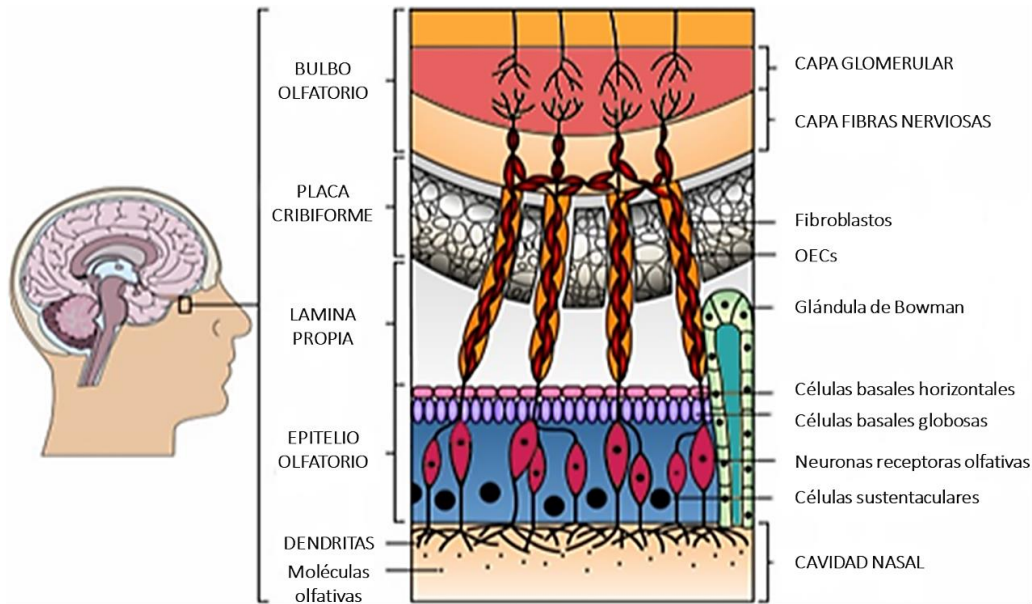


Figura 2. Las células de la glía envolvente olfativa (OECs) forman canales juntos con los fibroblastos a través de la lámina propia y la placa cribiforme, hasta llegar al bulbo olfatorio, dónde ayudan a conectar los axones de las neuronas olfativas con las neuronas residentes en la capa glomerular. Esquema modificado de: Yao et al., 2018.

1.2.1. Función fisiológica de las OECs

La función de las OECs es básicamente la de proveer un medio favorable y permisivo para el crecimiento y desarrollo de axones sensitivos del neuroepitelio olfatorio (sobre la lámina cribosa del hueso etmoides) hasta sus sinapsis dentro del bulbo olfatorio del primer par craneal. Este medio favorable lo consiguen al envolver, acompañar y guiar los axones desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo (Zurn et al., 1988) mediante prolongaciones citoplasmáticas que evitan el contacto con factores inhibitorios propios del sistema nervioso central que, de otra forma, restringirían el crecimiento axonal (Doucette et al., 1990; Rieger et al., 2007). Esta especie de canales que forman se caracterizan por una superficie externa de lámina basal recubierta por fibroblastos y una superficie interna desnuda en contacto con las fibras nerviosas (ver Figura 2).

Teoría de *door-openers* sobre las OECs

La capacidad de las OECs de interactuar con los astrocitos de la cicatriz glial permite que sus prolongaciones cambien su configuración y formen un continuo, haciendo que se produzca un tipo de puerta abierta (*Olfactory ensheathing cell as 'door-openers'*) que permitiría la formación de puentes. En esta teoría de Raisman, este sería el evento crucial para permitir el crecimiento de axones, tanto en el contexto de su ambiente natural en el sistema olfatorio, como en el contexto de trasplantes en lesiones de médula espinal (Li et al., 2005). Así pues, según esta teoría, las OECs abrirían una entrada en el glomérulo rodeado de astrocitos para facilitar el contacto de los axones olfativos que están protegiendo, y que puedan hacer contacto con las dendritas de las células mitrales del bulbo olfatorio en el sistema nervioso central (ver Figura 3).

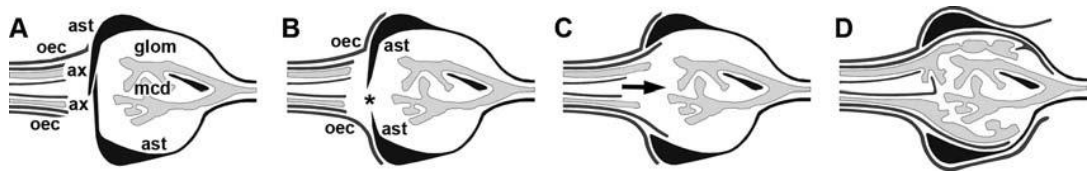


Figura 3. Teoría del *door-openers* de Raisman. Representación esquemática de la interacción entre las OECs (oec) y los astrocitos (ast) (A) y de su función de facilitación (B) de la entrada de los axones de las neuronas sensoriales (ax) (C) en el glomérulo olfatorio (glom) donde conectan con las dendritas de las células mitrales (mcd) (D). Extraído de: Li et al., 2005.

Por otra parte, el mecanismo molecular por el que las OECs favorecen el crecimiento axonal no se conoce por completo. Pero hay una serie de factores que podrían estar contribuyendo directa o indirectamente al crecimiento axonal. Se sabe que expresan moléculas de adhesión promotoras de crecimiento axonal, como L1, ENCAM, fibronectina, nexina derivada glial y S100 β . También, secretan neurotrofinas, como el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y las neurotrofinas NT-3 y NT-4 (Farbman y Squinto, 1985; Ramón-Cueto y Nieto-Sampedro, 1992; Pixley, 1992; Barnett et al., 1993; Ubink et al., 1994; Doucette, 1995; Franceschini y Barnett, 1996; Vincent et al., 2005).

Otros factores que podrían estar implicados en su función sería la provisión de un soporte trófico. Esta teoría se basa en el hecho de que las OECs secretan moléculas de matriz extracelular, como laminina, fibronectina y colágeno tipo IV, que pueden actuar como sustratos favorables para el crecimiento axonal y pueden tener un efecto quimiotrófico en los axones (Doucette, 1993). Mediante estudios *in vitro* con co-cultivos de neuronas receptoras olfatorias y OECs se demostró que las OECs favorecen la extensión de neuritas en comparación a sustratos favorables como la laminina (Kafitz y Greer, 1999).

1.2.2. Papel de las OECs en la reparación del sistema nervioso central y periférico

La capacidad inherente de las OECs para crear un entorno favorable para los axones en condiciones fisiológicas justifica su uso como terapia celular en las lesiones del sistema nervioso (Deumens et al., 2006; Zheng et al., 2013; Raisman y Li, 2007; Grosu -Bularda et al., 2015). También se ha propuesto el uso de las células de la glía envolvente olfatoria como elementos en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, debido a la remielinización de fibras nerviosas periféricas en presencia de OECs [49, 50]. Los trabajos realizados muestran que el trasplante de OECs podrían estar promoviendo la regeneración a nivel del sistema nervioso central mediante la regeneración axonal y los procesos de remielinización de los axones. No obstante, hay una gran controversia al respecto porque hay otros estudios que no han conseguido estos efectos, por lo que el debate de si las OECs son eficaces en la terapia regenerativa sigue abierto.

Si nos centramos en los estudios que han obtenido resultados prometedores, vemos que se han estudiado diferentes tipos de lesión: en áreas de desmielinización, en lesiones del tracto corticoespinal, en secciones medulares completas o bien de las raíces dorsales. En todas ellas se realizaba el trasplante de OECs y se obtenía una recuperación funcional (Li et al., 2000; Imaizumi et al., 2000; Li et al., 2001; Lu et al., 2001; Li et al., 2003; Keyvan-Foulardi et al., 2003; Shen et al., 2004; Cao et al., 2004) o mejoras a nivel histológico, como la reducción de la cicatriz glial (Ramer et al., 2004) o la remielinización (Imaizumi et al., 1998; Barnett et al., 2000; Lakatos et al., 2000; Radtke et al., 2004).

En las lesiones traumáticas de médula espinal se observa un proceso de desmielinización axonal que se cree debido a la pérdida de sustrato glial en la lesión por la necrosis y la apoptosis que derivan del daño (Blight, 1993; Li et al, 1996; Lu et al., 2000). De hecho, se ha observado que algunos de los axones pese a permanecer intactos después de la lesión

sufren este proceso de desmielinización, lo que conlleva pérdida de función y posibilidad de degeneración walleriana en la parte distal de la lesión (Lakatos et al., 2003). En estos casos, las OECs, pese a no producir mielina, podrían promover la mielinización en lesiones de medula espinal como indican algunos estudios (Imaizumi et al., 1998; Pérez-Bouza et al., 1999; Navarro et al., 1999; Lakatos et al., 2000; Ruitenberg et al., 2002; Santos-Benito y Ramón-Cueto, 2003), pero esta es una hipótesis ya que faltan técnicas adecuadas para establecer esta premisa como cierta (Radtke et al., 2004; Ramer et al., 2004). De todas formas, si se sabe que las OECs promueven la migración de las células de Schwann desde los bordes de la lesión hacia el centro de la cicatriz glial (Ramón-Cueto et al., 2000; Richter et al., 2005). De hecho, se cree que son estas células de Schwann reclutadas las causantes de la remielinización observada en algunos estudios.

Independientemente de que estrategia sea la más efectiva para regenerar la lesión neural mediante OECs, es importante que haya una recuperación funcional a nivel axonal. Hay algunos estudios en que se ha podido observar recuperación funcional después de un trasplante de OECs a diferentes niveles, desde recuperación del movimiento respiratorio (Takami et al., 2002) hasta recuperación de la locomoción (von Wild y Brunelli, 2003). Pero esta recuperación observada se desconoce si es por fruto de la reconexión axonal o de otros factores que no se han descrito.

1.3 Biomateriales en regeneración neural

El SNP tiene cierta capacidad regenerativa intrínseca que no se encuentra en el SNC, no obstante, tiene limitaciones importantes si la distancia a regenerar es muy grande. Los biomateriales en forma de andamios (*scaffolds*) o similares, pueden aportar un sustento para mejorar esta capacidad intrínseca y mejorar el estado regenerativo del tejido neural después de una lesión.

Los *scaffolds* deben de tener una serie de características que los hacen adecuados para la regeneración neural: biocompatibilidad, tasa de degradación adecuada al tejido y propiedades mecánicas específicas (Hsieh et al., 2015). Además de estas tres características debemos de diferenciar entre polímeros naturales o sintéticos para realizar los *scaffolds* o hidrogeles, como pueden ser alginato, colágeno, gelatina, quitosano, ácido poli láctico (PLA), ácido poli glicólico, policaprolactona (PCL), ácido

hialurónico, fibroína de seda, polifosfoéster y poliuretano. Los materiales naturales van a tener una serie de ventajas respecto a los sintéticos, una de esas va a ser la biocompatibilidad. Además, podemos mejorar la bioactividad mediante el uso de materiales conductores (polipirrol, etc.) que mejoren el crecimiento neurítico (Guo y Ma, 2018). Otra característica importante para tener en cuenta cuando usamos biomateriales en regeneración es que se adapten a la dureza del tejido a regenerar, por ejemplo, se conoce que materiales más rígidos (7-10 KPa) promueven la diferenciación de la glía residente, no obstante, los materiales más blandos (100-1000 Pa) promueven la diferenciación neural (Tseng, et al., 2015). En la actualidad hay dos opciones que cumplen estas condiciones y que se han llevado a la práctica con buenos resultados, estos son los hidrogeles y los conductos para el guiado nervioso de tipo NGC (del inglés, *Nerve Guide Conduits*)

Los hidrogeles se han estudiado como terapia inyectable en SNC, que implican gelificar en el sitio de inyección, adaptándose al espacio existente, pero no pudiendo controlar la forma en la que se va a expandir. Tiene la ventaja de no requerir invadir el tejido ni abrir herida, además, se pueden incluir fármacos o células junto con el hidrogel. Por ejemplo, eliminar la cicatriz glial podría inducir un daño mayor que el causado en la lesión primaria, en este caso los hidrogeles podrían invadir el espacio de la cicatriz glial para permitir el crecimiento axonal a través de esta, e incluso servir como soporte para otros *scaffolds*. En este aspecto, hay diferentes inconvenientes según sus propiedades, ya que podríamos tener desde una gelificación excesivamente rápida que obstruya la aguja a que no sea lo suficientemente rápida y se expanda a otras áreas no deseadas. Por ello, el reciente desarrollo de hidrogeles autoregenerantes (*self-healing*) está despertando gran interés por sus propiedades. En los hidrogeles autoregenerantes las cadenas poliméricas estables se ensamblan mediante sus cadenas laterales de forma reversible mediante inductores para crear una red y formar el hidrogel en el lugar que se decida (Liu y Hsu, 2018). Estos hidrogeles se abren como una gran posibilidad en el campo de la medicina regenerativa y en la regeneración del SNC. De hecho, en el SNC mejora la oxigenación del tejido e induce la diferenciación de las células madre neurales (NSC) (Cheng et al., 2019).

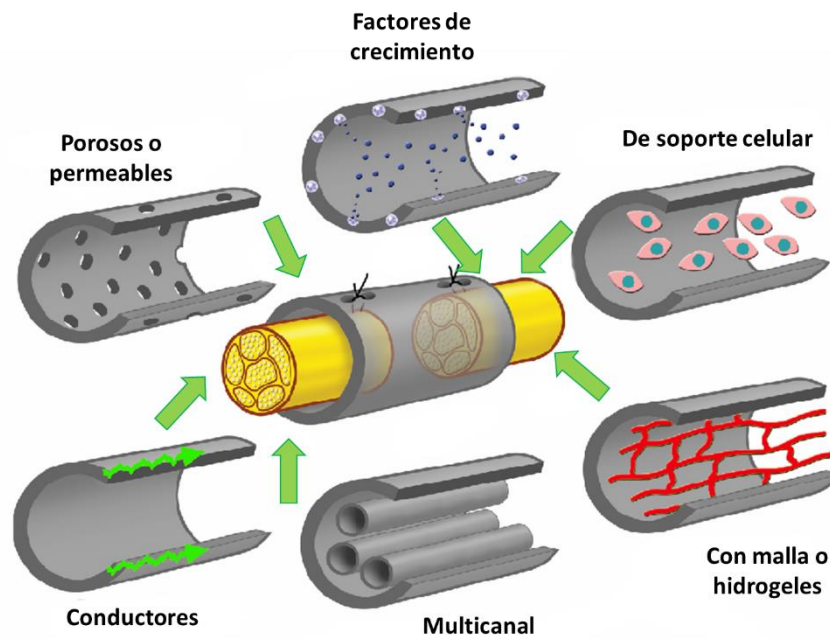


Figura 4. Estrategias usadas para los conductos de tipo NGC. El interior del canal puede estar relleno con células, hidrogeles, mallas u otros canales. El propio canal puede ser conductor, poroso o permeable, o bien liberar de forma continuada factores de crecimiento. Adaptado de: de Ruiter et al., 2009.

Los conductos para el guiado nervioso de tipo NGC sirven para unir el tejido nervioso cortado que se usa en la práctica clínica para reemplazar trozos extraídos para los injertos de nervios autólogos en cirugías. Igual que el resto de *scaffolds*, los NGC deben de superar las barreras de biocompatibilidad, biodegradabilidad, adhesión, propiedades mecánicas y permeabilidad (Gu et al., 2011). Dentro de esta estructura tubular se pueden incorporar estructuras más complejas que permitan nuevas posibilidades en el campo del crecimiento axonal y la revascularización, así como el guiado axonal y el aporte de gases y nutrientes al tejido regenerado (Figura 4).

Es importante tener en cuenta, que no sólo se debe de aplicar una estrategia en el ámbito de la regeneración neural, puesto que hay una gran complejidad biológica dentro de la propia lesión, por lo que el uso de *scaffolds* se debe de compatibilizar con células y factores de crecimiento. Además, se debe de tener en cuenta el aporte de nutrientes y gases por lo que la angiogénesis juega un papel fundamental en la regeneración neural. Para mejorar la angiogénesis en regeneración neural, se pueden incluir diferentes

estrategias como el cultivo de células específicas, incorporar factores de crecimiento o fabricando canales dentro del hidrogel.

Actualmente en la clínica hay una serie de elementos basados en biomateriales y diferentes moléculas o factores tróficos que se usan en la práctica clínica. No obstante, esta tesis no puede abarcar toda la existencia de estos factores, que se pueden encontrar en múltiples revisiones sobre los *scaffolds* en investigación y en clínica en regeneración neural (ver revisiones de Liu S et al., 2019).

1.3.1 Las nanofibras en regeneración neural

Las nanofibras son una de las formas en las que podemos tener un *scaffold* viable para implantar en una lesión neural para promover su regeneración y mejora funcional. Para que la terapia tenga éxito se requiere que las nanofibras cumplan unos criterios marcados de fisicoquímicos, bioquímicos, mecánicos, topográficos y eléctricos. Unos de los hitos más relevantes de las nanofibras es su capacidad para mimetizar la MEC del sitio de la lesión, haciéndola una buena candidata para la regeneración de nervios o médula espinal (en el cerebro se debería valorar según el sitio de lesión, siendo este más complicado por su diversidad estructural y su complejidad anatomorfológica). De hecho, la relación superficie-volumen de las nanofibras es muy elevada, lo que provee de muchos sitios de contacto para las células o los axones en migración o crecimiento, actuando como guía para la extensión axonal (Raspa et al., 2016; Sensharma et al., 2017).

Algunos estudios realizados muestran que las nanofibras, de diferentes materiales, pueden mejorar la lesión, inducir cambios en los elementos presentes en la lesión e incluso inducir cierta recuperación funcional. Por ejemplo, usando nanofibras de una mezcla de ácido poli-láctico-glicólico y polietilenglicol (PEG) se promueve la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las iPSC (del inglés, *induced pluripotent stem cells*, o células madre inducidas) en precursores neurales (Pang et al., 2016). Además, las nanofibras de poli- β -hidroxibutirato (HHx) facilitan el crecimiento y diferenciación de las NSCs (del inglés, *neural stem cells*) (Xu et al., 2010). Otras nanofibras han mostrado beneficios en reducir la cavidad cística que se forma en la lesión de médula espinal. Este es el caso de las nanofibras de policaprolactona (PCL), que combinadas con células madre endometriales humanas (hEnSCs, del inglés *human endometrial stem cells*) disminuyen la

cavidad cística y mejoran la continuidad de médula espinal en hemisección (Terraf et al., 2016). Por último, y más complicado, lograr regeneración o mejora funcional en lesiones neurales, se ha podido observar en nanofibras de ácido poliláctico (PLA) con el fármaco paclitaxel que promueven la extensión neurítica (Roman et al., 2016). Además, el hecho de usar microfibras alineadas de PLA promueve la extensión axonal en cultivo in vitro al actuar como guía direccional (Corey et al., 2007; Han et al., 2009; Liu et al., 2012) y reduciendo la cavidad cística en modelos de SCI (Hurtado et al., 2011; Colello et al., 2013).

1.3.2 Biomateriales y OECs usados en regeneración neural

Entre los diferentes estudios, los OEC se han utilizado en co-terapia con armazones y materiales nerviosos y se han revelado como una terapia prometedora para la reparación de la curación de los nervios (Tan et al., 2013; Radtke y Kocsis, 2014). Se han utilizado varios armazones y materiales nerviosos, incluidas nanopartículas y conducto de ácido poli láctico-glicólico, en combinación con OEC para la reparación de defectos nerviosos periféricos, y han revelado resultados prometedores para reparar defectos en los nervios facial y ciático (Tan et al., 2013; Radtke y Kocsis, 2014).

Casi todos los estudios que combinan materiales y OEC implican el uso de material de baja tasa de degradación o diferentes propiedades mecánicas, no obstante, hay pocos o estudios sobre el uso de biomateriales y OECs en terapia combinada para regeneración neural. En este trabajo, utilizamos nanofibras electrohiladas en un dispositivo fácilmente transportable para guiar químicamente la migración de OEC para su uso en la reparación de daños nerviosos. Nuestro sistema ofrece un modo factible para localizar específicamente los OEC en la lesión de forma guiada con un material altamente biocompatible como modelo para la regeneración nerviosa.

2. Materiales y métodos

Cultivo de TEG3

Las células TEG3 son una línea celular inmortalizada a partir de células de la glía envolvente olfativa (OECs) de rata. Han sido cedidas por el Dr. Moreno-Flores, quien describió y creó esta línea celular en el 2003. Para ello a partir de un cultivo primario de OECs de rata transfectados con el antígeno largo T del virus simio 40 (SV40) comúnmente utilizado para la inmortalización de cultivos celulares y creación de líneas inmortalizadas (Moreno-Flores et al., 2003). En esta tesis se utilizan tanto las TEG3 originales como las modificadas en trabajos anteriores para expresar un fluorocromo (TEG3-eGFP) (Reginensi et al., 2015).

Ambas líneas celulares se mantienen en medio ME-10, compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, 11320033; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado con 10% de suero de ternera bobino (BCS; 12133C; Sigma-Aldrich, Merck Life Science), 20 µg/ml de extracto de pituitaria (13028014; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2µM de forskolina (F6886; Sigma-Aldrich, Merck Life Science), 1% de penicilina/estreptomicina (15140122; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y 1 % del antifúngico fungizona (15290026; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las células se deben de mantener en cultivo a 37°C y 5% CO₂, y los pases no deben de extenderse más allá de 10 para los experimentos.

Tratamiento de los cubreobjetos

Para los experimentos con TEG3 es importante que los sustratos estén en buenas condiciones, y para ello es necesario tratar los cubreobjetos con anterioridad. Para ello, cubreobjetos de vidrio circulares (12-15 mm Ø) se eliminan las impurezas por sonicación y lavados con H₂O-mq, etanol 70%, acetona y metanol. Una vez secos se esterilizan en el autoclave, y ya se pueden utilizar en condiciones estériles. Un pretratamiento con tampón borato prepara la superficie para el cultivo celular, para ello se incuban los cubreobjetos toda la noche a 4°C con una solución de tampón borato 0,1M. El tampón

borato se prepara con ácido bórico (3,1 gr/L; B1934; Sigma-Aldrich, Merck Life Science) y tetraborato sódico tetrahidratado (4,75 gr/L; 31457; Sigma-Aldrich, Merck Life Science) en H₂O-mq. Después de lavar con abundante H₂O-mq se incuban 1 hora a 37°C con poli-L-lisina (P4707; Sigma-Aldrich, Merck Life Science) a 10 µg/ml disuelta en PBS 0,1M. Por último, se lavan con PBS 0,1M y se procede a realizar los coating correspondientes, según el experimento, con 12 µg/ml de condroitin sulfato proteoglicano (CSPG; CC117; Millipore, Merck Life Science), 2 mg/ml (en 0,1M PBS) de laminina (L2020; Sigma-Aldrich, Merck Life Science) o 50 µg/ml (en 0.1% BSA-PBS 0,1M) de CXCL12/SDF-1α (250-20A; Peprotech) durante 1h a 37°C. Posteriormente se realizan lavados con PBS 0,1M antes de realizar el experimento.

Caracterización de la morfología de las TEG3

El comportamiento celular se altera según el sustrato sobre el que se adhiere la célula, desde modificación de su morfología, hasta expresión de ciertos factores en presencia de determinados sustratos. En esta tesis se quiere determinar el comportamiento morfológico de las TEG3 en presencia de los diferentes sustratos: laminina, CSPG y CXCL12/SDF-1α. Para ellos se preparan cubreobjetos como se ha explicado anteriormente con los tres sustratos elegidos. En medio ME-10 se siembran las TEG3 a una densidad de 100.000 células en una placa de 9,5 cm², y se dejan a 37°C y 5% CO₂ durante 20 horas. Se comprueba por campo claro que las células se han adherido y se fijan mediante PFA 4% por 10 minutos. Posteriormente se realizan una serie de tinciones para determinar el estado de la F-actina (Phalloidin-TRITC), la secreción de CXCL12/SDF-1α y la presencia del receptor CXCR4.

Determinación del alineamiento celular

Para evaluar el efecto global que tienen las nanofibras sobre las células se analiza el grado de alineamiento celular que se obtienen en relación con el diámetro de las nanofibras, además de comprobar el alineamiento celular de las TEG3 en función de la presencia de nanofibras en el cultivo. Para ellos se toman una 7 fotografías en campo claro de cada condición: 300-350 nm; 450-530 nm; 700-750 nm; 900-1000 nm y 1350-1400 nm. En la imagen de 8 bits se aplica un filtro de media con radio de 15.0 y un filtro del tipo FFT (*Fast*

Fourier Transform), más concretamente el filtro *bandpass*. A continuación, se aplica el *Sauvola's local thresholding* antes de usar el plugin de ImageJ *Directionality* (ImageJ; license GPLv3). Este plugin aporta información sobre la proporción de partículas en una imagen orientadas en cierto grado sobre una media determinada por el ángulo de todas las partículas. En el espectro de 180°, los ángulo de 0 a 90° corresponden a una orientación y los ángulos mayores de 0 hasta 90° corresponden a la otra dirección. De estos valores se crea un histograma de frecuencias según el ángulo que nos permite saber el grado de alineamiento de las células TEG3 en cultivo.

Ensayo de bandas o *stripes assay*

El ensayo de bandas, o *stripes assay* en inglés, permite crear patrones alternos de diferentes sustratos mediante el uso de un dispositivo chip (Vielmetter J et al., 2001). Para este ensayo usamos cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina (descrito anteriormente) al que, una vez secos y en condiciones estériles, se le agrega por presión un dispositivo de silicona con varios canales paralelos. Dentro del canal principal se realiza un primer coateado introduciendo la solución con ayuda de una aguja. Esta primera solución debe de contener la proteína de interés y un marcador fluorescente que permita visualizar su disposición, en este caso se ha usado el marcador fluorescente Alexa-594 conjugado a BSA al 0.1% (A13101, Invitrogen). Sin desplazar el dispositivo, esta solución se incuba durante 1h a 37°C, y se lava con PBS 0,1M con la ayuda de otra aguja y aspirando el otro extremo. Una vez lavado, se levanta el chip y se incuba todo el cubreobjeto con la solución del segundo sustrato sin marcado fluorescente durante 1 hora a 37°C. Por último, se lava dos veces el cubreobjetos en PBS 0,1M y se siembran las células TEG3-eGFP a alta densidad (150.000 células en 9,5 cm²). A las 24 horas se fijan las células, se tiñe su núcleo con Hoescht, y se montan en un medio acuoso (Mowiol). Se fotografían 10 campos al azar de cada condición en el microscopio bx61 (Olympus) y una cámara DC50 de Olympus. Las imágenes se procesan con el software ImageJ y se cuentan el número de células en cada condición (sustrato 1 y 2). Se expresan los resultados como el porcentaje de células en cada sustrato respecto al total de células en los campos analizados.

Inmunocitoquímica de TEG3

Las células TEG3 en cultivo *in vitro*, sobre nanofibras o sobre otros sustratos, se fijan durante 10 minutos con PFA 4%, se lavan con PBS 0,1M y se procede a bloquear la muestra antes de incubar los anticuerpos. La solución de bloqueo se compone de suero (FBS) al 10% y PBS 0.1M con Tritón X-100 al 0.05%. Después de lavar con PBS 0.1M con Tritón X-100 al 0.05% se incuba con el anticuerpo primario durante 2h a temperatura ambiente en una solución compuesta por el anticuerpo primario, 7% FBS y PBS-gelatina 0.2% y Tritón X-100 al 0.05%. Por último, se vuelve a lavar con PBS 0.1M con Tritón X-100 al 0.05%, y se revela con el secundario marcado mediante los fluorocromos específicos (Alexa 488 y 568, Life Technologies) con 7% suero (FBS) y PBS 0.1M-gelatina 0.2% y Tritón X-100 al 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Si procede, se realiza una tinción de núcleo mediante Hoescht 1 µg/ml durante 10 minutos (Sigma). En algunas muestras, para visualizar la F-actina, se realiza una tinción específica a base de Phalloidin-TRITC (1:400; P5282; Sigma-Aldrich, Merck Life Science) durante 1 hora a 30 °C en la misma solución de incubación que el anticuerpo primario. La células en cubreobjetos se montan en un medio acuoso (Mowiol) sobre un portaobjeto, y se visualizan en el microscopio de fluorescencia bx61 (Olympus) equipado con una cámara DC50 de Olympus. Las imágenes se procesan con el software ImageJ. Los anticuerpos usados son CXCR4 (1:1000; Antibody BCN; TP503; lot N° 010618) y CXCL12/SDF-1α (1:1000; Abcam; AB25117).

Creación de nanofibras y funcionalización

El proceso de electrospinning y funcionalización de las nanofibras ha sido desarrollado y llevado a cabo en colaboración con el Dr Oscar Castaño, bajo la supervisión de la Dr Elisabeth Engel en el *Institute for Bioengineering of Catalonia* (IBEC), dentro del grupo de *Biomaterials for Regenerative Therapies*. Para este trabajo se ha colaborado estrechamente con el grupo para la obtención de las nanofibras en sus diferentes formas. Las nanofibras se componen de ácido poliláctico (PLA, PURASORB® PLDL 8038 Corbion, Amsterdam, The Netherlands, inherent viscosity midpoint 3.8 dl/g,), y se producen mediante el método de electrospinning. En el proceso de electrospinning se usan diferentes concentraciones (3,4,6,8 and 10% w/w) de PLA en 2,2,2-trifluoroethanol) (99.8%; Panreac, Barcelona, Spain), con la intención de variar el diámetro de las fibras, y

encontrar el diámetro adecuado para las TEG3. Para visualizar las nanofibras en imágenes de fluorescencia, se puede añadir Rodamina B al 0,01% en la solución del PLA.

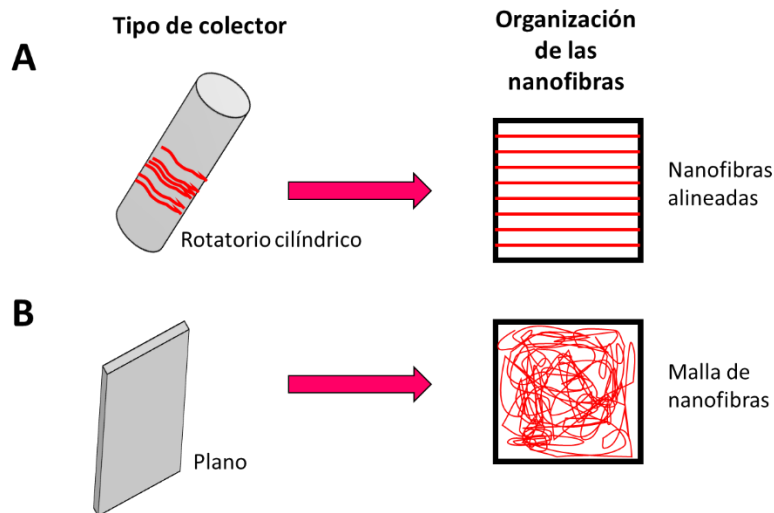


Figura 5. El proceso de electrospinning o electrohilado de nanofibras puede producir diferentes tipos de organización según el tipo de colector que se use. Para obtener mallas de nanofibras se usa un colector plano (B). En cambio, para conseguir nanofibras alineadas entre ellas se precisa de un colector cilíndrico rotatorio (A).

El proceso de electrospinning tarda alrededor de 30 segundos a 14KV, 1200 rpms, humedad relativa del 30 % y 16 °C. Manteniendo una distancia de 20 cm desde punta hasta el colector, las nanofibras se depositan en dos tipos de sustratos adheridos al colector rotatorio (Figura 5). En primer lugar, las nanofibras se pueden depositar sobre los cubreobjetos tratados con los diferentes sustratos como se ha explicado con anterioridad. En segundo lugar, se pueden depositar en un marco de Parafilm™ (Bemis Company, Inc, Neenah, WI, US), dónde las nanofibras se apoyan en los extremos y el centro queda suspendido. En esta preparación se recortan marcos de Parafilm, que es maleable y estable, con un tamaño exterior de 15 x 15 mm y 12 x 12 mm en su interior.

En este proceso permite obtener nanofibras, alineadas perpendicularmente entre ellas, tanto sobre sustratos de diferentes tipos, como en suspensión, para su aplicación en terapias regenerativas. En ambos casos se puede realizar una funcionalización de las nanofibras, al disponer de un sustrato sobre el que trabajar. Las nanofibras de 950 nm de

diámetro se funcionalizan con el CXCL12/SDF-1 α mediante la inmersión en una serie de soluciones. En primer lugar, se debe de activar la superficie hidrolizándola con una solución 0,01M de hidróxido de sodio (NaOH) durante 10 minutos. Después de varios lavados con agua purificada, se sumergen en una solución MES a pH=5.5 de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) 1/1.2 durante 10 min. El EDC activa los grupos carboxilo, al que se une el NHS, para poder formar enlaces amino a pH fisiológico, y lograr una unión covalente con el péptido CXCL12/SDF-1 α . El último paso, después de lavar las nanofibras con agua purificada, es sumergir la preparación en una solución 50 ng/ml de CXL12/SDF-1 α a una velocidad de 10 mm/minuto. Con este método se consigue una funcionalización en gradiente, no obstante, se puede realizar una funcionalización a máxima concentración de una parte de las nanofibras dejando sumergida la preparación, como se utiliza en algunos experimentos.

Caracterización de nanofibras y de su funcionalización

En estudios previos en el grupo de investigación se caracterizó la morfología de las nanofibras de PLA mediante *Field Emission Scanning Electron Microscopy* (FESEM, Nova™-Nano SEM-230; FEI Co., Hillsboro, OR, USA). El diámetro medio de las nanofibras varía según la concentración de PLA usada en el experimento (Schneider et al., 2012). Sus diámetros varían desde 200 nm a 1300 nm, y se pueden funcionalizar mediante el método descrito con anterioridad. La funcionalización la detectamos mediante un inmunoensayo contra el quimiocina CXCL12/SDF-1 α . Para ello, se usan nanofibras funcionalizadas sin células, que se incuban durante 30 minutos con solución de bloqueo (PBS 0,1M-gelatina 0.2%, 10% FBS) sin Tritón-X100. Después de lavar con PBS 0,1M se incuban con el anticuerpo primario CXCL12/SDF-1 α (1:500; Abcam; AB25117), en PBS 0,1M-gelatina 0,2% y 5% FBS durante 1h a temperatura ambiente. Por último, después de lavarlas con PBS 0,1M, se incuba el anticuerpo secundario Alexa 488 durante 1h a temperatura ambiente en PBS 0,1M-gelatina 0,2% y 5% FBS. Se realizan fotografías en campo claro y fluorescencia con el microscopio bx61 (Olympus) y se procesan las imágenes con el software ImageJ.

Las nanofibras se caracterizaron mecánicamente por el Dr Oscar Castaño mediante el ensayo de tracción con Zwicki Z0.5 TN (Zwick-Roell, Ulm Germany) en paralelo a la

dirección de las nanofibras. Para caracterizar la muestra es necesario tener un cilindro de nanofibras paralelas, para ello se crea una malla de grosor 20-30 μ m, que se enrolla para poder encajarla en la máquina de ensayos mecánicos. Siguiendo el mismo procedimiento descrito para el electrospinning, se amplía el tiempo a 3h, y el resultado se corta uniformemente con ayuda de un bisturí. Al enrollar esta capa, el cilindro resultante se engancha en las pinzas de la máquina de ensayos y se aplica una carga de 5N como máximo de forma creciente (10 mm/minuto) hasta que se rompe el cilindro. Por último, a partir de la regresión lineal se obtiene el módulo elástico de Young.

Cultivo de TEG3 sobre nanofibras

En estudios previos en el grupo de investigación se caracterizó la morfología de las nanofibras de PLA mediante Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM, Nova™-Nano SEM-230; FEI Co., Hillsboro, OR, USA). Mediante FESEM se determinó el diámetro medio de las nanofibras según la concentración de PLA usada en el experimento (Schneider et al., 2012). Una vez determinado el diámetro de las fibras, se hace electrospinning sobre cubreobjetos con diferentes diámetros de nanofibras (300-1200nm) y laminina. Se siembran las TEG3 (30.000 células) sobre los cubreobjetos en medio ME-10 y se fija en PFA 4% 10 minutos a las 20 horas. Se toman fotos de campo claro de cada condición con el microscopio invertido IX71 (Olympus) equipado con una cámara DC50 (Olympus), y se calcula el grado de adhesión de las células TEG3 a las nanofibras de los diferentes diámetros. Se expresa el porcentaje de TEG3 sobre las nanofibras respecto al total.

Time-lapse de TEG3 sobre nanofibras funcionalizadas

Los experimentos de time-lapse se realizan con placas con el fondo de video, que permiten visualizar las células y las nanofibras a gran aumento sin distorsiones. Para ello se usan las placas de cultivo Fluorodish (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) tratadas con poli-L-lisina, y laminina o CSPG, como se ha indicado en apartados anteriores (ver apartado *Tratamiento de los cubreobjetos*). A continuación, se depositan los marcos de Parafilm con las nanofibras funcionalizadas en la mitad de su longitud. Para evitar la flotación de los marcos de nanofibras se adhieren a la placa mediante cinta adhesiva, que

ha resultado ser biocompatible. Una vez estos están esterilizados mediante la exposición a UV durante 15 minutos se coloca una pieza rectangular de polimetilsiloxano (PDMS) con una abertura de aproximadamente 500 μm de ancho sobre las nanofibras y se siembran aproximadamente 2×10^4 TEG3. Después de 12h, y una vez se comprueba que las TEG3 se han adherido a la placa y las nanofibras, se retira el PDMS con cuidado y se añade medio de cultivo completo a toda la placa. En este punto se cuenta como tiempo 0 y se inicia el time-lapse. En algunos casos se fijan a 4 o a 6 días de cultivo *in vitro* y se procesan mediante inmunocitoquímica.

Para la toma de las secuencias las muestras se pasan al incubador Live Cell Instruments (LCI Instruments, Seoul, Korea) donde se graban durante 25 h. El tracking se realiza con el microscopio invertido IX71 (objetivo de 20x) y las imágenes (5 megapíxeles cada una) se toman con una cámara ORCA Flash 4 o una cámara Olympus CX50 (toma de foto cada 8 minutos) (Nocentini et al., 2012; Reginensi et al., 2015). Por último, los ficheros resultantes se exportan como formato no-comprimido AVI (del inglés, *Audio Video Interleave*) para analizar la migración con el plugin de ImageJ™ MTrack (Castaño et al., 2021).

3. Resultados

1) Caracterización de la línea celular TEG3

Las TEG3 son una línea inmortalizada de células de la glía envolvente olfatoria (OECs) de rata creadas en el 2003 por el equipo del Dr Moreno-Flores, y que han servido para varios estudios sobre las propiedades de las OECs. Su caracterización a nivel de expresión molecular ha sido publicada y estudiada con anterioridad en dicho grupo, no obstante, aquí se presenta una caracterización en base a su morfología y el sustrato sobre el que se adhieren.

Las TEG3 tienen la capacidad de adherirse al sustrato mediante adhesiones focales maduras mediante el reconocimiento de los motivos RGD de la matriz extracelular por las integrinas (Van Agthoven et al., 2014). Las células expresan integrinas (Fig. 6A), como la integrina $\alpha5\beta3$, que participan en el reconocimiento de la MEC (fibronectina, vitronectina, etc.) y se encargan de unir la célula a la MEC. Acto seguido, a través de la creación de más adhesiones, se compone la adhesión focal, que conecta el punto de adhesión a la MEC con el citoesqueleto de actina celular. Las TEG3 expresan vinculina (Fig. 7B) en las regiones donde se forman las adhesiones focales y conectan con el citoesqueleto de actina. Todo ello indica que, en sustratos permisivos, las TEG3 son capaces de adherirse a la MEC y conectar las adhesiones focales al citoesqueleto de actina para ejercer su desplazamiento sobre el sustrato.

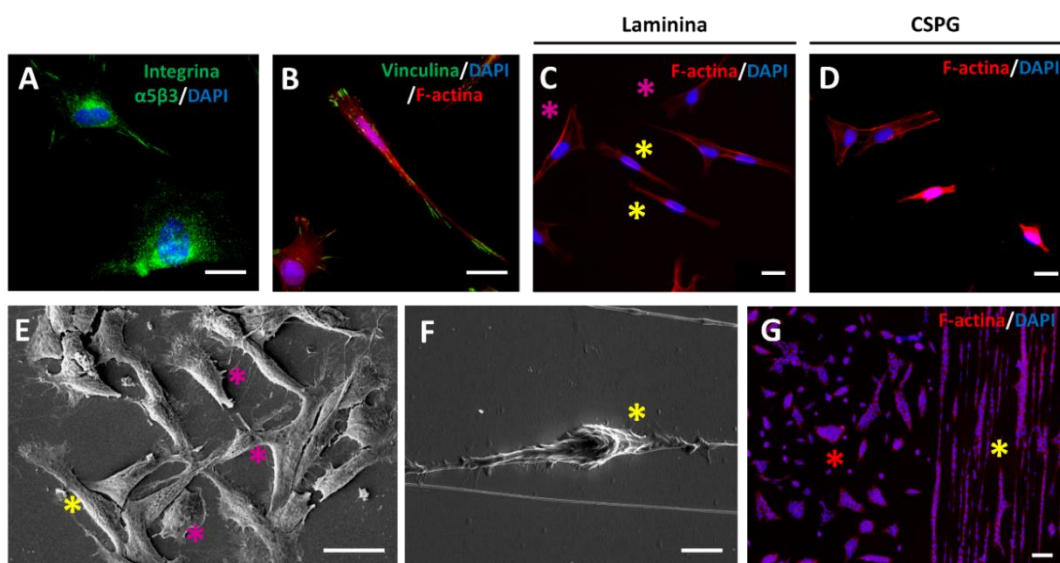


Figura 6. Caracterización de la morfología de las TEG3 en diferentes sustratos. Las TEG3 expresan la maquinaria necesaria para adherirse al sustrato (A) y migrar (B). Sobre un sustrato permisivo como la laminina (C) van a adquirir diferentes morfologías (E) (SEM). En sustratos inhibitorios como el CSPG, las TEG3 pierden esta morfología (D). Al cultivar las TEG3 sobre nanofibras estas adaptan su morfología a la nanofibras (F), siendo esta preferencial para las TEG3 y adoptando todas ellas morfología fusiforme en presencia de nanofibras (G). Asteriscos: rosa (morfología celular pseudo-estrellada), amarillo (células fusiformes), rojo (agrupaciones celulares desorganizadas). Barras de escala: A-20 μm , B, C y D-10 μm , E-50 μm , F-7.5 μm y G-100 μm . Adaptado de Castaño et al., 2021.

Estas interacciones de la célula con la MEC van a determinar cuál es su morfología, según el estado de la migración en el que se encuentre o su capacidad para adherirse a los diferentes sustratos. Si nos fijamos en la morfología celular de las TEG3 en los diferentes sustratos sobre el que se adhieren *in vitro*, podemos apreciar diferencias en su morfología (Fig. 6E). Las TEG3 presentan dos tipos de morfología, que varían con el tiempo según su movimiento y el sustrato sobre el que están adheridas. En sustratos permisivos como la laminina (Fig. 6C) podemos apreciar claramente estas dos morfologías, en cambio, en sustrato inhibitorios, como el CSPG, pierden toda su morfología, presentando una superficie de adhesión mínima (Fig. 6D).

La morfología de las TEG3 varía según el estado migratorio de la célula y del tipo de sustrato, de hecho, al analizar sustratos multidimensionales, como el caso de las nanofibras, las TEG3 adoptan una morfología fusiforme (Fig. 6F). Las TEG3 son capaces de adherirse a las nanofibras desde un sustrato permisivo bidimensional, crear adhesiones a las nanofibras e incluso migrar todo su cuerpo celular encima de estas tal y como podemos observar en las imágenes de SEM. De hecho, la morfología celular va a pasar de ser de carácter mixto a morfología fusiforme, que resigue toda la nanofibra a lo largo (Fig. 6G). De hecho, las TEG3 prefieren usar las nanofibras como sustrato (asterisco amarillo en Figura 1G), que no un sustrato bidimensional con un recubrimiento permisivo (cubreobjetos con laminina) (asterisco rojo en Figura 6G). No se conoce con exactitud porque ocurre esto, podría ser por una diferencia en la morfología (prefieren su estado fusiforme), por la menor densidad de adhesiones que deben de formar, por la geometría de las nanofibras, por diferencia de rigidez, etc.

2) Caracterización de las nanofibras de PLA (80/20)

La forma en la que el material se deposita sobre el colector después de la extrusión, la proporción de solvente y las características del proceso de electrospinning determinan las propiedades de las nanofibras. Para caracterizar la morfología de las nanofibras de PLA se ha usado el Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM). Mediante esta técnica se determina el diámetro medio de las nanofibras, variando desde 200 nm a 1300 nm, y observamos que las nanofibras están alineadas, que no presentan grandes roturas en su estructura y podemos determinar su homogeneidad (Fig. 7A). La presencia de fisuras en las nanofibras podría variar el grado de adhesión de las células, por lo que tener una estructura estable y homogénea garantiza que no habrá variaciones en cuando a la adhesión celular (Fig. 7B). Además, las nanofibras se pueden detectar fácilmente en inmunoensayos si se añade 0.01% de Rodamina B, la cual ha resultado no ser tóxica para las TEG3 (Fig. 7C).

Determinar las características fisicoquímicas de las nanofibras nos aporta información sobre su resistencia mecánica y química, y sobre su degradación. Estos ensayos llevados a cabo por el Dr. Oscar Castaño, determinaron el grado de cristalinidad de las nanofibras mediante mediciones DSC ($\% \chi_c = 10.2\%$; *Differential Scanning Calorimetry*) a Tg de 59.1°C. Una baja cristalinidad en el PLA implica baja resistencia a temperaturas altas, menor resistencia a la degradación por hidrólisis y menor rigidez del material. Por tanto, tendremos un material biocompatible, cuya baja dureza hace óptimo su uso con células TEG3 y cuya degradación será relativamente rápida, lo que elimina la necesidad de una segunda operación para eliminar el biomaterial del cuerpo. La caracterización mecánica de las nanofibras mediante el ensayo de tracción con Zwicki Z0.5 TN determina el módulo de tracción de las nanofibras, que en este caso es de 97.4 ± 34.3 MPa, y el módulo elástico de Young, de 2.2 ± 1.0 GPa. Estos valores podrían explicar porque las TEG3 prefieren estar sobre las nanofibras que sobre el sustrato bidimensional.

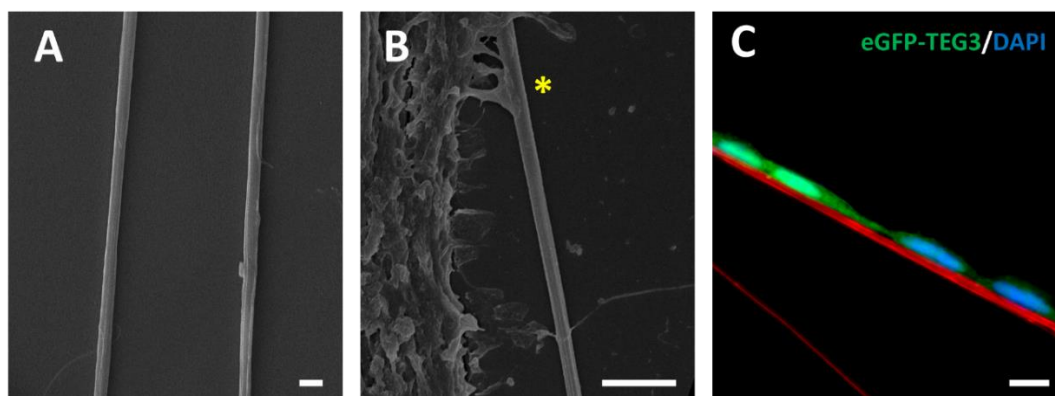


Figura 7. Caracterización de las nanofibras de PLA (80/20). Las nanofibras de PLA se someten a FESEM para evaluar su morfología, analizar su diámetro y la integridad de su estructura microscópica u homogeneidad (A). Al contacto con las células, estas pueden adherirse a su superficie (B). Y si se usa rodamina al 0.01% en la solución de electrospinning, podemos identificar las nanofibras fluorescentes y no presentan toxicidad en el cultivo celular (C). Barras de escala: A-1 μm , B-7.5 μm y C-10 μm . Adaptado de Castaño et al., 2021.

3) Adhesión y morfología de las TEG3 a las nanofibras

Una vez caracterizadas las células TEG3 y las nanofibras, y obtenidos los diferentes diámetros de nanofibras, se dividen en varios rangos (de 300 a 1450 nm), y se testan la capacidad de las TEG3 para adherirse a cada rango de diámetro de nanofibra desde el sustrato bidimensional (Fig. 8A-B). Analizando el porcentaje de TEG3 que se unen a las nanofibras respecto a las que se mantienen sobre el sustrato bidimensional, vemos que las TEG3 prefieren estar sobre las nanofibras de 950nm en el $65,18\% \pm 9,922$ (N de 8; p-valor < 0.01) (Fig. 8C).

Estos resultados indican que la morfología es importante en la adhesión de las TEG3, no sólo por las propiedades fisicoquímicas de las nanofibras. Para determinar si es realmente la morfología o el resto de las propiedades las que hacen que las TEG3 prefieran adherirse a las nanofibras de 950nm respecto al resto de diámetros se deberían de hacer más experimentos, no obstante, los resultados son satisfactorios para nuestro objetivo, por lo que usamos las nanofibras de 950nm en los siguientes experimentos.

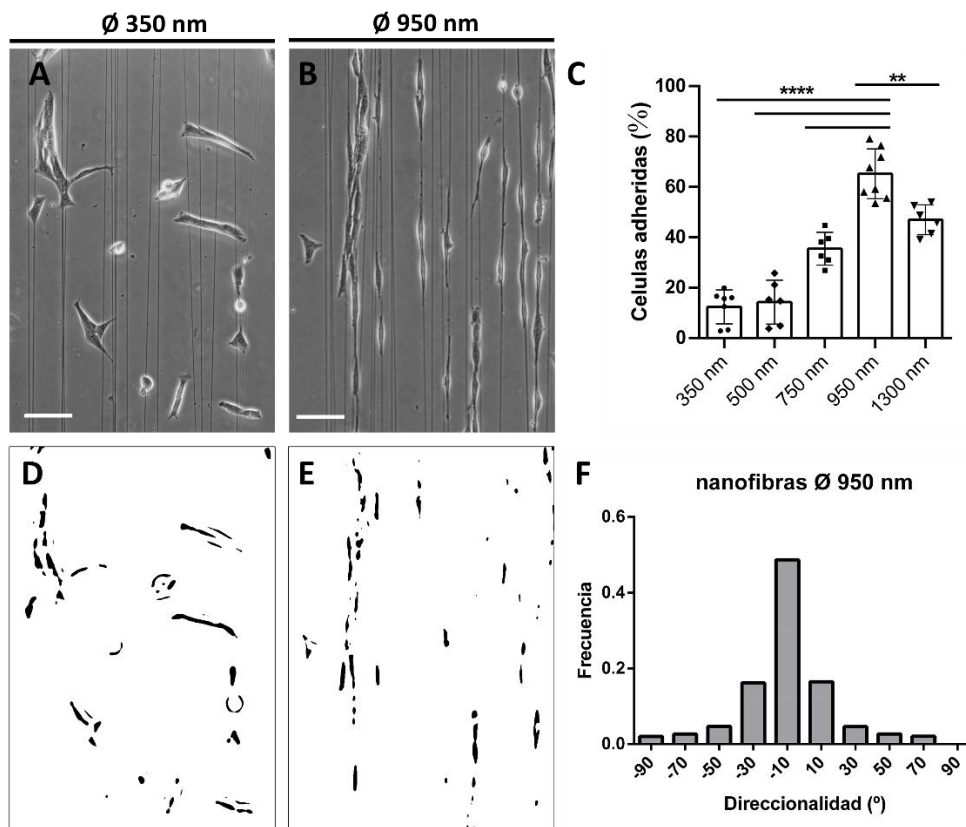


Figura 8. La adhesión y alineamiento de las TEG3 sobre las nanofibras según su diámetro. Las TEG3 se adhieren a las nanofibras de diferentes diámetros (A, B), siendo mayor el grado de adhesión celular el que encontramos en las fibras de diámetro medio de 950nm (C). El análisis de su alineamiento revela las discordancias de la dirección que siguen en nanofibras de diámetro reducido (D), no obstante, conseguimos un alto grado de alineamiento celular en las nanofibras de 950 nm (E, F). Test estadístico: one-way ANOVA (**** p-valor < 0.00001). Barra de escala: (A-E)-50 μ m. Adaptado de Castaño et al., 2021.

Además, sobre las nanofibras de 950nm conseguimos un alineamiento celular en una dirección para todas las células presentes respecto (Fig. 8E-F) al poco alineamiento que presentan en las nanofibras de 350nm (Fig. 8D), por lo que podemos afirmar que las nanofibras de 950 nm son un sustrato preferencial para alinear las TEG3 en una dirección determinada. De hecho, si consideramos la morfología de las TEG3, observamos que este alineamiento por adhesión preferencial a la nanofibra modifica la morfología celular, convirtiendo la gran mayoría en células fusiformes. Las TEG3 sobre las nanofibras de 950 nm no solo son fusiformes, sino que presentan un citoesqueleto de actina alargado y alineado, que resigue toda la longitud de la nanofibra, por lo que el movimiento a seguir

por la célula será a lo largo del eje longitudinal de la nanofibra, actuando esta como “portadora” celular en una misma dirección para todas (Fig. 9A-C).

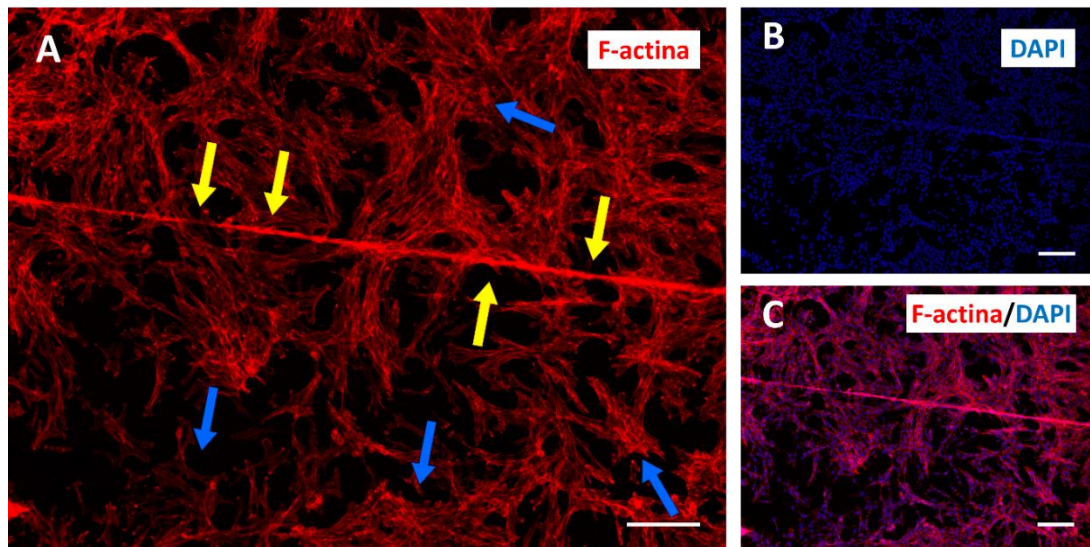


Figura 9. Las nanofibras mantiene la f-actina alineada a lo largo de la célula. Las TEG3 en cultivo *in vitro* crecen en clústeres celulares desorganizados. En estos clústeres la f-actina no sigue un patrón común, cada célula tiene orientado su citoesqueleto en una o varias direcciones (flechas azules; A, B, C). Cuando las TEG3 se adhieren a la nanofibra, su f-actina se orienta toda en una misma dirección (flechas amarillas; A, B, C). Barra de escala: A-B 300 μ m. Adaptado de Castaño et al., 2021.

4) Funcionalización de las nanofibras con las quimiocina CXCL12

En ensayos previos se han usado nanofibras sobre cubreobjetos, dónde el cubreobjetos se debe de desplazar junto con las nanofibras para conservar su integridad y disposición alineada. Estos sistemas para el estudio de la migración y morfología celular son eficaces por ser resistentes y fáciles de cultivar *in vitro*. No obstante, este sistema no nos permite transportar las células adheridas sobre las nanofibras en caso de trasladarlas a un sistema de organotípicos o *in vivo*. Para poder tener un sistema fácil de transportar y biocompatible, se usa una ventana de parafilm de 15x15mm exterior y 12x12 mm en su interior, sobre la que se hace el electrospinning y se funcionalizan mediante dip-coating (Fig. 10A). La funcionalización de las nanofibras se realiza mediante la inmersión de toda la ventana con las nanofibras alineadas a diferentes tiempos en una solución con CXCL12/SDF-1 α a 50 ng/ml, de forma que la concentración a cada parte de las nanofibras es tiempo-dependiente. Mediante esta técnica, nos aseguramos un máximo de

concentración en la región con el máximo de tiempo sumergida en la solución. Mediante técnicas inmunofluorescentes, podemos detectar el CXCL12 en las nanofibras funcionalizadas (Fig. 10B-C), estableciendo así un sistema que permite la unión covalente de la quimiocina sobre la nanofibra de PLA (80/20). Con este sistema podemos generar un grupo de nanofibras alineadas, que en una parte van a estar funcionalizadas por dip-coating, y en la otra no van a tener ningún tratamiento.

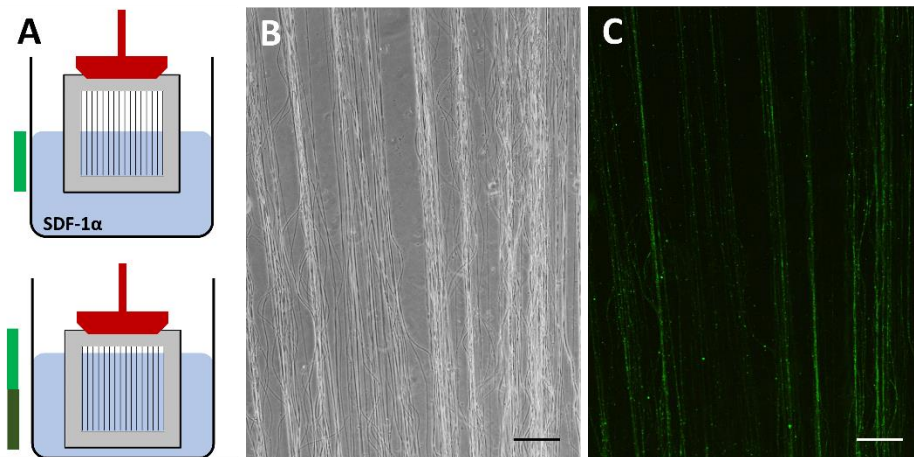


Figura 10. Técnica del *dip-coating* para la funcionalización de las nanofibras. La inmersión por tiempos de la ventana de nanofibras nos permite generar diferentes regiones con una cantidad determinada de CXCL12/SDF-1 α según el tiempo de inmersión (A). Al realizar la inmunohistoquímica de esta ventana, se aprecia claramente la funcionalización de las nanofibras (B,C). Barra de escala: (B-C)- 100 μ m. Adaptado de Castaño et al., 2021.

5) Determinación del grado de permisividad de la quimiocina CXCL12 para la adhesión de TEG3

Mediante los análisis de morfología *in vitro* sobre diferentes sustratos ya caracterizamos que las TEG3 prefieren sustratos permisivos a los inhibitorios. En el método o test de ensayo de bandas (*stripes assay*), donde cada banda contiene un sustrato diferente marcado mediante fluorescencia podemos determinar el grado de adhesión de las TEG3 sobre cada sustrato. En estos experimentos se prueban diferentes patrones de bandas, alternando los diferentes sustratos, para determinar el grado de adhesión o preferencia de las TEG3 sobre cada sustrato y en comparación entre ellos. En los experimentos dónde teníamos un sustrato permisivo conocido (laminina), y el sustrato de estudio (CXCL12/SDF-1 α) las células adheridas al sustrato laminina (45,19 %) eran menores que al

CXCL12/SDF-1 α (54,81 %) (N de 12) (Fig. 11A-B). Cuando comparamos el sustrato permisivo CXCL12/SDF-1 α con el inhibitorio CSPG se observa claramente que las TEG3 prefieren adherirse al CXCL12/SDF-1 α en el 80,74 % respecto al CSPG, con un 17,31 % de células adheridas (N de 14) (Fig. 11C-D).

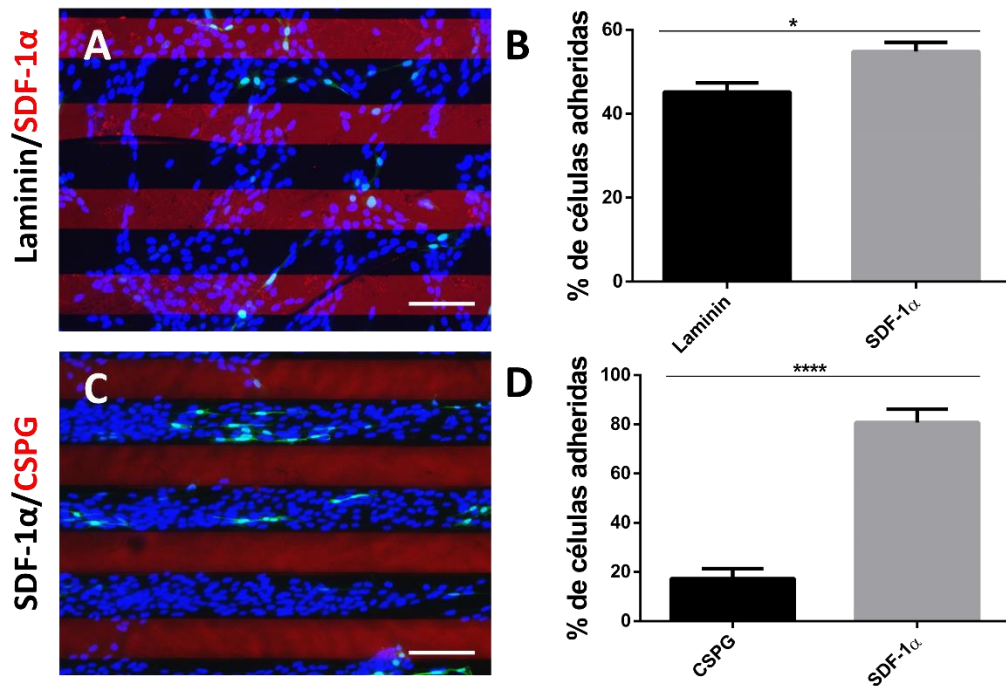


Figura 11. Adhesión de las TEG3 a los diferentes sustratos en el ensayo de bandas o *stripes assay*. El ensayo nos permite determinar la preferencia de las TEG3 y compararlos entre ellos sólo tener dos opciones dónde depositarse. Se puede usar para comparar sustratos permisivos (A-B), o para evaluar el efecto respecto a sustratos no permisivos (C-D). T-test; * 0,0114; **** < 0,0001. Barras de escala: 100 μ m (A y C). En A y C: DAPI y eGFP-TEG3 sobre sustratos. Adaptado de Castaño et al., 2021.

6) *Ensayo de migración in vitro de TEG3 sobre nanofibras funcionalizadas con CXCL12*

El hecho de generar un gradiente de CXCL12/SDF-1 α es significativo para la adhesión de las TEG3, de forma que estas van a migrar hacia las zonas con mayor concentración y vamos a tener más células en estas áreas. En esta imagen reconstruida a partir de varias imágenes, vemos como a lo largo de toda la funcionalización en gradiente, las TEG3 tienen mayor presencia de grupos celulares en la zona con mayor concentración de CXCL12/SDF-1 α .

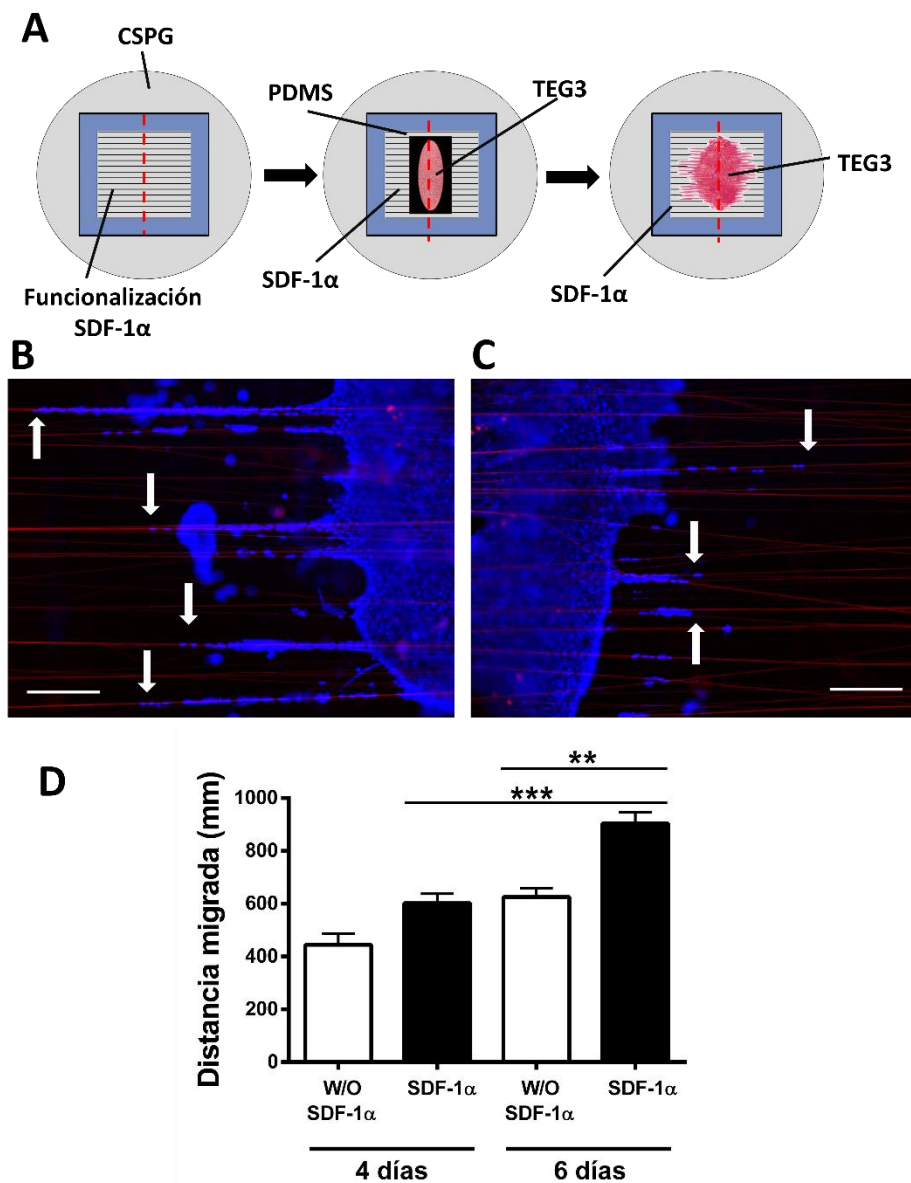


Figura 12. Ensayo de migración de las TEG3 sobre nanofibras funcionalizadas con CXCL12/SDF-1 α o sin funcionalizar. El esquema nos muestra el siguiente paso después de funcionalizar las nanofibras mediante dip-coating. En este caso vamos a tener una parte funcionalizada y otra sin funcionalizar que nos permite evaluar el efecto motogénico de la quimiocina en un mismo experimento (A). Se colocan las células dentro del PDMS y a las 12h se dejan migrar durante 6 días sobre las nanofibras funcionalizadas (B) o sin funcionalizar (C). A los 6 días se observa una diferencia significativa en la migración de las TEG3 sobre las nanofibras funcionalizadas con CXCL12/SDF-1 α (D). Test de Kruskal-Wallis; p-valor < 0.001; N de 28. Barra de escala: (B-C)- 150 μ m. Adaptado de Castaño et al., 2021.

El dip-coating es una técnica eficaz pero limitada, ya que la calidad de gradientes depende del tamaño de la ventana de parafilm y de la viscosidad de la solución, ya que tendremos el efecto de la capilaridad. No obstante, somos capaces de crear una parte funcionalizada y otra sin funcionalizar en las ventanas de nanofibras, con lo que aprovechamos el efecto motogénico que tiene esta quimiocina. Para evaluar su funcionalidad, colocamos en el límite entre las nanofibras funcionalizadas y las que no lo están un PDMS de 0.5x2 mm sobre las nanofibras dónde sembramos las células. Una vez adheridas retiramos el dispositivo y dejamos migrar las TEG3 durante 4 y 6 días *in vitro* (Fig. 12A). La migración de las TEG3 entre nanofibras funcionalizadas con CXCL12/SDF-1A o no funcionalizadas a los 4 días no es significativa (Fig. 12D). En cambio, a los 6 días ya se observan diferencias significativas entre nanofibras no funcionalizadas (625,6 mm \pm 175,5 mm; N de 28) (Fig. 12C y D) y funcionalizadas con CXCL12/SDF-1A (Fig. 12B y D) (903,4 mm \pm 230,1 mm; p-valor de 0,0026; N de 28). Estos resultados demuestran la efectividad de la funcionalización en la migración de las TEG3 sobre nanofibras alineadas en suspensión. Con estos resultados podríamos iniciar los experimentos sobre organotípicos para evaluar la supervivencia celular y la estabilidad de las nanofibras al hacer el trasplante. Y más adelante, evaluar su funcionalidad en modelos *in vivo*.

Capítulo 2.

Factores que regulan la migración de las células de Cajal-Retzius en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario del ratón

Capítulo 2. Factores que regulan la migración de las células de Cajal-Retzius en la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario del ratón

1. Introducción

1.1. El desarrollo neural

El desarrollo neural es el proceso biológico mediante el cual se producen las neuronas durante el desarrollo. Los procesos que contribuyen al desarrollo neural incluyen la proliferación, la diferenciación, la migración, el guiado axonal y la formación de las sinapsis y conexiones neurales adecuadas. Hay multitud de vías de señalización que regulan estos procesos, determinadas además por una serie de secuencias temporales que van a determinar el destino final y la identidad celular de cada célula generada durante el desarrollo hasta la edad adulta.

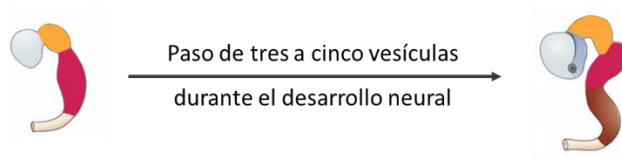
A partir de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) se forman todos los componentes del ser vivo. En el caso del sistema nervioso, las células que lo van a componer proceden del ectodermo, mientras que el sistema vascular (paralelo desde un punto de vista anatómico) se genera a partir del mesodermo. En el caso del sistema nervioso central, su desarrollo empieza con la placa neural o neuroectodermo, una lámina plana de células ectodérmicas situada en la superficie dorsal del embrión. Esta placa se pliega dando lugar a una estructura tubular denominada tubo neural en cuyo extremo cefálico se ensancha para formar los ventrículos. El sistema nervioso periférico deriva en gran parte de las células de la cresta neural y de fibras nerviosas motoras que salen de la parte inferior del cerebro a nivel de cada segmento de la futura médula espinal. Cowan, WM (1987).

1.1.1. Desarrollo del telencéfalo

El pliegue de la placa neural da lugar al tubo neural, que se ensancha en algunos puntos formando una serie de regiones vesiculares denominadas prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Del prosencéfalo derivan el telencéfalo (hemisferios cerebrales y ventrículos laterales) y el diencéfalo (tálamo, hipotálamo y tercer ventrículo); del

mesencéfalo deriva el acueducto de Silvio; y del rombencéfalo derivan el metencéfalo y el miencéfalo (cerebelo, médula oblongata y el cuarto ventrículo) y el cordón espinal (veáse la Figura 1 para más detalle).

A. VISTA LATERAL EMBRIÓN



B. DESARROLLO VESÍCULAS NEURALES EN EMBRIÓN

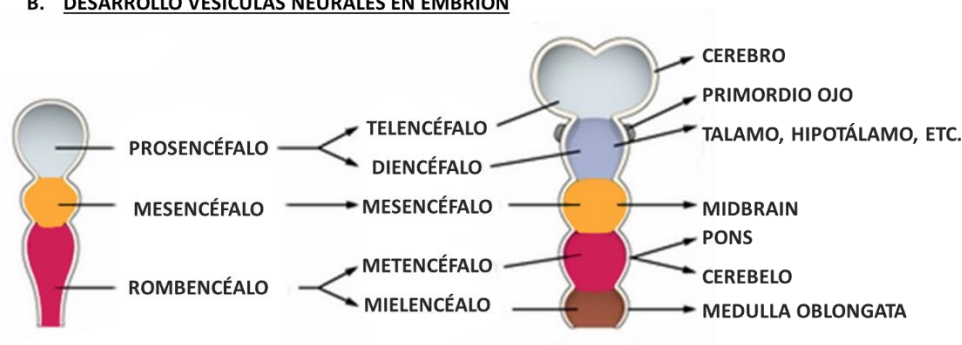


Figura 1. Desarrollo del sistema nervioso en el embrión. Diversos estrechamientos del tubo neural del embrión van a dar lugar a tres vesículas. Estas vesículas van a dar lugar a otras estructuras vesiculares, como en el embrión de cinco vesículas, que van a dar lugar a su vez a las futuras regiones diferenciadas en el adulto (A y B). Estas vesículas van a formar parte del futuro sistema nerviosos del embrión y van a ir adquiriendo la morfología final en las tres dimensiones (A). Fuente: Brain Vesicle. By Phil Schatz, License: CC BY 4.0

El telencéfalo comprende ambos hemisferios cerebrales, que se componen de multitud de estructuras complejas que se interconectan entre sí para ejercer funciones complejas en los seres vivos. Esta complejidad estructural y funcional se expresa en una gran complejidad a nivel celular y, que a su vez deriva de lo complejo que es el proceso del desarrollo del telencéfalo. Esta complejidad en el desarrollo se debe a las migraciones celulares: la migración radial establece la organización citoarquitectónica general mientras que la migración tangencial permite la dispersión generalizada de los tipos neuronales generados en ciertos puntos. La migración tangencial es fundamental para comprender la complejidad celular del telencéfalo. (Marín O, 2015).

1.1.1.1. Corteza cerebral

La corteza cerebral es responsable del raciocinio y del procesamiento de la información sensorial y motora en humanos. En ratón, se distinguen cuatro áreas primarias según el tipo de información que reciben: información sensorial (corteza somatosensorial), información relativa al sonido (corteza auditiva), información visual (corteza visual) y la responsable del control motor fino (corteza motora) (Lodato y Arlotta, 2015).

Durante el desarrollo, el prosencéfalo dará lugar al telencéfalo, que a su vez se divide en dos grandes regiones: una dorsal o pallium, que formará la corteza cerebral, y una ventral o subpallium que formará los ganglios basales. La corteza cerebral se va a dividir a su vez en dos componentes principales, la neocorteza y la allocorteza, esta última se compone a su vez de tres capas y se subdivide en hipocampo y corteza olfativa (Valverde, 2002). La neocorteza está formada por seis capas caracterizadas por diferentes densidades neuronales y tipos celulares que contienen, así como varianzas en la cantidad de matriz extracelular que la forman (Jones, 1984). Las diferentes capas de la neocorteza se forman en un patrón inside-out, donde las primeras capas son las que se forman más tardías en el desarrollo y las últimas las primeras en formarse durante el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo se van generando neuronas en la parte ventricular o más interna y migran sobre la glía radial hacia la parte más externa por diferentes oleadas hasta formar las seis capas de la neocorteza. Por tanto, las capas se numeran del I al VI, donde la capa I es la más externa y la capa VI la más interna.

Las diferentes capas de la corteza cerebral están compuestas por diferentes tipos neuronales en diferente proporción. Las neuronas se clasifican en dos tipos: neuronas glutamatérgicas y neuronas GABAérgicas. Aproximadamente el 70-80% de las neuronas son glutamatérgicas, e utilizan el glutamato como neurotransmisor excitatorio. Se originan en la pared del ventrículo lateral del pallium entre los días E11 a E17 en el embrión del ratón (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). El resto lo componen las interneuronas GABAérgicas, que utilizan el neurotransmisor inhibitorio GABA para regular la actividad de los circuitos corticales y se generan en el subpallium (Molyneaux y col., 2007; Sultan y col., 2013).

La neurogénesis empieza alrededor del estadio embrionario E10.5 en ratones a partir de células madre neurales (NSC; del inglés *neural stem cell*) en la zona ventricular. Las neuronas generadas en estadios más tardíos del desarrollo migran a la preplaca,

dividiéndola en zona marginal y subplaca. A lo largo de las diferentes olas de generación de neuronas glutamatérgicas, estas migran a través de la zona subventricular, dónde encontramos progenitores intermedios, y la subplaca, para formar la placa cortical, situándose antes de la zona marginal (Cai y col., 2002; Noctor y col., 2004). La zona marginal constituirá la futura capa I del neocórtex. Así pues, acaba constituyéndose las diferentes capas de la corteza cerebral a E17.5 en ratón: superficie pial, zona marginal, placa cortical, subplaca, zona intermedia, zona subventricular y zona ventricular (Marín-Padilla, 1978).

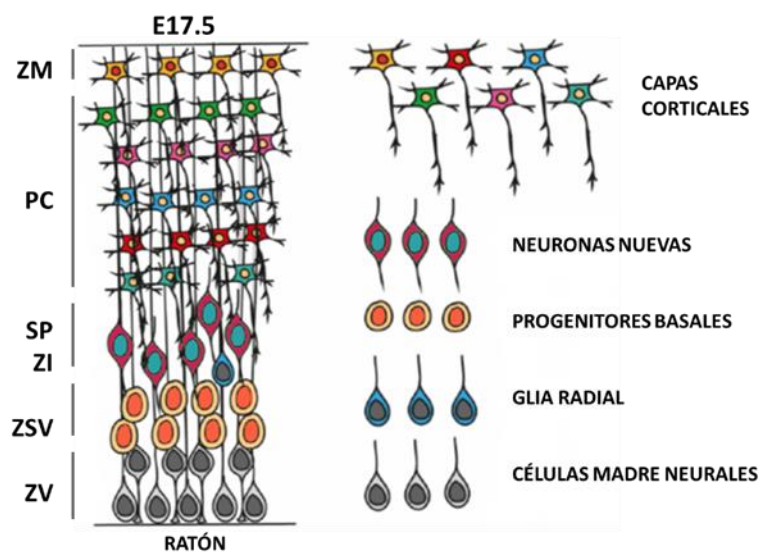


Figura 2. Esquema de la composición de capas de la neocorteza a E17.5 en el desarrollo del ratón. Una vez finaliza la principal migración neuronal el esquema de la neocorteza resta con seis capas principales y sus diferentes neuronas formando cada una de ellas. MZ: zona marginal; PC: placa cortical; SP: subplaca; ZI: zona intermedia; ZSV: Zona subventricular; ZV: zona ventricular. Adaptado de: Mukhtar y Taylor, 2018.

1.1.1.1.1. Desarrollo temporal de la corteza cerebral

A lo largo del desarrollo de neocorteza se van generando nuevas neuronas que van a ir formando las diferentes capas (ver Figura 3 para más detalle). A partir del día E10.5-E11.5 en el desarrollo del embrión de ratón, las células madre neurales (NSC) se dividen de forma simétrica para expandir el “pool” de células disponibles. Esta fase se la conoce como fase de expansión neural. Estas divisiones van a generar células madre simétricas e idénticas con el mismo potencial. A continuación, estas NSC van a empezar a

experimental divisions asymmetric that generate new NSC to maintain the "pool" and new neurons that migrate to the corresponding layers. In fact, errors in one or the other divisions will generate errors in cortical lamination and neuronal composition of the same (Tan and Shi, 2013). So, from day E10.5 the "pool" of NSC is gradually reduced while new neurons are generated, passing from a symmetric division to an asymmetric one. During this phase we can clearly see a single layer of NSC that will form the future ventricular zone.

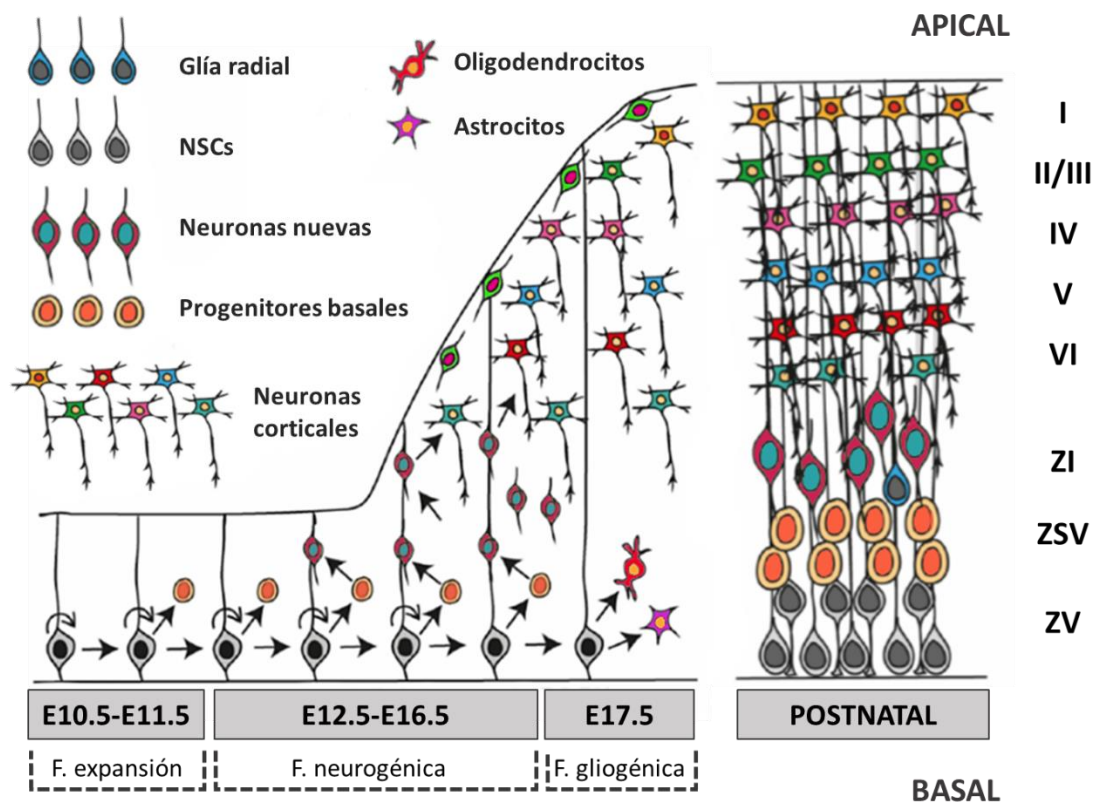


Figura 3. Esquema de la composición de capas de la neocorteza a lo largo del desarrollo del ratón. Encontramos hasta tres fases antes del nacimiento, una fase de expansión, donde predomina la división de las NSCs; una fase neurogénica, donde se empiezan a producir neuronas y se lamina la corteza pasando por sus diferentes capas; y una fase gliogénica donde se generan oligodendrocitos y astrocitos. La última etapa correspondería a la postnatal, donde se aprecian las diferentes capas, y el laminado de la placa cortical (I-VI). ZI: zona intermedia; ZSV: Zona subventricular; ZV: zona ventricular. Adaptado de: Mukhtar y Taylor, 2018.

Después de la fase de expansión neural llegamos a la fase de neurogénesis, donde las divisiones asimétricas aseguran un flujo de progenitores neurales basales que van a migrar a sus posiciones correspondientes en la zona subventricular. Esta fase se concentra entre los días E12.5 a E16.5 aproximadamente. Existe otro tipo celular diferenciado de los progenitores neurales basales y de las NSC, llamados en inglés como “short neural progenitors” o progenitores neurales cortos, y tienen el potencial de generar nuevas neuronas sin ser progenitores neurales basales (Gal et al., 2006). Así pues, se concentran en esta etapa dos fuentes neurogénicas que van a formar la primera estructura básica de la neocorteza. Para la generación de los diferentes tipos neurales que van a formar las capas se han desarrollado dos tipos de modelos: el modelo de progenitor común y el modelo del progenitor múltiple (Leone et al., 2008). En el modelo de progenitor común las neuronas que se generan provienen de un único tipo de progenitor y su destino se determina según el tiempo en el que se forman. En el modelo del progenitor múltiple las neuronas provienen de diferentes progenitores coexistentes en el “pool” y están predeterminadas por estos. (Custo Greig et al., 2013; Franco y Muller, 2013; Guo et al., 2013).

Durante el proceso de neurogénesis, las NSC juegan otro papel fundamental en la generación de las capas, ya que las neuronas excitatorias generadas en la zona ventricular migran hacia la parte apical, siguiendo los procesos radiales de las NSC. Estas neuronas inmaduras van a migrar hasta la placa cortical, donde se desprenden de los procesos gliales y maduran para establecer una nueva capa en un patrón “inside-out”, como se ha comentado anteriormente (Hu JS et al., 2017; Wamsley B et al., 2017).

Es entre medio de estos dos estadios (E10.5-E13.5), que las células de Cajal-Retzius se van a generar y van a migrar a la capa I de la neocorteza, donde van a determinar la estructura cortical mediante la secreción de proteínas como la reelina. De hecho, en modelos animales de ausencia de la proteína (ratón reeler), la estructura cortical aparece invertida, anulando el patrón “inside-out” característico del desarrollo cortical, entre otros defectos del desarrollo (Caviness y Sidman 1973; Caviness 1982). Por tanto, el correcto posicionamiento de las células de Cajal-Retzius a lo largo de la capa I es clave para la laminación cortical (D’Arcangelo et al., 1995; Frotscher, 1998), pero no imprescindible (Yoshida et al., 2006). Sobre estas células y los factores que regulan su migración ampliaremos la información y su estudio en los siguientes apartados y en el

capítulo que aquí se desarrolla. Además de las células de Cajal-Retzius, las neuronas de la subplaca también participan activamente en la laminación cortical al establecer conexiones transientes con las neuronas inmaduras que migran a la placa cortical desde la zona ventricular (Luhmann et al., 2009).

Por último, y antes de la etapa postnatal, el desarrollo de la corteza pasa por la fase gliogénica en la que se generan, a partir de las NSC, otros tipos celulares del cerebro como los astrocitos, los oligodendrocitos y las células ependimarias (Malatesta P et al., 2000; Kriegstein AR et al., 2003). Esto parece estar regulado por una bajada de la actividad del aparato de Golgi en la zona apical que estimularía la pérdida de uniones estrechas y mantenimiento de las uniones adherentes (Gotz M y Huttner WB, 2005; Franco SJ y Muller U, 2013).

Por tanto, en el estadio postnatal, las capas se forman de la siguiente forma desde la zona apical hasta la zona basal o ventricular: capa I, capa II/III, capa IV, capa V, capa VI, zona intermedia, zona subventricular y zona ventricular. En el siguiente esquema se representan sus principales características:

- **Capa I o molecular.** Residen células de Cajal-Retzius e interneuronas GABAérgicas. Lo cubre la piamadre y constituye la capa más superficial en la parte apical. Casi todas las células de Cajal-Retzius van a desaparecer progresivamente después del nacimiento, quedando constituida por interneuronas en más del 90%. Se caracteriza por expresar el factor Tbr1 (Hevner et al., 2001; Englund C et al., 2005).
- **Capa II o granular externa.** Residen neuronas granulares pequeñas y neuronas piramidales pequeñas. Las dendritas de estas neuronas terminan en la capa molecular y sus axones se dirigen a capas profundas. Expresan los marcadores Satb2 en su mayoría, y GAD67 (Zraggen E et al., 2012; Britanova O et al., 2005).
- **Capa III o piramidal externa.** Residen neuronas piramidales. Muy parecida a la capa II, sus dendritas se integran en la capa molecular, mientras que los axones proyectan a áreas profundas. Expresan el marcador Satb2 (Alcamo et al., 2008; Britanova et al., 2008; Leone et al., 2015).
- **Capa IV o granular interna.** Residen neuronas granulares. Recibe proyecciones del tálamo en forma de estrías (estrías talamocorticales) (Lopez-Bendito y Molnar, 2003; Petersen, 2007).

- **Capa V o piramidal interna.** Residen neuronas gigantes de Betz. En esta capa existe una banda de fibras conocida como banda interna de Baillarger. En la región de la corteza motora primaria las neuronas de Betz dan origen al haz corticoespinal (Schieber, 2007).
- **Capa VI o fusiforme o multiforme.** Residen neuronas fusiformes, piramidales y neuronas de martinotti. Se trata de un estrato de asociación entre hemisferio, y sus proyecciones forman parte del cuerpo calloso. Expresa el marcador Tbr1 (Hevner et al., 2001).
- **Zona intermedia.** Residen la glía radial y las nuevas neuronas que migran rostralmente hasta el bulbo olfatorio.
- **Zona subventricular.** Residen progenitores basales que van a formar nuevas neuronas incluso durante la etapa postnatal. Expresan los marcadores Tbr2 y Btg2 (Englund C et al., 2005).
- **Zona ventricular.** Residen las NSC. Se producen divisiones asimétricas cada vez en menor proporción después del nacimiento. Expresan los marcadores Sox2 y Pax6 (Englund C et al., 2005).

1.1.1.1.2. Capa I: las células de Cajal Retzius y las interneuronas GABAérgicas.

Hace más de cien años, ya fue descrita por Santiago Ramón y Cajal (Ramon y Cajal S, 1980), y con el tiempo, el conocimiento que tenemos de la capa I y su función en desarrollo y en adulto ha cambiado drásticamente (Marín Padilla M, 1998). En la primera capa de la corteza cerebral convergen y se integran una parte de la información que proviene del exterior en su formato más complejo, además de participar en la laminación cortical del neocórtex y en la creación de los circuitos tempranos durante el desarrollo. La capa I está formada solamente por neuronas GABAérgicas (la mayoría expresan reelina) y fibras axonales y dendritas de otras regiones cerebrales (Latsari M, et al., 2002; Janiesch PC, et al., 2011; Hand RA, et al., 2015; Chen J, et al., 2015; Clascá F, et al., 2016; Fenlon LR, et al., 2017; Vitalis T, et al., 2017; D'Souza RD, et al., 2017; Schuman XB, et al., 2019). Además, en esta capa convergen los axones de las células de Martinotti de la capa VI expresando somatostatina (Hand RA, et al., 2015); y algunas dendritas de interneuronas inhibitorias de la capa II/III así como interneuronas inhibitorias multipolares y bipolares que expresan el péptido vasoactivo intestinal (PVI+) (Prönneke A, et al., 2015; He M, et

al., 2016; Miyamae T, et al., 2017). De hecho, se encuentran cuatro tipos de interneuronas inhibitorias con diferencias en sus marcadores: NDNF+/NPY+ o neurogliformes; NDNF+/NPY- o células de canopy; α 7AChRs+/NDNF-; PVI+ multipolares (Schuman XB, et al., 2019; Ibrahim LA, et al., 2020). Para llegar a esta estructura tan determinada en adulto, encontramos una serie de pasos durante el desarrollo que implican la presencia de poblaciones glutamatérgicas transitorias en la capa I del embrión. Tal y como se ha detallado en apartados anteriores, en las primeras etapas de la corticogénesis, existen dos capas, la zona neurogénica denominada zona ventricular, y la preplaca. Esta capa está formada por neurona diferenciadas glutamatérgicas de la subplaca y células de Cajal-Retzius (CRcs) (Cadwell CR, et al., 2019).

1.1.2. Células de Cajal-Retzius: desde su inicio hasta la etapa adulta.

Las células de Cajal-Retzius (CRcs) tienen su origen a día embrionario E9.5-E11.5 durante el desarrollo embrionario del ratón, y van a migrar tangencialmente para ocupar toda la superficie apical de la lámina cortical en la capa más superficial o capa I (D'Arcangelo G et al., 1995; Ogawa M et al., 1995; Ishii K, et al., 2016). Van a migrar desde varios focos, entre los que encontramos el cortical hem (CH) (Takiguchi-Hayashi et al., 2004; Yoshida et al., 2006; Tissir F et al., 2009; Gu et al., 2011), el septum del palio (Bielle et al., 2005; Zimmer et al., 2010) o el pallium subpallium boundary (PSB) (Bielle F et al., 2005) (Figura 4). Además, otras regiones se han determinado, como el plexo coroideo (Imayoshi et al., 2008), la pared medial rostral del telencéfalo o RMTW (del inglés, *rostral medial telencephalic wall*) y la eminencia talámica (Eth) (Barber and Pierani, 2015). Recientemente se han encontrado una serie de marcadores moleculares que determinan hasta tres grados de maduración de las CRcs, independientes de su foco de origen, que separan a E15.5 la población de CRcs de la de la subplaca (Li J, et al., 2021). Además, según este estudio, las CRcs pueden iniciar una segunda ola de migración a partir de las CRcs establecidas y diferenciadas en la zona olfativa. Estas segundas migraciones, sumado al hecho de las oleadas progresivas de CRcs nuevas desde los otros focos, permitiría que la densidad celular fuese aumentando progresivamente entre E14.5 y E15.5, a la vez que la neocorteza se expande (de Frutos CA, et al., 2016). Sin duda, queda mucho camino por seguir investigando sobre los procesos que llevan a estas células a migrar desde su origen,

e incluso los procesos que las llevarían a iniciar una segunda migración una vez establecidas en la zona olfativa.

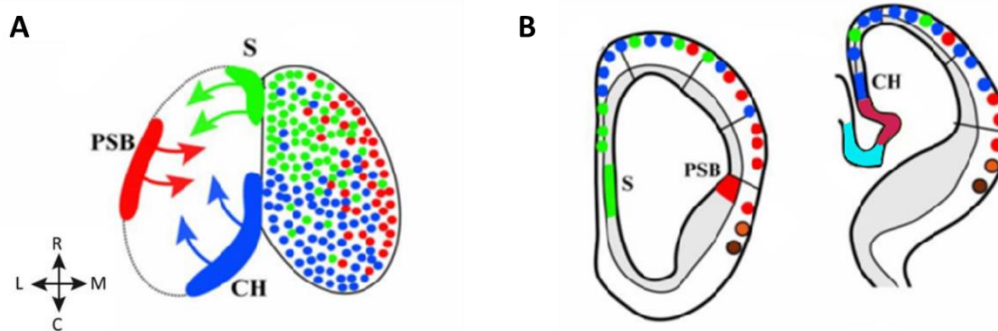


Figura 4. Migración tangencial de las células de Cajal-Retzius. A partir de tres orígenes, principalmente (CH, PSB y S), las CRcs migran desde sus respectivos puntos hasta cubrir toda la superficie cortical a E 17.5 en un patrón dependiente de origen. Adaptado de Barber y Pierani, 2015.

La presencia de las CRcs en la capa I contribuye al desarrollo temprano del cerebro desde varios puntos de vista: laminación cortical (Ogawa et al., 1995; Aguilo et al., 1999; D’Arcangelo, 2006), maduración de las neuronas capas altas de la placa cortical (Kupferman et al., 2014), en la regionalización de la corteza (Griveau et al., 2010; Barber and Pierani, 2015), la correcta invasión de interneuronas GABAérgicas en la zona marginal (Shinozoki K et al., 2002; Alcántara S et al., 2006; Zarbali K et al., 2012) y conexión neural local en corteza e hipocampo (Del Rio et al., 1997; Super et al., 1998; Borrell et al., 1999). Cuando aumentamos la densidad de CRcs se estimula el desarrollo neurítico, en cambio, al disminuir su densidad se produce una invasión parcial de las capas II/III, además de haber menos crecimiento neurítico (de Frutos CA, et al., 2016).

La importancia de la reelina

Una de las hipótesis del rol de las CRcs en la laminación cortical postula que la liberación de reelina por las CRcs en grandes cantidades en la zona marginal promovería la adecuada estratificación cortical (D’Arcangelo G et al., 1995; Ogawa M et al., 1995; Ishii K, et al., 2016). De hecho, al sobre expresar reelina ectópicamente se produce un incremento en las estructuras radiales sobre las que migran las nuevas neuronas y cambia

la morfología que estas adquieren (Nomura et al., 2008). La reelina tiene otras funciones, como la laminación axonal del ganglio de la retina en zebrafish por la reelina expresada en gradiente dorsoventral por las interneuronas GABAérgicas del tectum óptico (Di Donato V et al., 2018). Por otra parte, la reelina es expresada por interneuronas GABAérgicas en mamíferos en capa I en postnatales, dónde se cree que podría participar en plasticidad sináptica en adulto (Herz J and Chen Y, 2006). Por tanto, la reelina tiene un papel importante en el desarrollo y maduración del cerebro desde estadios tempranos a adulto.

Las células de Cajal-Retzius y las interneuronas GABAérgicas

Por otra parte, alrededor de E12.5 se produce una corriente migratoria tangencial desde el subpallium (eminencias ganglionares y área preóptica) (Bandler RC, et al., 2017; Niquille M, et al., 2018) a través de la zona subventricular y a lo largo de la zona marginal. Sobre E18.5, estas interneuronas inhibitorias abandonan la corriente migratoria e invaden la placa cortical hasta la capa diana. Estas dos corrientes migratorias tienen perfiles transcripcionales diferentes, dónde el aproximadamente el 25% migran por la zona marginal y el resto por la zona subventricular (Antypa M et al., 2011, Lim L et al., 2018). De hecho, una pérdida de la distribución de las CRcs produce afectaciones en la corriente migratoria de la zona marginal de las interneuronas inhibitorias (Shinozoki K et al., 2002; Alcántara S et al., 2006; Zarbališ K et al., 2012).

El establecimiento de la red neural en capa I durante el desarrollo

La zona marginal contiene, además, dendritas y axones que provienen de otras regiones externas. Se cree que las CRcs tienen un papel en el establecimiento de sinapsis transitorias con estas dendritas para marcar las futuras conexiones con la placa cortical una vez estas maduren (Finney EM et al., 1998; Kanold PO et al., 2003; Luhmann HJ et al., 2014). Durante el proceso migratorio, las nuevas neuronas extienden el proceso principal apical en dirección a la zona medial, una vez dentro se ramifican. Es en este punto que entra en contacto con la zona marginal que el soma deja de migrar y se detiene en esta posición concreta (O'Dell RS et al., 2015; Cocas LA et al., 2016). También se conoce que a la zona marginal llegan proyecciones subcorticales, como las fibras serotoninérgicas

dorsales y mediales de los núcleos del rafe en E16.5 (Vitalis T and Verney C, 2017). Esta conexión parece importante en el establecimiento de la capa I, ya que al eliminar el receptor serotoninérgico 5-HT_{3A}, las interneuronas GABAérgicas positivas para reelina fallan en su posicionamiento (Murthy S et al., 2014). Este receptor, también está involucrado en el desarrollo de la zona medial al inducir la liberación de reelina de las CRcs, modificando así la ramificación dendrítica de las conexiones intracorticales (Vitalis T and Verney C, 2017). Además de las fibras serotoninérgicas, proyecciones talámicas contactan con las neuronas de la capa I, que mediante señalización específica sobre las células reelina+, ayudan a desarrollar la morfología y la conectividad en la capa I (De Marco García et al., 2011; De Marco García et al., 2015). A nivel postnatal, tanto el locus coeruleus y el prosencéfalo basal proyectan axones noradrenérgicos y colinérgicos que se expanden sus dendritas en la capa I (Latsari M et al., 2002; Janiesch PC et al., 2011). Por último, y también en la etapa postnatal, llegan proyecciones GABAérgicas a la capa I desde la zona incierta para regular las sinapsis tempranas en capa V (Chen J and Kriegstein AR, 2015).

El establecimiento de la red neural en capa I durante el estadio postnatal

En la primera semana postnatal, las interneuronas inhibitorias residentes en la capa I ramifican sus axones mayoritariamente en la capa I con algunas ramificaciones en capas infragranulares y sus dendritas reciben inputs colinérgicos de las capas II/III (Obermayer J et al., 2019). Estas interneuronas hacen sinapsis con las CRcs derivadas del cortical hem durante las dos primeras semanas postnatales, entre otros inputs GABAérgicos que tienen antes de su desaparición (Kirmse K et al., 2007), participando así en la creación de los circuitos tempranos durante el desarrollo.

La apoptosis de las células de Cajal-Retzius: el giro inhibitorio de la neocorteza en postnatal

Durante la etapa postnatal el cerebro se sigue desarrollando, formando conexiones que van a madurar y establecer funciones básicas en el cerebro. Un cambio muy importante que acontece de forma fisiológica es la apoptosis de las CRcs, produciéndose un cambio

en la señalización global de la corteza, pasando de glutamatérgica o excitatoria a GABAérgica o inhibitoria.

Es durante las dos primeras semanas posnatales que las CRcs desaparecen extensamente a lo largo del neocórtex. Las neuronas provenientes del PSB desaparecen antes que el resto, entre p1 y p4 (Del Río, et al., 1995). En cambio, el resto de CRcs empiezan a desaparecer alrededor de p10 por vías diferentes, algunas conocidas, como la dependiente del factor BAX (Ledonne F et al., 2016). A partir de este estadio postnatal, y entrando en la tercera semana, quedan pocas CRcs derivadas del cortical hem en la capa I, quedando las CRcs hipocampales (Anstötz M and Maccaferri G, 2020) y las de la corteza motora anterolateral y la corteza visual en adulto (Tasic B et al., 2018).

Las CRcs mantienen estables los niveles del transportador KCC2 y de NKCC1, los cuales ayudan a mantener altos niveles de Cl⁻ intracelular, lo que ayuda al efecto despolarizante de GABA. Por ello, se ha propuesto que el efecto de la actividad GABAérgica sobre las CRcs es el causante de su desaparición temprana por un efecto citotóxico (Blanquie O et al., 2017 ; Blanquie O et al., 2017). Se han realizado diversidad de experimentos que conducen a evitar esta apoptosis o a hacerlas resistentes a la excitotoxicidad por GABA. Estos experimentos demostraron que la morfología no varía respecto a las postnatales supervivientes, que sus propiedades electrofisiológicas son similares a las neuronas inmaduras, que siguen teniendo conexiones con inputs GABAérgicos y que se desarrollan dendritas muy ramificadas en la capa II/III (Ledonne F et al., 2016; Riva M et al., 2019). También se conoce que en cultivos organotípicos, las CRcs tienen diferentes tasas de supervivencia según su subtipo (Del Rio et al., 1996).

Este efecto parece pues regular la apoptosis postnatal de las CRcs y que esta apoptosis es fundamental para el correcto desarrollo del neocórtex. Esta desaparición progresiva de las CRcs produce un efecto masivo a nivel del neocórtex, donde durante el desarrollo tiene una señalización principalmente excitatoria, y pasa a ser mayoritariamente inhibitoria por las interneuronas GABAérgicas residentes. Es este hecho, a nivel postnatal, el que va a determinar su funcionalidad correcta en el adulto, quedando aún muchos cabos del desarrollo por atar, así como los motivos que hacen que estos movimientos y migraciones, acontezcan a su debido tiempo para formar el cerebro adulto.

1.1.2.1. Regulación de la migración de las células de Cajal-Retzius

Tanto las CRcs como las interneuronas inhibitorias migran a través de la zona marginal, futura capa I, y por ello, comparten algunas señales de guiado molecular que determinan su posición final. Algunas de ellas provienen de las meninges, como en el caso de las quimiocina CXCL12, que actúa a través del receptor CXCR4 o del receptor CXCR7 (Paredes MF et al., 2006; Borrel V and Marín O, 2006; Trousse et al., 2015), atrayendo las CRcs hacia la superficie pial. En las interneuronas inhibitorias previene que se invada prematuramente la placa cortical a través de CXCR4 (López-Bendito G, et al., 2008; Li G et al., 2008), de forma que cuando disminuye el CXCL12 aumenta la ramificación del árbol dendrítico con lo que se baja la velocidad migratoria, y aumenta la posibilidad de una salida prematura de la corriente migratoria de la zona marginal hacia la placa cortical (Lysko DE et al., 2014). La migración tangencial en las CRcs es un proceso aún en estudio, puesto que los factores que las inducen a migrar y posicionarse no están del todo establecidos: factores externos, cascadas de señalización, gradientes moleculares, etc. En general, estos factores se pueden dividir como reguladores de su potencial migratorio o posicionamiento subpial, o en procesos reguladores de su migración tangencial a lo largo del neocortex (Figura 5).

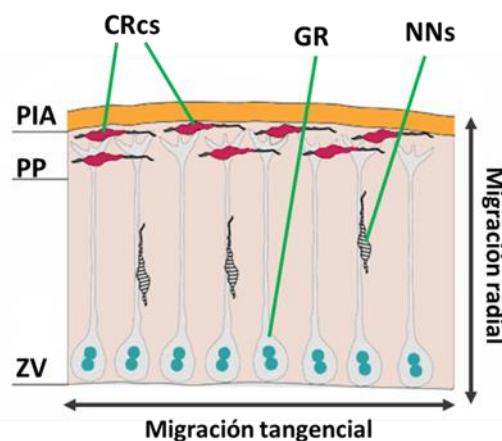


Figura 5. La migración en la corteza en desarrollo en E11.5. Encontramos dos tipos de migración en este estadio del desarrollo: migración tangencial y migración radial. La migración tangencial produce una expansión perpendicular a las fibras de la glia radial (GR) a nivel subpial, en la preplaca (PP), siendo mayoritariamente células de Cajal-Retzius (CRcs) o interneuronas las células que migran en este sentido. La migración radial permite que las nuevas neuronas (NN) migren desde la zona neurogénica en la zona ventricular (ZV) para ir formando la placa cortical en estadios posteriores (ver texto para más información).

1.1.2.1.1. Regulación del posicionamiento subpial de las CRcs en capa I

El SNC está protegido por diferentes sistemas, uno de ellos es la meninges, un conjunto de tres capas (duramadre, aracnoides y piamadre) (Crossman y Neary, 2019) por donde circula el líquido cefaloraquídeo (LCR) y protege el tejido nervioso subyacente de los impactos. La piamadre es la capa que se encuentra con estrecho contacto con el tejido nervioso, emitiendo capilares que penetran en el cerebro para irrigar el tejido (Corbett y Haines, 2018). Este contacto tan estrecho ayuda a coordinar el desarrollo de la corteza cerebral, y más específicamente la migración de las CRcs.

Entre los factores que ayudan a regular el desarrollo de la corteza cerebral encontramos: semaforina 3A y semaforina 3C (Marin et al., 2001; Niclou et al., 2003; Shearer et al., 2003; Tamamaki et al., 2003), el ácido retinoico (Smith et al., 2001; Siegenthaler et al., 2009), la quimiocina CXCL12 (del inglés, *C-X-C motif chemokine 12*) (Borrell and Marin, 2006), BMPs 5 y 7 (Segklia et al., 2012; Kusakawa et al., 2015), TGF β (Choe et al., 2014), el BDNF (del inglés, *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Fukumitsu et al., 1998; Ringstedt et al., 1998; Alcántara et al., 2006) y la neurotrofina-3 y 4 (NT3 y NT4) (Brunstrom et al., 1997; Maisonpierre et al., 1990). Estos factores inducen a que las CRcs se mantengan cerca de la pia, manteniéndose en la zona marginal y sin invadir la placa cortical. Otro elemento que favorece su posicionamiento es la glía radial. Cuando los procesos basales de la glía radial no están bien posicionados, o están retraídos, las CRcs se descarrilan e invaden la placa cortical. Por tanto, los procesos basales de la glía radial son fundamentales para el posicionamiento subpial de las CRcs (Kwon et al., 2011).

Sin embargo, el factor que mejor se conoce como regulador de la posición subpial de las CRcs es el CXCL12. Los receptores de la quimiocina, CXCR4 y CXCR7, se expresan en las poblaciones provenientes de PSB y CH (CR-PSB y CR-CH). De hecho, hay un patrón temporal de expresión del receptor CXCR4 y CXCR7, en el que se mantiene la expresión de CXCR4, pero el CXCR7 disminuye con el desarrollo de la corteza cerebral (Berger et al., 2007; Borrell y Marin, 2006; Paredes et al., 2006; Tiveron et al., 2010; Trousse et al., 2015). Este dinamismo de expresión de los receptores podría estar regulando las diferencias de respuesta de las CRcs al CXCL12. En experimentos *in vitro* e *in vivo*, se descubrió que el eje CXCL12/CXCR4/CXCR7 no es necesario para la migración tangencial, pero sí para su posicionamiento subpial al quimioatraer las células de CR a las meninges (Borrell y Marin, 2006; Paredes et al., 2006; Trousse et al., 2015).

1.1.2.1.2. Regulación de la migración tangencial de las CRcs

La migración tangencial de las CRcs (Figura) es la que determina que se expandan por toda la zona marginal, cubriéndola en su totalidad de una forma dependiente de su origen (para revisión ver Barber y Pierani, 2015). Según algunos autores, los subtipos de CRcs invaden la corteza de forma región-dependiente debido a la existencia de contactos repulsivos mediados por efrinas (Eph/ephrin) (Borrell y Marin, 2006; Villar-Cervino et al., 2013). Al cambiar de dirección una vez entran en contacto con otras células, se produciría la dispersión, evitando así la acumulación en zonas específicas de CRcs.

No obstante, se han propuesto otras moléculas que influyen negativamente en la migración tangencial de estas células. Las semaforinas tienen tanto funciones inhibitorias de la migración como atrayentes. En el caso de las CRcs la semaforina 3E (sema3E), junto con su receptor plexina D1 (PlxnD1), tiene un papel inhibitorio de su migración. La sema3E se expresa en gradiente caudo-medial a lateral entre E12.5 y E13.5 durante el desarrollo embrionario de ratón. Por otra parte, las CRcs de CH (CH-CR) expresan el receptor PlxnD1 y son capaces de responder a la inhibición mediada por la sema3E. También se ha demostrado que esta inhibición es capaz de regular las funciones del eje CXCL12/CXCR4/CXCR7 (Bribian et al., 2014).

También se ha demostrado que al alterar función de la proteína de tráfico vesicular VAMP3, expresada por las CRcs de septum (S-CR) y de cortical hem (CH-CR), aumenta su velocidad de migración din que se altere su direccionalidad (Barber et al., 2015). Por tanto, tenemos una serie de candidatos que determinan la migración de las CRcs, pero sigue sin explicarse porque estas células permanecen en ciertas posiciones según su origen migratorio.

1.2. Factores físicos y sistema nervioso: papel en el desarrollo cerebral

Las primeras incursiones en el campo de la mecanobiología se dieron en el año 1926 por Fred Vles, cuando se intentó establecer la tensión de una célula de huevo de erizo de mar (*Arbacia*; por su gran tamaño). Para establecer su tensión midió la distorsión del huevo sobre una gota de líquido, con lo que consiguió medir su tensión (Vles, 1926). En otros laboratorios, usando otra especie de erizo de mar, se vio que estos huevos no se aplanaban, con lo que utilizó una centrifuga para calcular la fuerza necesaria para

distorsionar el huevo y calcular la tensión (Harvey, 1931). Ya en el 1932, Kenneth Cole inventó un método para medir la tensión de estas células muy parecido al actual microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés, *atomic force microscopy*). Con este método consiguió detectar fuerzas de alrededor de 0.7 pN (Cole, 1932a; Cole, 1932b). De esta forma, Cole fue el primer capaz de medir la fuerza necesaria para comprimir una célula.

Mucho más adelante, en el 1950, Francis Crick y A Hughes publicaron un estudio sobre las propiedades mecánicas del citoplasma en cultivos de fibroblastos de pollo. Para ello, utilizaban partículas magnéticas microscópicas que eran fagocitadas por las células, y se les hacía un seguimiento de sus movimientos para calcular la dureza del citoplasma (Crick and Hughes, 1950). No fue hasta los trabajos de Akinlaja y Sachs que se determinó que las propiedades mecánicas de las células vienen determinadas por el citoesqueleto y no sólo por la membrana celular (Akinlaja and Sachs, 1998).

Aunque los inicios de la mecanobiología pueden parecer lejanos, es la aplicación de los conocimientos en otras áreas y su carácter multidisciplinar el que nos aporta la información que tenemos actualmente. Desde la generación de fuerzas por las células, la dureza de los tejidos y sus implicaciones en fisiología y patología, hasta todos los procesos de señalización que se encargan de organizar una respuesta a los factores mecánicos, son y serán objeto de estudio durante años debido a su gran área de aplicación y relevancia en biología.

Se ha demostrado su importancia en el desarrollo, donde orchestra las grandes migraciones y las conexiones del cerebro en algunas áreas. No obstante, quedan muchos fenómenos que escapan al estudio de los factores físicos en el desarrollo del cerebro de ratón. Se conoce que los procesos de la migración neuronal, la navegación de los axones y la morfogénesis neural se rigen por factores mecánicos (rigidez del sustrato, topografía, etc.), así como por señales químicas (Franze, 2013; Gangatharan et al., 2018; Oliveri et al., 2021; Javier-Torrent et al., 2021). Es decir, los procesos de mecanotransducción en el sistema nervioso son una realidad e influyen en la maduración y diferenciación neural (De Vincentiis et al., 2020; Javier-Torrent et al., 2021). Se ha encontrado también una vía de activación por mecanotransducción (vía Hippo/YAP) en el sistema nervioso (Nguyen-Lefebvre et al., 2021; Wu et al., 2021; Sahu et al., 2021).

Estudios recientes de AFM sobre diferentes preparaciones de cerebro embrionario de ratón han demostrado que existen diferencias entre regiones del cerebro embrionario. Para ello han medido el módulo elástico de Young mediante AFM secciones coronales del cerebro embrionario entre E12.5 a E18.5 en diferentes regiones (placa cortical, zona intermedia, zona ventricular y zona subventricular) (Iwasita et al., 2014). Lo más llamativo fue el aumento de la rigidez desde E12.5 hasta E16.5. En la placa cortical se obtuvieron valores de aproximadamente 30 Pa en E12.5 hasta 100 Pa en E16.5. Este pico culmina con un descenso generalizado en la rigidez general del parénquima cerebral. En otro estudio pionero, se determinó la rigidez de la eminencia talámica por su parte ventricular y de la zona ventricular en E12.5 mediante AFM. Los valores obtenidos para la zona ventricular fueron muy semejantes a los obtenidos por los autores anteriores. (Nagasaka et al., 2016) Lo que ningún estudio ha conseguido determinar es el análisis de la superficie cerebral de la capa I. Además, los estudios realizados implican cortes en el tejido, lo que modifica su estructura, y puede dar lugar a mediciones erróneas, pues ya se conoce que la preparación de la muestra es lo más fundamental y complicado en las medidas de AFM (Wagner, 1998).

2. Materiales y métodos

Animales

Las ratonas gestantes CD1 fueron adquiridas a Charles River en el día embrionario correspondiente. Las ratas gestantes Sprague Dawley también fueron adquiridas a Charles River en el día embrionario E14.5. Ambos son genotipos wild-type y siempre se han usado los mismos genotipos de la misma fuente en todos los experimentos de este trabajo. Los animales mTmG (ROSA^{mT/mG}; Stock No. 007576; The Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME, USA) han sido cedidos por la Dr Ofelia Martínez y mantenidos en homocigosis. Se ha comprobado su genotipo a partir del fenotipo, es decir, se ha identificado la expresión del gen tdTomato (mT) mediante observación de un fragmento de cola bajo microscopio de fluorescencia.

El acoplamiento de los animales se realiza durante una noche, considerando la mañana siguiente del acoplamiento el día embrionario E0.5. Los animales se mantuvieron en el estabulario de la facultad de farmacia de la Universidad de Barcelona bajo condiciones ambientales controladas y con comida y bebida *ad libitum*. Los animales procedentes de Charles River que no se usan el mismo día de llegada se estabulan en las mismas condiciones. En el caso de los experimentos de AFM las ratonas gestantes se envían al estabulario de la facultad de medicina de la Universidad de Barcelona. Todos los experimentos se han llevado a cabo bajo la supervisión, la dirección y los protocolos del Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Barcelona. El código del procedimiento CEEA para la obtención de tejido es OB47/19; el código CEEA para el mantenimiento de las colonias de animales en el estabulario de farmacia es C-007; y, por último, los códigos CEEA para la obtención de ratonas gestantes son 276/16 y 47/20.

Inmunocitoquímica

El procesamiento de cada tipo experimental viene determinado según su estado de cultivo *in vitro*. Aunque el procedimiento general es el mismo, cambian los tiempos de incubación y el método de montaje para su visualización. En el procedimiento general

después de fijar la muestra con PFA 4% se lava con PBS 0.1M y se bloquea la solución de bloqueo compuesta por suero (FBS) al 10% y PBS 0.1M con Tritón X-100 (varia su concentración según la muestra). Después de lavar con PBS 0.1M con Tritón X-100 se incuba con el anticuerpo primario con 7% suero y PBS-gelatina 0.2% y Tritón X-100. Por último, se vuelve a lavar con PBS 0.1M con Tritón X-100 y se revela con el secundario marcado mediante fluorocromos (Alexa 488 y 568, Life Technologies) con 7% suero (FBS) y PBS 0.1M-gelatina 0.2% y Tritón X-100, y si procede se realiza una tinción de núcleo mediante Hoescht 1 µg/ml (Sigma). Para cada muestra se remarca sus tiempos de incubación y reactivos en cada apartado. Los anticuerpos usados son calretinina (CALR; 1:1000; Swant; 7697) y anti-Tubulin β3 (TUJ1; 1:2000; BioLegend; 801202).

De explantes en Matrigel™

Las técnicas inmunocitoquímicas en hidrogeles de Matrigel™ se caracterizan por su baja penetrancia y su alta adhesividad, resultando en fondos muy marcados. Por ello se usa Tritón X-100 al 0.5% en todos los pasos y largos tiempos de incubación. Se empieza fijando el hidrogel durante 1h a 4°C con PFA 4%. La solución de bloqueo se complementa con Tritón X-100 0.5 % y se debe de mantener a temperatura ambiente un mínimo de 4h. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios durante 2 noches a 4°C en agitación suave y los anticuerpos secundarios durante 1 noche a 4°C en agitación suave. Por último, el Hoescht se incuba durante 20 minutos como máximo antes de realizar los lavados con PBS 0.1M y montar con un medio acuoso (Mowiol). Para montar los hidrogeles, se usan cubreobjetos que tienen unos puntos de relieve en los extremos que aportan un espacio para evitar que la muestra quede aplastada y se pueda romper o alterar su visualización.

De explantes en metilcelulosa

Así como los hidrogeles de Matrigel™ requerían de unos tiempos de incubación elevados, los explantes en metilcelulosa no tienen tanto requerimiento, no obstante, son más delicados y requieren atención para evitar el desplazamiento de la muestra. Se empieza fijando el hidrogel durante 10 minutos en PFA 2% y 20 minutos a 4°C con PFA 4%, es importante retirar la mitad del medio en la primera fijación, puesto que la metilcelulosa resulta muy viscosa en frío y nos puede interferir en el proceso posterior. La solución de

bloqueo se complementa con Tritón X-100 0.2 % y se debe de mantener a temperatura ambiente durante 2h. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios durante 1 noche a 4°C en agitación suave y los anticuerpos secundarios durante 1 noche a 4°C en agitación suave. Alternativamente, se pueden incubar los anticuerpos secundarios durante 6h a temperatura ambiente, aunque es recomendable seguir el protocolo original para lograr una penetrancia completa en el explante. Por este mismo motivo, si se requiere sólo visualizar las células que migran desde el explante, obviando este último, se pueden acortar los tiempos de incubación. Por último, el Hoescht se incuba durante 10 minutos como máximo antes de realizar los lavados con PBS 0.1M y montar con un medio acuoso (Mowiol). Para montar los hidrogeles, se usa el mismo cubreobjetos sobre el que están los explantes, en caso de no cultivar los explantes sobre cubreobjetos, no se puede sacar de la placa y se debe de mantener en Mowiol a 4°C o en crioprotector.

De cultivos primarios

Los cultivos primarios de células de cortical hem o de pallium subpallium boundary se han realizado sobre geles de acrilamida, para los experimentos de microscopia de fuerzas de tracción. Por tanto, se trabaja sobre placas con el fondo de vidrio que las hacen aptas para la visualización a gran aumento y no necesitan ser montados. Los cultivos sobre geles de acrilamida son sensibles a los lavados y se desenganchan con facilidad, así pues, requieren de cuidado en su manipulación. Para la fijación sólo requerimos un primer paso de 5 minutos con PFA 2% (retirando la mitad del medio), y un segundo paso de 10 minutos en PFA 4% a 4°C. La solución de bloqueo se complementa con Tritón X-100 0.05 % y se debe de mantener a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios durante 2h a temperatura ambiente en agitación suave y los anticuerpos secundarios durante 1h a temperatura ambiente en agitación suave. Por último, el Hoescht se incuba durante 10 minutos como máximo antes de realizar los lavados con PBS 0.1M. Estas preparaciones no se suelen montar, se realizan las fotografías necesarias y se desechan. No obstante, se pueden guardar con crioprotector a -20 °C en caso de necesitar conservarlas más tiempo.

De cortes de tejido (experimentos de quimera)

Los experimentos de quimera se montan sobre un transwell que puede dificultar la penetrancia de los anticuerpos en ciertas regiones. Por ello, una vez fijado, y con ayuda de un pincel suave, en flotación se despega la preparación del transwell y se realiza todo el procedimiento en flotación y agitación muy suave. Todas las manipulaciones deben de ser muy cuidadosas para no perder los explantes de mTmG (ver apartado de los experimentos de quimera). La fijación se realiza de debajo hacia arriba aprovechando las propiedades de este tipo de cultivo. Para ello se elimina el medio de debajo del transwell y se añade PFA 4%, al ser este permeable, traspasa el transwell y realiza una primera fijación de la muestra sin alterarla ya que el fijador sube por capilaridad. Pasados 10 minutos en frío, se añade en la parte superior del transwell, dónde está la muestra, más PFA 4% y se incuba durante 1h. A partir de este paso ya se puede desenganchar el tejido del soporte, y hacer el proceso en flotación. La solución de bloqueo se complementa con Tritón X-100 0.5 % y se debe de mantener a temperatura ambiente como mínimo 4h. Posteriormente se incuban los anticuerpos primarios durante 2 noches a 4°C en agitación suave y los anticuerpos secundarios durante 1 noche a 4°C en agitación suave. Por último, el Hoescht se incuba durante 20 minutos como máximo antes de realizar los lavados con PBS 0.1M y montar con un medio acuoso (Mowiol). Para montar los cortes de cerebro, se usan cubreobjetos con puntos de relieve en los extremos, como en los hidrogeles.

Cultivo explantes CH y PSB en matrigel o metilcelulosa

La obtención de explantes de CH o de PSB debe de ser lo más cuidadosa posible por ello se siguen una serie de pasos que ayudan a acotar la disección al máximo. A partir de hembras de ratón *wild-type* embarazadas (Charles River) obtenemos los cerebros de los embriones a E12.5. A parte, se prepara medio L15 (Invitrogen) con 4% de agarosa *low melting point* (Lonza) y se mantiene a 45°C en un baño seco. Una vez obtenidos los cerebros y conservando las meninges, se incluyen en agarosa a 45°C dentro de un molde apropiado y se dejan solidificar a 4°C unos minutos. Como resultamos obtenemos un bloque que engancharemos a la base del vibratomo, y cortaremos en orientación coronal con el vibratomo a 300 µm de grosor (velocidad \pm 5, vibración \pm 7,5). Los cortes se recogen en PBS 0.1M con 0.6% glucosa y se seleccionan bajo una lupa de disección en campana de flujo horizontal, y de los cortes apropiados se sacan los explantes de *cortical*

hem o de *pallium subpallium boundary* (ver esquema en Figura 6). Antes de sembrar los explantes, se dejan en incubador a 37°C y 5% CO₂ mientras se preparan las bases de colágeno o los medios con metilcelulosa 1%.

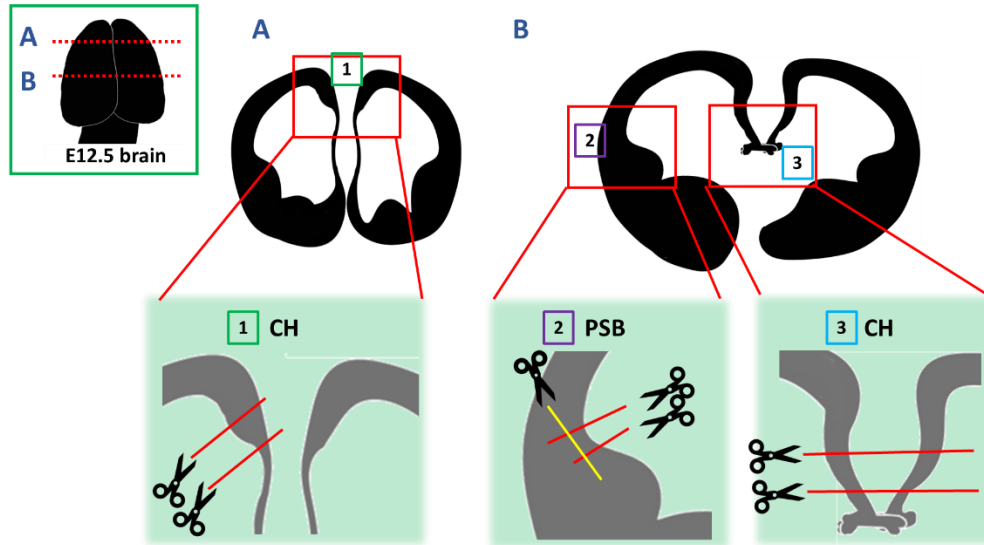


Figura 6. Esquema obtención explantes. Para la obtención de los explantes podemos usar cortes del cerebro de embrión de ratón en E12.5 a diferentes niveles (A y B). Los explantes de cortical hem (CH) se obtienen de la región medial, entre el plexo coroideo y el primordio hipocampal (1 y 3). En el caso de los explantes de pallium subpallium boundary (PSB) se obtienen de la región apical (o ventricular) en el límite entre el palio y el subpalio (2).

Cultivo de explantes de CH o PSB en hidrogel

En el caso de los explantes embebidos en Matrigel™ se debe de preparar una base de colágeno de cola de rata (Gil V and Del Río JAF, 2012¹) y dejar solidificar a 37°C antes de sembrar el explante con la correspondiente densidad de matrigel. El matrigel a diferente densidad se prepara usando neurobasal (Invitrogen) sin suplementos enfriado y en él se diluye el Matrigel™ stock (Corning Matrigel™ Basement Membrane Matrix; Cultek; 354434). Previamente se enfrían todos los componentes de esta mezcla para evitar que algunas partes solidifiquen antes de hacer el hidrogel y poder obtener así un gel de densidad homogénea. Sobre una base de colágeno homogénea de 10 µl se deposita un explante y se añade otra capa de Matrigel™. Antes de que el matrigel gelifique, y bajo la lupa de disección, se comprueba que el explantes está embebido en el hidrogel y se posiciona en el centro. Una vez sembrado el explante se debe de dejar gelificar a 37 °C

5% CO₂ totalmente antes de añadir el medio suplementado. En el caso de densidades de 3.8 mg/ml, para un volumen de 10 µl dejaremos el conjunto en el incubador 2 horas antes de suplementar. A los 2 DIV los explantes se fotografían y se fijan por 1 hora con PFA 4% en hielo antes de lavar con PBS 0,1 M y guardarlos a 4°C o procesarlos mediante inmunocitoquímica.

Cultivo de explantes de CH o PSB en metilcelulosa

Para sembrar explantes en medio con metilcelulosa se debe de hacer un coating de matrigel diluido 1:40 durante toda la noche a 37°C y sobre un cubre de vidrio. Al día siguiente, se lavan con neurobasal, y se añade el medio neurobasal suplementado con metilcelulosa 1% antes de sembrar el explante. Bajo la lupa de disección se debe de colocar el explante en el fondo de la placa, sobre el cubreobjetos, y evitando que flote eliminando las posibles burbujas que pueda haber. Una vez sembrado el explante se deja 2 DIV a 37°C y 5% CO₂ antes de fijar durante 30 minutos con PFA 4% en hielo, lavar con PBS 0,1M y guardarlos a 4°C.

Para preparar la metilcelulosa añadimos 2 gr de metilcelulosa (Sigma) cada 100 ml de medio neurobasal sin suplementar, y con ayuda de una mosca magnética estéril, se deja en agitación durante 2 días a 4°C. Transcurrido este tiempo se saca la mosca de agitación en un entorno estéril y se centrifuga a 20000 rpm a 4°C durante 2 horas. Una vez terminada, y en un entorno estéril, se recoge el sobrenadante y se conserva en frío como stock metilcelulosa 2%. La metilcelulosa es muy viscosa por lo que hacer stocks de mayor concentración no es recomendable. Es importante que se realice bien el centrifugado, y que evitemos el pellet altamente viscoso por su alta viscosidad y la presencia de metilcelulosa no disuelta. Por último, se debe de recoger con cuidado de no realizar burbujas, ya que eso afectaría a la calidad del experimento.

Análisis de calcio en células CR cultivadas con Fluo4-AM

Para desarrollar el análisis de los cambios de los niveles de Ca²⁺ en las células CR, se cultivaron explantes derivados de CH en metilcelulosa como se indicó anteriormente. Después de 48 horas, antes de la obtención de imágenes, los cultivos de explantes se

incubaron durante 30 min en un medio (OptiMEM) que contenía Fluo4-AM. El cultivo se lavó con medio fresco después de la incubación y se dejó 15 minutos en incubador 5% CO₂ y 15 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se registraron las imágenes en el microscopio IX71 (Olympus) equipado con una cámara CMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0 (Hamamatsu Photonics, Japón). Se registraron los cultivos y se capturaron imágenes (1024 x 1024 píxeles) utilizando un objetivo de 20x y una longitud de onda de 470 nm (CoolLED's pE-300white, Delta Optics, Madrid, España) cada 50 ms durante 1 min utilizando el software CellSens™ (Olympus). Las grabaciones se analizaron utilizando el programa de MATLAB™: NETCAL (www.itsnetcal.com) (Orlandi et al., 2014). Las células CR identificadas se asociaron a una única región de interés (ROI). Luego se extrajo la fluorescencia promedio $F_i(t)$ en cada ROI (célula CR) y se corrigió a partir de las desviaciones y artefactos globales. Finalmente se normalizó como $(F_i(t) - F_{(0,i)}) / F_{(0,i)} = f_i(t)$, donde $F_{0,i}$ es la fluorescencia de fondo de cada ROI. La secuencia de imágenes de $f_i(t)$ se analizó con NETCAL para determinar las entradas de calcio. Los videos obtenidos se editaron en Fiji™ y se aplicó la tabla de *lookup* "física".

Experimento de quimera

Analizar la migración de las células de CR *in vivo* es complicado, por lo que recurrimos a los experimentos *in vitro* para estudiar el efecto de diversos factores sobre su migración. No obstante, los experimentos *in vitro* pueden no mimetizar lo que ocurre en la superficie cortical, por ello se usan los experimentos de quimera. La corteza cerebral, en cultivo sobre las membranas semipermeables de los transwells, mantienen la citoarquitectura y características físicas y moleculares del cerebro embrionario, lo que hace este experimento una buena opción para descubrir que papel tienen estos factores sobre las diferentes poblaciones de células CR. Para ello se cortan en vibratomo cerebros embebidos en agarosa de bajo punto de fusión al 4% de E13.5 wild-type de embriones. Estos cortes se depositan en transwells semipermeables de Millicell inserts (PICMORG50, Millipore) con un recubrimiento de colágeno. Para recubrir los transwells se diluye colágeno de cola de rata tipo I (Gil V and Del Río JAF, 2012¹) 1:4 en etanol 70%, y se recubre el transwell con la dilución. Se deja secar toda la noche en condiciones estériles hasta la completa evaporación del etanol. Al día siguiente se lava el transwell con el medio de cultivo neurobasal y se deja hidratar durante 1 hora antes de sembrar el corte

de cerebro. Por otra parte, se incluyen cerebros de embrión E12.5 provenientes de hembras mTmG y se cortan para diseccionar explantes de CH y PSB: CH-mTmG y PSB-mTmG.

Al colocar el corte wild-type sobre el transwell se debe de eliminar primero la porción del cortical hem de este, para que no haya interferencias con las células CR wild-type. Con ayuda de dos espátulas (una plana y otra cóncava) se coloca el corte con medio de disección en el transwell con medio neurobasal, y se recoloca el tejido mientras se aspira completamente el medio con cuidado, para que el tejido quede bien colocado. Seguidamente se debe de colocar el explante con ayuda de una micropipeta, y se recoloca con cuidado de no romperlo con dos filamentos de tungsteno. Se colocan tanto en la porción medial, que se había cortado, como en el lateral, en el límite entre el palio y el subpalio, y siempre en la porción exterior o superficial del corte. Por último, a las 2 horas de cultivo a 37°C y 5% CO₂, se elimina todo el medio de la base del transwell, y se pone el volumen indicado por el proveedor (neurobasal completo con 1:50 de b27 y 5% NHS). Se deja en el incubador durante 48 DIV a 37°C y 5% CO₂, después se fija con PFA 4% como se ha explicado.

Medición de las propiedades viscoelásticas de geles de matrigel mediante reometría

Para evaluar cómo la densidad del matrigel influye en sus propiedades mecánicas, medimos mediante reometría las propiedades viscoelásticas de diferentes geles de matrigel. Para ello debemos de conseguir un hidrogel estable (no fracturado) de una densidad concreta y que sea homogéneo. Las diferentes densidades las vamos a conseguir partiendo de un matrigel (Corning Matrigel Basement Membrane Matrix; Cultek; 354434) stock de densidad conocida que diluiremos en medio frío, sin suero ni factores, hasta conseguir la densidad deseada. En este proyecto se hacen las diluciones a partir de un matrigel stock a 12.72 mg/ml (Lot N°: 9294006) o de matrigel stock a 9.8 mg/ml (Lot N°: 9148009) en medio neurobasal (Invitrogen). Con ello conseguimos tres densidades diferentes: 3.8 mg/ml, 7.8 mg/ml y 12.6 mg/ml. Para obtener los geles necesitamos mínimo 100 µl de mezcla en una placa de plástico, se depositan con cuidado formando una semiesfera y se dejan gelificar 2-4 horas a 37°C. Una vez ha gelificado, se añade medio neurobasal hasta cubrir, y se deja en incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 DIV.

A los 2 DIV se levantan con cuidado usando un pincel y una espátula y sin romperlos se depositan en la placa del reómetro previamente calentada a 37°C y calibrada. Para medir estos hidrogeles se usa un peltier de 8mm (8mm parallel plate, Peltier plate Steel - 108990) después se miden con el reómetro Discovery Hybrid Rheometer HR-2 (Discovery HR-2; 5332-0316; TA instruments). Al depositar el hidrogel sobre la placa se debe de eliminar todos los restos de medio que contenga, y comprobar que no haya grietas que interfieran en las medidas. A continuación, bajamos hasta el *loading gap* seleccionado y eliminamos los posibles restos de hidrogel antes de añadir una capa de aceite de colza, que evita la evaporación del hidrogel (*solvent-trap*) y no interfiere en las medidas. Por último, se lleva la geometría al *gap to geometry* y empieza la medición escogida. Al utilizar aceite de colza, es importante eliminar todos los restos con alcohol 96°C antes de empezar el proceso de nuevo.

Dentro del programa TRIOS (5.0.0.44608) se selecciona la prueba de *Frequency sweep* con un gap de 0.5 mm (determinado previamente). Para determinar el módulo elástico a partir de los datos, seleccionamos la frecuencia próxima a 1Hz, y mediante el *storage modulus* y el *loss modulus* calculamos el *elastic modulus* siguiendo las fórmulas:

$$G = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

Donde G' corresponde al *storage modulus* y G'' al *loss modulus*. Una vez obtenida G se puede obtener el módulo elástico mediante la siguiente fórmula:

$$E = 2G(1 + \nu)$$

Donde se asume ν como 0.5 por ser hidrogeles de baja dureza.

Microscopia de fuerza atómica (AFM).

En el principio de este proyecto no había en la bibliografía mediciones sobre el cerebro de embrión de ratón a E12.5. A lo largo de esta tesis se han probado diversos métodos explicados en los resultados, que no han sido del todo satisfactorios por problemas técnicos. En cambio, el método que se presenta es el adecuado para este tipo de muestra, sin prejuicios hacia los otros métodos con otro tipo de muestras. A los cerebros de embriones de ratón de E12.5 se les saca la piel y el cráneo para obtener el cerebro entero sin dañar la superficie cortical. Antes, se prepara agarosa al 4% (SeaPlaque™

GTG™ Agarose, 50111; Lonza) en PBS 0,1M y se deja a 45°C en baño seco o estufa hasta que baje la temperatura de la mezcla. A continuación, se prepara una placa grande con un portaobjetos para calibrar la muestra y una base de agarosa. Una vez sólida se incluye parcialmente el cerebro orientado según convenga para las medidas con el AFM. Una vez solidificado, se añade medio neurobasal completo (1% Penicilina/Estreptomina; 1% Glutamina; 0,58% NaHCO₃; 1.22% Glucosa) y se lleva a la cámara de incubación del microscopio a 37°C. Para las medidas, se calibra el AFM antes de cada muestra, usando el portaobjetos semi-incluido en agarosa junto con el cerebro.

Las medidas se llevan a cabo en un microscopio de fuerza atómica hecho a medida montado sobre un microscopio invertido (TE2000; Nikon, Tokyo, Japan) equipado con un cantilever de nitruro de silicio en forma de V (0.03 N/m *nominal spring constant*) terminado en una punta esférica de boro de radio 12 µm (Novascan Technologies, Ames, IA) del grupo del profesor Daniel Navajas del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC). Para cada medida se toman 4 puntos separados a 40 µm y se miden sus propiedades viscoelásticas o micromecánicas. De estas 4 medidas separadas se hace la media, y obtenemos un valor que representa 1 medida en 1 cerebro. Para cada medida se usa 1 cerebro en la posición indicada: dorsal/medial o ventral/lateral. El módulo elástico se calcula a partir de las curvas de fuerza-desplazamiento ajustando el modelo de Hertz y teniendo en cuenta el valor de K como 0.01, tal y como se describe en Alcaraz et al.

Cultivo primario enriquecido en células de Cajal-Retzius

Para tener una cantidad considerable de células de Cajal-Retzius hay dos aspectos clave para tener en cuenta. El primero es una buena disección, donde cortar lo más limítrofe posible asegura que la proporción de células CR sea mayor. El segundo aspecto para tener en cuenta es que el número va a variar según especies por una cuestión de tamaño, por tanto, usar embriones de rata es una opción para tener un buen cultivo primario. En este proyecto se han realizado disecciones tanto de cortical hem como de pallium subpallium boundary (PSB) como fuentes de células de CR. En el caso del cortical hem, se debe de tener en cuenta que hay que quitar el plexo coroideo, y en el caso del PSB debemos de quedarnos con la parte ventricular y eliminar el resto. El cerebro se corta a lo largo de su eje medial (A), de rostral a caudal, hasta obtener un solo hemisferio (B). Se realizan 4 incisiones en el hemisferio tomado el PC como referencia, de forma que nos permite

abrirlo en una estructura plana (C) y quedan expuestas las eminencias ganglionares medial y lateral (EGM y EGL). Desde su porción ventricular, eliminamos el plexo coroideo (PC), y nos quedamos con la porción inmediatamente posterior a este, más translúcida, que corresponde al cortical hem. Por otro lado, tomando como referencia los laterales de las eminencias ganglionares se corta la porción ventricular del límite entre el palio y el subpalio, a la altura del surco creado por la eminencia ganglionar lateral (EGL). Ver el esquema de la disección en Figura 7 para más detalle.

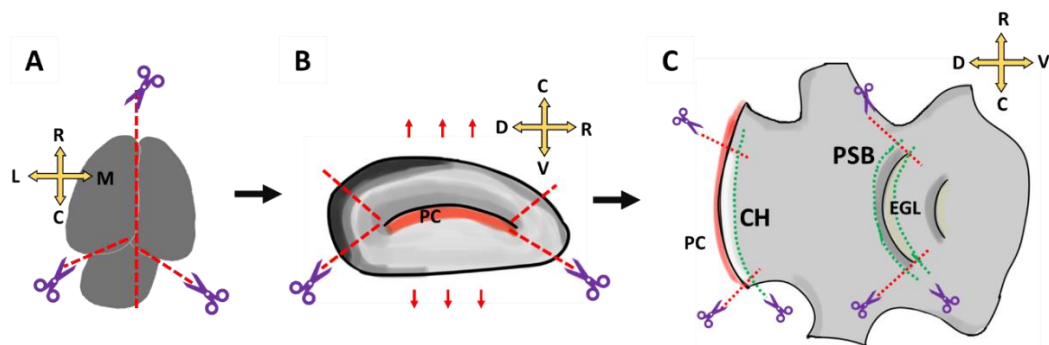


Figura 7. Esquema de la disección para cultivo primario. Del cerebro entero se separan ambos hemisferios (A). En cada uno de ellos se realizan 4 incisiones que permiten separar el tejido a lo largo de su eje anteroposterior, tomando como referencia el PC (B). Una vez el hemisferio queda abierto y plano por su parte ventricular, se procede a realizar la disección del CH y del PSB, tomando el PC y la EGM como referencia (C). PC: plexo coroideo. EGL: eminencia ganglionar lateral. R: rostral. C: caudal. L: lateral. M: medial. CH: cortical hem. PSB: pallium subpallium boundary.

Para sembrar una placa de CH debemos de poner 1,5 CH por placa; en el caso del PSB debemos de poner 1 PSB por placa o menos, debido a la baja cantidad de células que se obtienen se siembra en esta proporción, teniendo en cuenta que la densidad celular final en ambos casos corresponde a 100.000 células en una placa de 9,5 cm². También se puede realizar la disección a partir de explantes, pero la cantidad de células que se obtiene son menores y tienen baja viabilidad debido al elevado tiempo de disección. Se recogen los fragmentos necesarios de tejido en un tubo apto para centrifuga con medio de disección (PBS 0,1M y 0,66% glucosa) en hielo. El tejido se centrifuga 5 minutos a 800 rpm y se elimina el medio sobrante para evitar ninguna pérdida. En 3 ml de medio de disección se añade tripsina 10x y se deja a 37°C durante 15 minutos. Transcurrida la digestión se inactiva la tripsina con NHS en proporción 1:3, se añade DNasa 10x, y se

incuba otros 15 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se añaden 10 ml de medio de disección y se centrifuga 5 minutos a 800 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspende en medio neurobasal completo y se siembra en la placa en la proporción comentada. Para los geles de acrilamida, se hace un coating de matrigel (diluido en medio 1:40) el día anterior, y se incuba a 37°C toda una noche. Al día siguiente se debe lavar con medio neurobasal para equilibrar el pH y eliminar los restos de matrigel no adheridos antes de sembrar. Para el ensayo de TFM es importante respetar la cantidad de células sembradas, pues se necesita suficiente separación para evitar interferencia de fuerzas de tracción entre células. De la misma forma, la disección debe de ser lo más fina posible, para evitar contaminación de otros tipos celulares que puedan interferir en la visualización de las fuerzas de tracción de las células CR.

Microscopia de Fuerzas de Tracción (TFM)

Las células son capaces de realizar fuerzas para moverse sobre el sustrato al que están adheridas y se las denomina fuerzas de tracción. Para analizar las fuerzas de tracción ejercidas se precisa de un sustrato deformable de dureza conocida con un marcador que permita analizar el desplazamiento del sustrato por la célula en un momento concreto. Según bibliografía hay varias opciones para realizar este experimento, ya sea mediante geles en dos dimensiones (Oliver et al. 1995 and Dembo et al. 1995), nanopilares (Tan J et al., 2003), hidrogeles en 3D (Franck C et al., 2011), entre otros. El más usado, por su simplicidad y amplio rango de uso, son los geles de poliacrilamida. Según la proporción de acrilamida 40% (1610140; BioRad) y Bis-acrylamide Solution (2% w/v; 10193523; ThermoFisher), y su nivel de *crosslinkado* (fotoactivables, químicos, etc) se obtiene un gel que varía de dureza entre 200 Pa hasta valores supra fisiológicos (Tse JR, et al., 2010). No obstante, los geles de 200 Pa no son útiles ya que los *beads* (FluoSpheres®) no permanecen en la superficie, por lo que no se puede analizar el desplazamiento en este caso. Además, gracias al uso de *crosslinker* fotoactivables como el Irgacure (410896; Sigma) se pueden realizar geles en gradiente de dureza (Sunyer et al., 2012). Para detectar el desplazamiento del gel marcamos estos con un sustrato fluorescente como son los FluoSpheres® Carboxylate-Modified Microspheres 0.2 µm ((625/645) F8806; LifeTechnologies). Según la dureza del gel vamos a usar las siguientes mezclas (Tabla 1).

Dureza	200 Pa	480 Pa	600 Pa	1500 Pa	12 KPa
Volumen	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Bis 2%	15 µl	30	32.5 µl	35 µl	70 µl
Acrilamida 40%	75 µl	75	187.05 µl	137.5 µl	187.5 µl
H2O mq	796.5 µl	784	766.5 µl	714 µl	629 µl
DPBS 10x	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
FluoSpheres	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
APS	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
TEMED	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl

Tabla 1. Composición mezcla geles de poliacrilamida según la dureza a conseguir mediante *crosslinking* químico (APS/TEMED). Extraído de bibliografía. (Tse JR, et al., 2010)

El primer paso consiste en preparar las bases de una placa con fondo de vidrio para enganchar el gel, con una solución compuesta por el producto Bind Silane (Sigma; M6514) diluido en 7 ml de etanol 70% y 140 µl de ácido acético. Después de 10 minutos se elimina el exceso y se secan con cuidado de no dejar restos en la base. Se reservan, y se prepara la mezcla de acrilamida y bis con DPBS 10x (14200-067; Life Technologies), y usamos APS/TEMED (09913-100G; Sigma) / (T22500; Sigma) para hacer el *crosslinking*. Sobre la placa se ponen 20 µl de la mezcla y un cubreobjetos tratado con RepelSilane (17-1332-01), o un trozo de GelBond (10575785; Fisher Scientific) por su parte hidrofóbica, y se dejan polimerizar en posición invertida. Transcurridos mínimo 40 minutos, o hasta que la mezcla sobrante este gelificada, se añade el PBS 0,1M y se eliminan el cubreobjetos o el GelBond. Los geles se esterilizan mediante UV 1h y se dejan a 4°C en PBS 0,1M hasta su uso.

Otro factor delicado es hacer un buen coating para que las células se adhieran, por ello hay varios métodos, aunque en este proyecto se usa el SulfoSANPAH (803332; Sigma). Para ello, se elimina el PBS 0,1M y se añade una mezcla de sulfoSANPAH (480 µl H₂O-miliQ y 20 µl de reactivo) y se deja en UV durante 15 minutos máximo. Se realizan dos lavados con PBS 0,1M y se añade el coating deseado durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se lavan con el medio de cultivo, y se dejan estabilizar unos minutos en el mismo antes de realizar la siembra de las células.

Una vez adheridas, se seleccionan a bajo aumento (40x, microscopio invertido IX71) aquellas células aisladas y sobre el gel de poliacrilamida (ver los *beads* fluorescentes). Se realiza una primera foto en campo claro para conocer la morfología celular, una segunda con los *beads* fluorescentes para conocer el estado de la capa de *beads*, y una última foto de los *beads* después de eliminar las células sobre el gel mediante láser, enzimas (tripsina) u otros tratamientos. Para las células de CR en geles de 480 Pa se usa tripsina 1x (Life Technologies) a 37°C durante toda la noche. Un tiempo menor no desengancha las células adecuadamente y conduce a errores en las medidas. Para su procesamiento se usa el script de Matlab del grupo de Xavier Trepát, y se representan los desplazamientos sobre la imagen de campo claro de la célula.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm s.e.m. (Error estándar de la media) de al menos cuatro experimentos independientes. Las medias se compararon mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los asteriscos *, ** y *** indican $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente. Para el análisis TFM, se realizó una prueba de permutación (one-tail test) (consultar <https://thenode.biologists.com/user-friendly-p-values/research/> para obtener más detalles) y se consideró estadísticamente significativa una $P < 0,05$.

3. Resultados

Existen diferencias de rigidez entre la parte dorsal y lateral (E) en la zona marginal durante el desarrollo de la corteza cerebral

Como primer conjunto de experimentos, desarrollamos mediciones de BIO-AFM en las partes dorsal (Figura 8 C y D) y lateral de la superficie cortical de ratones embrionarios (E12.5). Se han probado varias técnicas que han resultado erróneas para las mediciones con AFM por varios motivos. Entre ellas, algunas que ya se conocían con anterioridad en otros tejidos (Wagner, 1998), y otras que hemos intentado implantar para tejidos muy frágiles. En esta etapa embrionaria, tiene lugar un crecimiento lateral del palio (Jacobson et al., 2006) y las células CR migran tangencialmente a través de la capa I y cubren toda la superficie palial (véase introducción para referencias). En nuestros experimentos nos enfocamos en las porciones dorsal y lateral de la superficie cortical (Figura 8 A y B). Nuestros resultados de BIO-AFM indican diferencias significativas en la rigidez entre la porción dorsal y lateral de la superficie neocortical (dorsal: $128,1 \pm 12,08$ Pa vs lateral: $52,46 \pm 12,08$ Pa, media \pm s.e.m., *** P = 0,0002) (Figura 8E).

Migración diferencial de células CR derivadas de CH y PSB en diferentes concentraciones de Matrigel™.

A continuación, nuestro objetivo fue explorar si estas diferencias de rigidez podrían afectar la migración de las células CR. Los estudios clásicos que analizan la migración de células CR utilizaron hidrogeles de Matrigel™ como entorno tridimensional de migración (Borrell y Marín, 2006; Bribian et al., 2014; entre otros). En un primer paso analizamos la rigidez de diferentes concentraciones de Matrigel™ mediante análisis reométrico, para evaluar como la densidad del hidrogel afecta a sus propiedades mecánicas. Seleccionamos algunas concentraciones de Matrigel™ teniendo en cuenta la proteína total contenida en los diferentes lotes obtenidos por el proveedor, y siempre cuidando que obtenemos un hidrogel homogéneo (ver ejemplos en Gil y del Río, 2019). Los datos reafirman la hipótesis que esperábamos, y el Matrigel™ en altas concentraciones muestra valores más grandes en el análisis reométrico. Por lo tanto, los valores reométricos disminuyeron del 12,6 mg/ml al 3,8 mg/ml con las diluciones de Matrigel™. La *E* medida a

1 Hz para el 12,6 mg/ml fue $268 \pm 10,11$ Pa; para el 7,8 mg/ml fue $45,39 \pm 8,93$ Pa y para el 3,8 mg/ml fue $13,34 \pm 3,02$ Pa, los datos se muestran como media \pm s.e.m (Figura 8 F). A continuación, también medimos cambios cuando las células CR están incrustadas en los hidrogeles. Los resultados no señalan diferencias cuando el hidrogel contiene o no células CR disociadas (p. Ej., Valor medido a 0,4 Hz (para evitar daño celular) para 12,6 mg/ml: con células $67,12 \pm 2,6$ Pa, sin células $59,68 \pm 2,6$ Pa, media \pm sem, no se muestra). Cuando se comparan los valores reométricos de los hidrogeles con los obtenidos previamente, los valores reométricos obtenidos con el 12,6 mg/ml de Matrigel™ son aproximadamente 2 veces más altos en comparación con los datos de BIO-AFM *in vivo*, pero los datos obtenidos con el 7,8 mg/ml son bastante similares a los observados en las regiones laterales de la superficie cortical y los valores usando 3.8 mg/ml fueron 4 veces más bajos que la porción telencefálica lateral de la zona marginal.

Como se indica en varios estudios, las células CR derivadas de CH y PSB mostraron una distribución homogénea y no superpuesta en la zona marginal en desarrollo de la capa I (por ejemplo, Barber and Pierani, 2016). Teniendo esto en cuenta, cultivamos explantes de CH y PSB en hidrogeles de Matrigel™ con diferentes concentraciones (Figura 8 H, I y J). Con hidrogeles de Matrigel™ bajos (3,8 mg/ml) y superiores (12,6 mg/ml) no pudimos observar diferencias en la distancia migrada entre las células CR derivadas de CH y PSB. Sin embargo, las células CR de CH pudieron migrar distancias más largas en diluciones de Matrigel™ a 5,8 mg/ml, 7,8 mg/ml y 9,8 mg/ml (valores para el 9,8%: CH = $113,4 \pm 1,7$ μ m vs PSB = $72,86 \pm 1,3$ μ m. Valores para el 7,8 mg/ml : CH = 131.7 ± 2.1 μ m vs PSB = 88.52 ± 1.4 μ m. Valores para 5.8 mg/ml: CH = 137.1 ± 2.2 μ m vs PSB = 92.35 ± 2.2 μ m; todos significan \pm sem) (Figura 8 G). Estos datos sugieren que las células CR derivadas del cortical hem tienen una capacidad motogénica más fuerte que las derivadas de PSB para migrar en hidrogeles que muestran valores de E más cercanos a los observados en la porción dorsal del palio, y no se pueden observar diferencias cuando se cultivan en cultivos no fisiológicos de mayor rigidez (por ejemplo, 12,6 mg/ml).

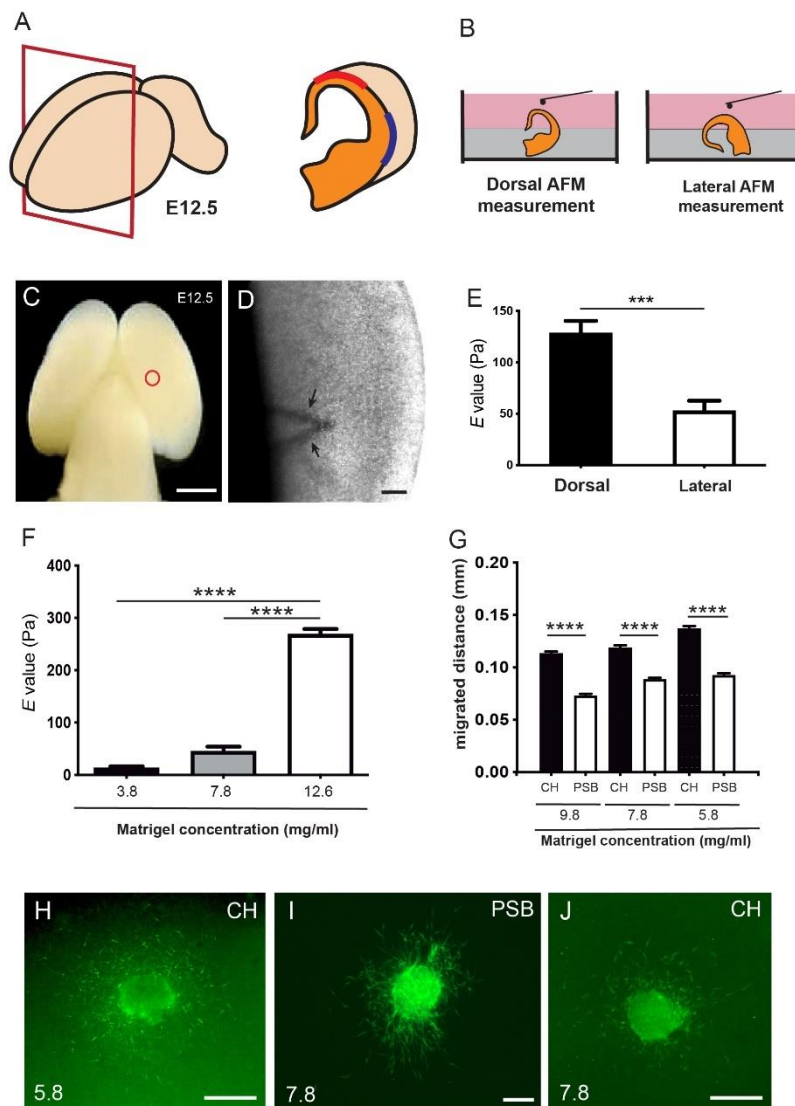


Figura 8. Mediciones de BIO-AFM en el cerebro de embrión de ratón en estadio E12.5 del desarrollo. Se miden las porciones dorsal y lateral (A), mediante una semi-inclusión en agarosa de bajo punto de fusión que preserva las características del tejido sin necesidad de hacer cortes ni modificar la arquitectura cerebral (B). Visión específica de la medición dorsal (C) y el cantiléver del BIO-AFM donde se acopla la punta (D). Significancia de los datos medidos por BIO-AFM entre las dos regiones (E). Valores de reometría de diferentes densidades de matrigel (F), y su efecto sobre la migración de las poblaciones de CR-CH y CR-PSB (G). Por último, marcaje específico de las células de CR-CH y CR-PSB con CALR en diferentes densidades de matrigel (H, I, J). Test no paramétrico Mann-Whitney en E, F y G. Barra de escala: 200 μm (C, D), 150 μm (H, I, J).

Las células CR derivadas del CH mostraron mayores fuerzas mecánicas que las células CR derivadas de PSB en geles de PAA.

En un siguiente conjunto de experimentos, nuestro objetivo fue determinar si estas diferencias migratorias pueden atribuirse a diferencias intrínsecas de diferentes tipos de células CR para generar fuerzas mecánicas cuando se cultivan en sustratos de PAA. Primero, generamos geles de PAA con muy baja E utilizando el protocolo de curado UV desarrollado en (Sunyer et al., 2012; Sunyer et al., 2016). Utilizando este protocolo, obtuvimos geles blandos de PAA con valores de E alrededor de ~ 480 Pa. Al no poder usar unos valores tan elevados, decidimos buscar un protocolo para obtener geles de PAA usando como sistema de polimerización el APS/TEMED (ver materiales y métodos). Al medir estos geles en AFM, obtuvimos unos valores de aproximadamente 40 Pa (no se muestra). Esta E es la menor rigidez que nos permite obtener una buena distribución de las nanopartículas utilizadas en el cálculo de TFM. Teniendo en cuenta que los geles a estas E son muy blandos, y hay mucho ruido de fondo debido a que algunas nanopartículas se desplazan, nuestro objetivo fue analizar el comportamiento de las células CR derivadas de CH y PSB cuando se cultivan en estos geles de PAA de baja Pa. Las células CR se unen al gel de PAA donde no migran, sino que generan fuerzas en el sustrato. En algunos casos, debido a la ausencia de un entorno de hidrogel 3D, pueden modificar su morfología de la forma unipolar típica a una bipolar, como también se observó en otros estudios en cultivos 2D (Villar-Cervino et al., 2013). Determinamos estas morfologías y seleccionamos las células CR para analizarlas por contraste de fase que, en experimentos anteriores, también se clasificaron las células como células CR utilizando el marcador CALR. Desarrollamos esto previamente al análisis TFM ya que la última parte del TFM implica el uso de tripsina que conduce al desprendimiento de las células del gel de PAA. Por lo tanto, desarrollamos las medidas TFM en estas células CR aisladas con estas morfologías y no analizamos TFM en células con morfología multipolar o agrupadas, para comparar poblaciones similares. En la Figura 9 mostramos ejemplos de células CR positivas para CALR disociadas de CH y PSB cultivadas en geles de PAA. Los resultados de TFM demostraron, como se esperaba, que las células CR, independientemente del origen, no generan grandes fuerzas para el sustrato PAA de 40 Pa en comparación con otros tipos de células. Sin embargo, el análisis informó que las células CR derivadas de CH pueden desarrollar fuerzas mayores en el sustrato en comparación con las derivadas de PSB ($P = 0.0346$, prueba de permutación de *one-tail test*) (Figura 9 D, E, G).

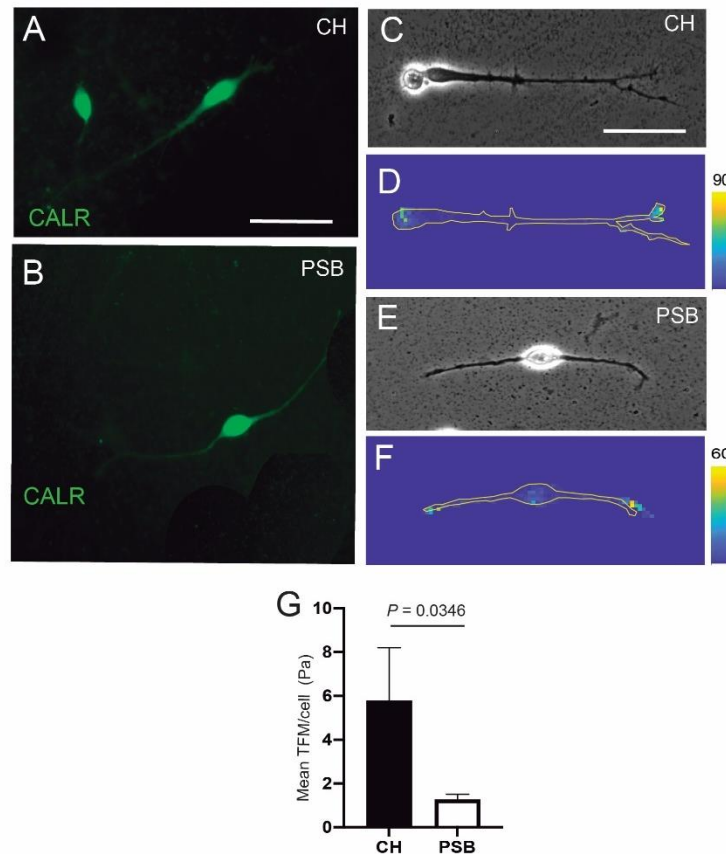


Figura 9. Cultivo primario enriquecido en células CR de CH o PSB. Se muestra el marcador específico de células CR, CALR (A y B), incluso sobre geles de PAA. Evaluación de las fuerzas realizadas por ambas poblaciones: las células de CR-CH generan fuerzas de tracción de hasta 90 Pa sobre los geles de PAA (C, D); en cambio las células de CR-PSB generan fuerzas de tracción de hasta 60 Pa sobre los mismos geles de PAA (E, F). La diferencia de fuerza entre ambas es estadísticamente significativa (G). Test estadístico: prueba de permutación de *one-tail test*. P-valor= 0,0346. Barras de escala: 50 μm (A, B, C, D, E, F).

Estos datos también sugieren diferentes propiedades mecánicas de las células CR que permitirán que estas células detecten las propiedades mecánicas del medio ambiente. Para evaluar esto, desarrollamos un experimento de pérdida de función utilizando el inhibidor de canales mecanosensoriales GsMTx4 (Gnanasambandam et al., 2017). Este compuesto es un veneno de araña que inhibe los canales mecanosensibles catiónicos (MSCs). De hecho, aunque los mecanismos concretos del fármaco no están completamente determinados, cuando se aplica GsMTx4 a varios tipos de células con

canales mecanosensibles (por ejemplo, canales piezoeléctricos), permanecen abiertos y pueden aumentar el nivel de Ca^{2+} intracelular) (Parpaite y Coste, 2017).

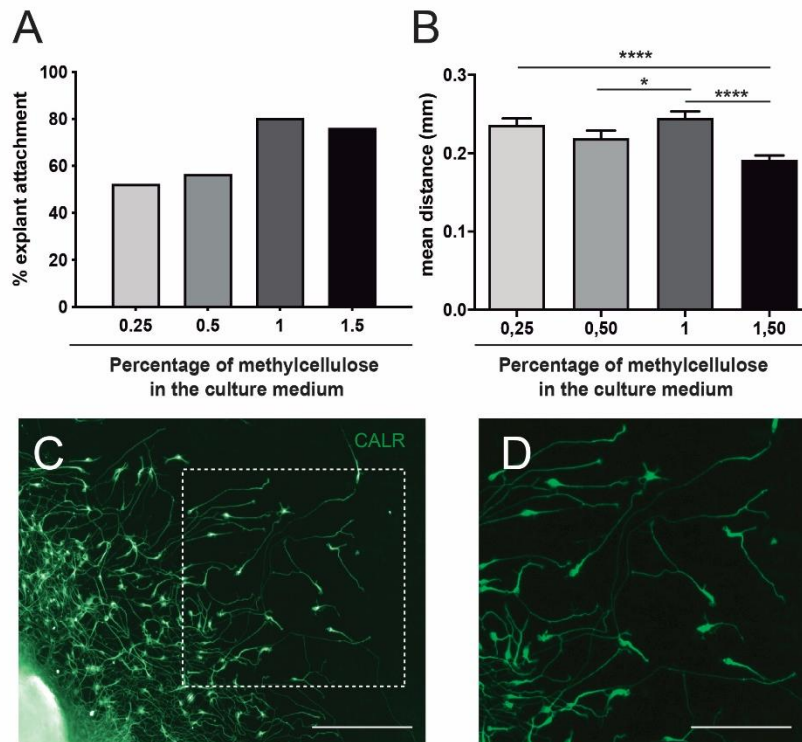


Figura 10. Cultivos de células de CR-CH en metilcelulosa a diferentes porcentajes. Los explantes de CH tienen mayor porcentaje de adhesión al sustrato en porcentaje 1% (A), además, obtiene muy buenos valores de distancia media migrada (B), lo que lo hace ideal para futuros trabajos. Con este método se conserva bastante bien la morfología de las células CR, tal y como lo demuestra el marcaje con CALR (C y D). Test no paramétrico Mann-Whitney en B. ** P-valor de 0,0064; P-valor de 0,0004. Barra de escala: 100 μm .

Teniendo esto en cuenta, cultivamos explantes derivados de cortical hem en medio con metilcelulosa (Figura 10). Después de 48 horas de migración, para obtener células CR aisladas, los cultivos se incubaron con Fluo4-AM durante 30 minutos. Después de la incubación, los cambios en los transientes de Ca^{2+} en las células CR se analizaron utilizando NetCal™ Software (Orlandi et al., 2013). Primero, debido a que los experimentos se desarrollaron por primera vez en estas células, verificamos si podíamos despolarizar las células CR mediante el uso de KCl (Figura 11 A, B, C). Después del tratamiento con KCl, se observó un aumento en los valores de $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ en todas las células

CR analizadas. A continuación, desarrollamos un experimento similar inoculando primero las células CR con GsMTx4 y luego con KCl. El resultado demuestra que el tratamiento con GsMTx4 aumenta transitoriamente los niveles de calcio intracelular en las células CR, reduciendo su migración (CH Veh = $130,8 \pm 2,5$; GsMTx4 = $124,4 \pm 3,5$, media \pm s.e.m., ** $P = 0,0015$) (Figura 11 D, E, F). Para PSB, la migración de las células CR fue menor después de la incubación con el inhibidor, pero no llega a ser estadísticamente significativa ($P = 0,063$) (Figura 11 F). Además, analizamos la inhibición del citoesqueleto y de la miosina II, con lo que vemos que estos factores también perjudican su migración (Figura 11 G). Estos experimentos mostraron, como se esperaba, que el bloqueo de la tubulina y la miosina II casi bloqueó la migración de las células CR en los geles Matrigel™. Tomando en conjunto los datos actuales, se demuestra que las células CR pueden generar fuerzas mecánicas en el sustrato, y que cuando se bloquean perjudican su migración.

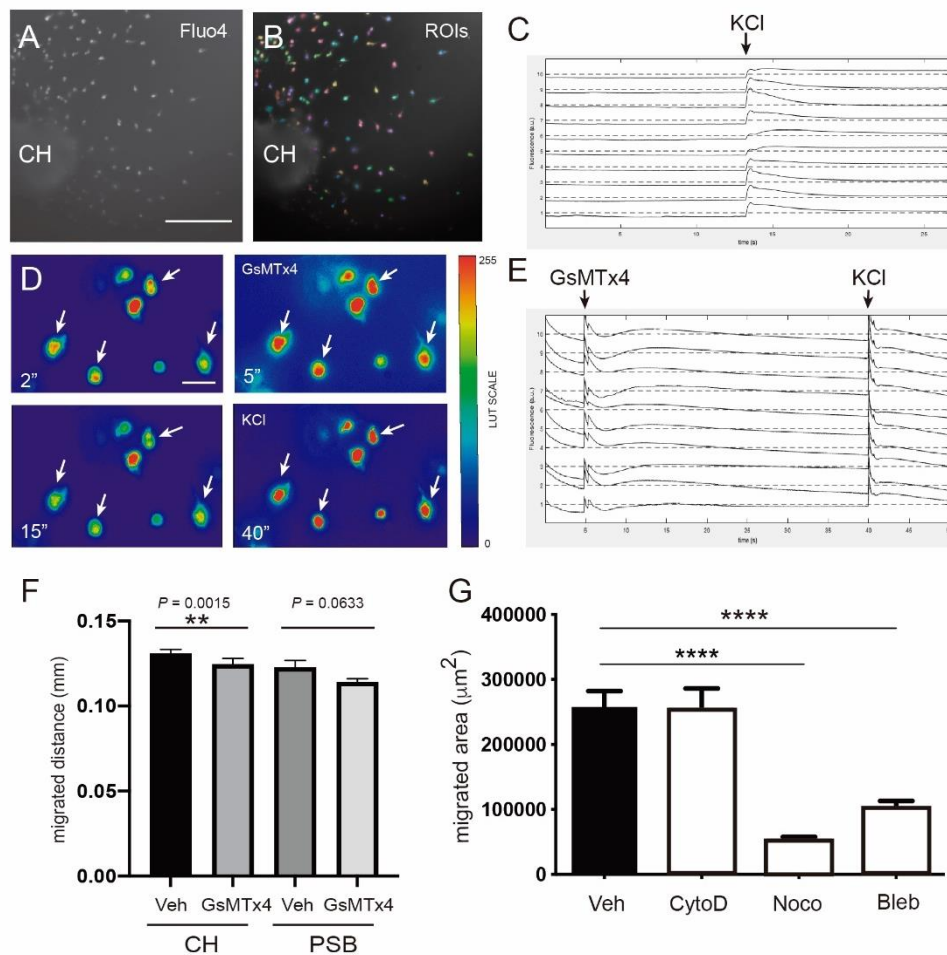


Figura 11. El explante y las células de CR-CH se marcan con Fluor4AM (A), lo que nos permite establecer las ROIs (B), y registrar los transientes de calcio intracelular en condiciones normales (C)

o en presencia del inhibidor de MSCs (D y E). Los datos de migración en presencia de este inhibidor de MSCs en ambas poblaciones (F) indican que su actividad migratoria se ve influenciada por factores físicos. Además, al inhibir ciertos componentes del citoesqueleto se desestabiliza su migración (G). CH: cortical hem. CytoD: cytochalasinaD; Noco: nocodazol; Bleb: blebistatina. Test estadístico en F t- test y en G test no paramétrico Mann-Whitney. Barra de escala: 150 μm (A, B); 50 μm (D).

El trasplante ectópico o quimérico de células CR derivadas de CH y PSB demuestra sus propiedades mecánicas intrínsecas *in vitro*.

Debido a los datos obtenidos anteriormente, nuestro objetivo era realizar con éxito experimentos de trasplante ectópico o quimérico *in vitro* de cortes telencefálicos (consultar materiales y métodos para más detalles). Por lo que, se cultivaron cortes coronales embrionarios del embrión (E12.5) de ratones de tipo salvaje (*wild-type*) en transwells, básicamente como se publicó (del Río et al., 1996), y se eliminaron los CH o PSB endógenos *wild-type* (Figura 1 A, B y C) y se trasplantaron los CH o PSB de ratones mTmG (Figura 12 D). Las células CR migradas generadas después del trasplante de explantes pueden identificarse fácilmente por su fluorescencia de rojo emitida por las células migradas del explante de ratones mTmG (Figura 12 H), pero también mediante el uso de doble marcaje con anticuerpos CALR (Figura 12 G, I). El resultado demuestra que las células CR derivadas de CH trasplantadas en su posición original son capaces de migrar distancias tangencialmente grandes en la zona marginal dorsal y medial de los cortes (CH-mTmG en la ubicación de CH = $565,7 \pm 101,3 \mu\text{m}$) (Figura 13 A y B). Sin embargo, las células CR derivadas de PSB no pudieron migrar distancias más grandes en las porciones dorsales del palio (PSB-mTmG en la ubicación de CH = $200,7 \pm 72,7 \mu\text{m}$; todas medias \pm s.e.m.) (Figura 12 J).

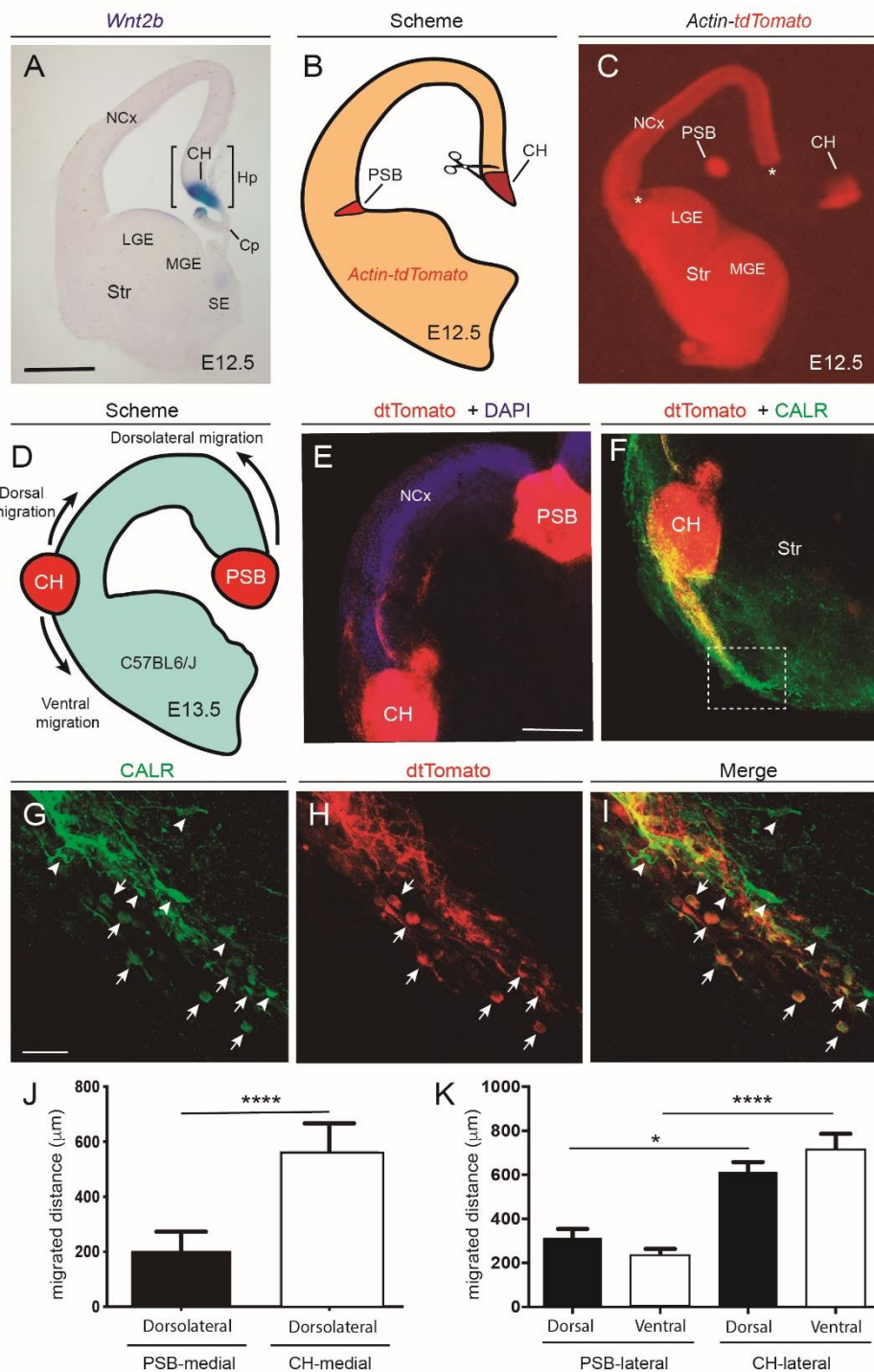


Figura 12. Los explantes de CH se pueden obtener de diversas fuentes, como el CH (A), pero también del PSB. Para ellos cortamos la región medial para el CH y la región ventricular en el borde del palio y del subpalio para el PSB (B) de un corte coronario de embrión de ratón E12.5 mTmG (C). Estos explantes se trasplantan en diferentes posiciones (E y F) en cortes coronarios de embrión de ratón E12.5 *wild-type* (D) en transwell y se dejan migrar 48h antes de analizar los resultados. Las

células migradas del explante son positivas para CALR (G), para mTmG (H), y ambos marcajes colocan (I). Los datos cuando se trasplantan los explantes mTmG en posición normal (J) muestran que las CR-CH-mTmG migran más que las CR-PSB-mTmG. En cambio, al invertir la posición, las CR-CH-mTmG alcanzan mayores distancias en la región ventral que en la dorsal (K). Ncx: neocórtex, CH: cortical hem; PSB: pallium subpallium boundary; Cp: plexo coroideo; Hp: hipocampo; Str: estriado; LGE: eminencia ganglionar lateral; MGE: eminencia ganglionar medial; SE: región septal. Estadística: t-test. Barra de escala: 500 μm (A y C); 150 μm (E y F); 50 μm (G, H, I).

Por el contrario, cuando los explantes de CH-mTmG se trasplantan en la ubicación de PSB, una gran cantidad de células CR doblemente marcadas con fluorescencia roja y CALR pueden migrar dorsalmente y hacia las porciones ventrales del telencéfalo (CH-mTmG en la ubicación de PSB, migración latero-dorsal = $603.1 \pm 55.0 \mu\text{m}$, migración latero-ventral = $706.7 \pm 79.5 \mu\text{m}$; medias \pm sem) (Figura 5 E y F). En paralelo, cuando PSB-mTmG fue trasplantado en el lugar de PSB mostró un aumento de la migración (PSB-mTmG en el lugar de PSB, migración dorsal = $310,5 \pm 44,25 \mu\text{m}$; migración ventral = $232,9 \pm 30,94 \mu\text{m}$, todas medias \pm s.e.m.) (Figura 5 K).

A partir de estos experimentos, podemos deducir que la migración dorsal de CR-PSB es $\sim 1,55$ veces mayor cuando se trasplanta en la región de PSB que en la de CH. Por el contrario, las CR-CH mostraron $\sim 1,25$ veces más migración cuando se trasplantaron en el PSB que el CH. Estos datos se correlacionaron con resultados previos que indicaban que las células CR generadas en el CH son capaces de generar fuerzas mecánicas superiores al sustrato y migran en hidrogeles con un rango de 5,8 mg/ml a 9,8 mg/ml que las células CR derivadas de PSB. Por lo tanto, cuando se trasplantan en la región de PSB, pueden migrar tanto por la menor rigidez de la región en comparación con las regiones dorsales como por sus propiedades mecánicas intrínsecas. Por el contrario, las células CR derivadas de PSB son capaces de migrar menos hacia o en las regiones pálidas dorsales con mayor rigidez. Tomando en conjunto los datos actuales, se sugiere que tanto la diferente rigidez (dorsal vs lateral) de la zona marginal en la capa I en desarrollo, y las diferencias intrínsecas en las propiedades motogénicas *in vivo* de las células CR dependiendo de su origen, participan en su distribución en la zona marginal en el desarrollo.

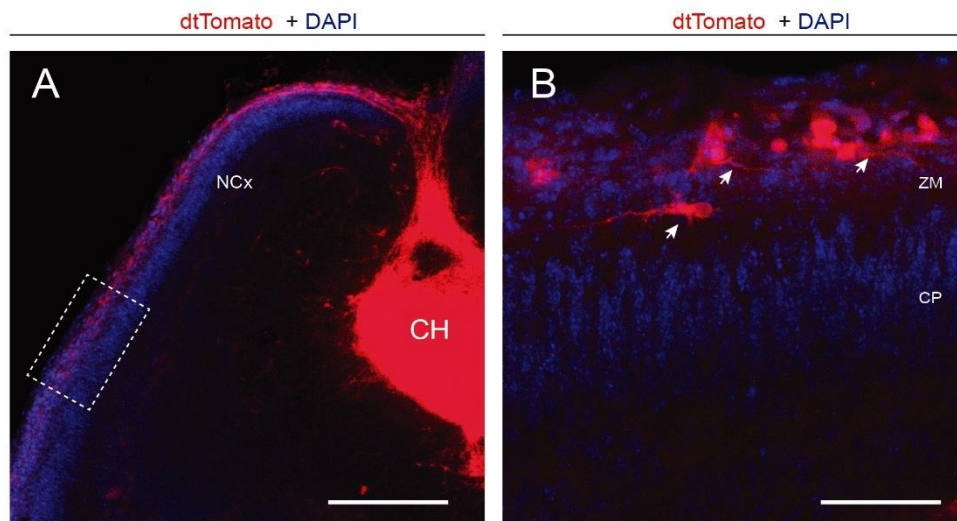


Figura 13. Las células CR derivadas de cortical hem migran de dorsal a ventral, llegando a recorrer grandes distancias (A) en experimento de quimera. Cuando analizamos en profundidad la distancia de las células CR-mTmG que migran sobre el corte telencefálico coronal de embrión E12.5 *wild-type* observamos claramente una célula CR-mTmG (flechas) en la zona medial del corte (B). CH: cortical hem; NCx: neocórtex; ZM: zona medial; CP: placa cortical. Barra de escala: 500 μ m.

Discusión general de la tesis

Discusión general de la tesis

La migración celular ha sido ampliamente estudiada por su importancia en fisiología y patología en todas las etapas de los seres vivos. En esta tesis exploramos la migración celular en 1D, en 2D y en 3D, y su variabilidad según factores físicos y moleculares.

La migración de las células de la glía envolvente olfatoria, al igual que las de las células de Cajal-Retzius, es característica según el sustrato y los factores que las afectan. Para las células de la glía envolvente olfatoria hemos demostrado que prefieren los sustratos permisivos como la laminina, aunque tienen preferencia por algunas quimiocinas. En este sentido, las células de Cajal-Retzius también presentan respuesta a ciertos factores moleculares, modulando su actividad y permitiendo que se dispersen a lo largo de la capa I del neocórtex.

A nivel migratorio, los factores que inducen a unas y otras son parecidos, aunque a nivel físico parece haber evidencias claras. Mientras que las células de la glía envolvente olfatoria prefieren sustratos poco rígidos (como las nanofibras, con 2.2 ± 1.0 GPa), las células de Cajal-Retzius precisan de sustratos muy blandos para su migración (alrededor de 40 Pa), lo cual está relacionado con la poca fuerza que realizan. Además, se conoce que las células de la glía envolvente olfatoria hacen más fuerza (Nocentini et al., 2012), lo que nos puede ayudar a entender porque tienen la capacidad de estar en sustratos más rígidos que las células de Cajal-Retzius.

No es de extrañar que presenten estas características diferenciales, ya que el entorno fisiológico es muy diferente en ambos casos. En el caso de las células de Cajal-Retzius, hemos obtenido valores de módulos de Young en capa I del cerebro del embrión de ratón de estadio E12.5 del orden de centenas. En cambio, las células de la glía envolvente olfativa deben migrar a través de la lámina propia y la placa cribiforme, hasta llegar al bulbo olfatorio en adulto, lo que nos hace suponer un entorno de migración más rígido, o si bien no, con más variedad de rigidez.

El hecho de los cambios morfológicos de las células de la glía envolvente olfativa implica que responden activamente no solo a sustrato químico, sino a topografía y rigidez. En el caso de las células de Cajal-Retzius, la densidad del hidrogel no parece modificar su morfología, tampoco lo hacen las diferentes señales químicas, no obstante, es imposible cultivar estas células sobre sustratos muy rígidos (No se muestra en los datos). Este dato

podría reafirmar el hecho de que los factores físicos en las células de Cajal-Retzius son importantes en su migración.

Discusión del capítulo 1

Discusión del capítulo 1.

Las propiedades regenerativas de las OEC se relacionan con sus capacidades migratorias (Wang y Huang, 2012; Roloff et al., 2013), por lo que aumentar su dinámica migratoria y su supervivencia son claves para el éxito en terapia regenerativa. Varios estudios han relatado el fracaso en migración y supervivencia de las OECs después de su trasplante en lesión medular (Smale et al., 1996; Gudiño-Cabrera y Nieto-Sampedro, 2000; Collazos-Castro et al., 2005; Deng et al., 2006). Con una gran comorbilidad, los daños en el tejido nervioso representan uno de los mayores obstáculos en la medicina, viendo frustrados los intentos por mejorar su funcionalidad en pacientes con daños graves. Por lo tanto, mejorar sus propiedades migratorias y su supervivencia puede ayudarnos a recuperar funciones perdidas como consecuencia del daño en estos pacientes, y mejorar su calidad de vida.

En este capítulo de tesis se propone el uso de nanofibras electrohiladas de PLA alineadas que tienen una baja cristalinidad, lo que resulta en una mejora en su flexibilidad y biodegradabilidad. Nuestras nanofibras se componen de una mezcla de PLA 80/20, que les confiere una flexibilidad adicional al ser un material más amorfo que las nanofibras convencionales (Sachot et al., 2014). Las imágenes de FESEM muestran como las células TEG3 tienen una gran afinidad por la topografía de la nanofibra sin necesidad de funcionalización, adquiriendo una morfología fusiforme en presencia de las nanofibras. De hecho, hemos observado que las nanofibras sobre un sustrato permisivo induce a las células de la glía envolvente olfativa a migrar hacia estas, prefiriendo el sustrato de la nanofibra al permisivo. Esto se debe tanto a la topología de la nanofibra como a sus características mecánicas, que simulan un entorno fisiológico.

Con estos resultados, se ha estudiado el efecto del diámetro de las nanofibras en la adhesión y alineamiento de las TEG3, así como su funcionalización covalente con la quimiocina CXCL12/SDF-1 α y su efecto sobre el potencial migratorio de las células TEG3. Se ha observado que tanto la topografía como la señalización por la quimiocina mejoran la migración de las células TEG3 *in vitro*. Las células de la glía envolvente olfatoria tienen preferencia por sustratos permisivos, y preferentemente sobre el CXCL12/SDF-1 α . Además, según el diámetro de las nanofibras, las células de la glía envolvente olfativa van a presentar mayor adhesión, siendo las nanofibras de aproximadamente 950 nm las

ideales. De hecho, en este diámetro, presentan un grado de alineamiento mayor que en diámetros más reducidos.

En esta tesis, sugerimos una nueva estrategia para la implantación de esas células en SCI junto con un biomaterial topográficamente atractivo y con una diferencia de concentración quimiotáctica para direccionar y mejorar la supervivencia de las OECs. Se han propuesto muchos tipos de *scaffolds* de biomateriales en la literatura, no obstante, aunque hasta la fecha nadie ha intentado mejorar la migración glial a través de una señal quimiotáctica integrada para esquivar la señal inhibitoria de la cicatriz meningo-glial. Teniendo en cuenta que las células TEG3 expresan el receptor CXCR4, su ligando SDF-1 α /CXCL12 es una excelente opción para mejorar no solo la migración, sino también la adhesión celular y su supervivencia.

En estudios anteriores, se demuestra que la glía puede ser sensible al lactato proveniente de la degradación de las nanofibras de PLA 70/30 y metabolizarse como fuente de energía en un ambiente pobre en glucosa (Álvarez et al., 2014). Sin embargo, esta mezcla de PLA no era óptima ya que necesitábamos una fuente de PLA menos degradable y más rígida que pudiera soportar un tratamiento agresivo como el proceso de funcionalización mediante EDC/NHS (Sachot et al., 2015). Por ello se cambió la mezcla a PLA 80/20, que cumple con los requisitos y funciona como plataforma de guiado para la migración. Además de su diámetro óptimo, la disposición de las nanofibras alineadas entre sí, permite que todas las células migrando tengan una misma dirección. Y gracias a la diferencia de gradiente, adquieren un sentido migratorio, dirigiéndose todas ellas hacia la quimiocina por quimiotaxis. En las primeras etapas de la investigación la deposición de las fibras y su funcionalización se realizaba sobre cubreobjetos. Sin embargo, eso no es práctico para realizar el trasplante al tejido dañado. La idea de usar marcos de parafina es una opción atractiva para una fácil integración 3D de fibras similares a la MEC. Además, este proceso permite generar varias capas de nanofibras, apilarlas entre ellas, e integrarlas en cualquier tejido al ser un proceso eficiente y reproducible.

Por otra parte, el sistema debe de ser capaz de superar la cicatriz meningo-glial que se forma en el daño axonal. La fase clave para la regeneración del axón es el recrecimiento en la porción proximal dañada, que debe de atravesar esta cicatriz fuertemente inhibitoria. Ya que los propios axones tienen la capacidad de regenerarse, aunque el fuerte componente inhibitorio elimina todas posibilidades de éxito (Silver y Miller, 2004). Los

factores que controlan la formación de la punta de crecimiento y la recuperación del crecimiento axonal incluyen la capacidad regenerativa inherente de las células neuronales, así como el microambiente bioquímico inhibitorio multifacético desarrollado previamente que previene el crecimiento del axón dañado. De hecho, forman paredes físicas y moleculares para la recuperación anatómica y funcional. CSPG es un buen ejemplo de molécula inhibidora.

La plataforma que proponemos nos permite analizar y caracterizar las propiedades migratorias de las células TEG3 mediante microscopía en tiempo real, además ofrece soporte quimioatractivo y trófico para las células. El enfoque presentado aquí debe probarse en un entorno inhibitorio real, sin eliminar las posibilidades de mejora del sistema. Por ejemplo, implantando gradientes de concentración de SDF-1 α /CXCL12 en las nanofibras y usando células modificadas para expresar antagonistas de los MAIs (TEG3-ectoNgR1). El último paso sería el cocultivo de este sistema con neuronas para evaluar el sistema *in vitro* antes de pasar a situaciones con una cicatriz meningo-glial formada. Así mismo, necesitaríamos evaluar el efecto específico de la quimiocina sobre las TEG3, inhibiendo el receptor CXCR4. Por último, se debería de explicar los factores a nivel molecular que aumentan la dinámica migratoria y de supervivencia celular.

Discusión del capítulo 2

Discusión del capítulo 2.

Varios estudios han demostrado los diferentes orígenes migratorios de las células de Cajal-Retzius (ver introducción para más detalle). Las células CR que derivan del cortical hem migran en la zona marginal expandiéndose a la parte dorsal y medial del neocórtex, las regiones más rostrales son principalmente pobladas por las células CR generadas por el tabique palial o septum. Por el contrario, las células CR derivadas de PSB detienen su migración en las regiones laterales de la zona marginal del palio. Varios son los estudios centrados en analizar el comportamiento migratorio de las células de CR, pero todos se han centrado en la existencia de factores químicos que median su migración y posicionamiento subpial en la zona marginal.

Empezando por la molécula principal en la laminación cortical, la reelina, que es secretada por las CRcs. Otras moléculas se postulan como claves durante el desarrollo, esta vez como reguladoras de la migración tangencial de las CRcs. Demostrado está el efecto repulsivo de la semaforina 3E a través de su receptor Plexina D1 en la migración de las CRcs. En contraposición, el efecto atractivo del CXCL12 sobre la posición subpial en capa I de las CRcs también ha sido ampliamente estudiado. Ambos factores son claves en los procesos de guiado celular, así como en el desarrollo de estructuras circundantes, como las meninges. De hecho, en estudios realizados en el laboratorio, hemos descubierto que hay una relación atractiva clara entre los vasos y las CRcs, aportando más datos sobre los efectos de los factores vasculares sobre la migración de las CRcs. Para ello se ha enfrentado un explante de vaso sanguíneo con explantes de cortical hem, y lo que se ha visto es que las células de CR que migran desde el explante tienen tendencia a migrar hacia el vaso sanguíneo (región proximal). Al sembrar los explantes de CH y PSB, y tratarlos con varios factores vasculares, obtuvimos valores de migración muy superiores con el tratamiento con estos factores. De hecho, en el caso de la CH-CR, la semaforina3E tiene un efecto inhibitorio sobre su migración (como ya se conocía), pero el CXCL12/SDF-1 α , las angiopoyetinas y el VEGF tienen un efecto motogénico *in vitro*. En el caso de la PSB-CR todos los factores vasculares estudiados tienen un efecto motogénico *in vitro*, respecto al control. Cabe destacar el efecto de la semaforina3E, ya que en cada población tiene un efecto diferente. Este hecho se debería de seguir estudiando en futuros proyectos debido a su posible implicación en la salida de las PSB-CR de la zona ventricular hacia la superficie cortical y de su atracción hacia las zonas mediales.

Respecto a las propiedades intrínsecas de las células de CR, se ha encontrado que las células de CR-CH tiene mayor velocidad de migración que las células CR-PSB *in vitro*. Esta diferencia (~20-25%) está asociada a diferencias en la expresión de VAMP3, que participa en la endocitosis, proceso clave durante la migración celular. De hecho, la expresión de VAMP3 es mayor en las células CR derivadas de CH con respecto a las derivadas de PSB (Barber et al., 2015). Teniendo en cuenta estudios previos sobre inhibición de contacto mediada por efrinas (Villar-Cervino et al., 2013), se hipotetizó que son las encargadas de la regionalización de las células CR según su origen, aunque contradice los datos obtenidos en hidrogeles (Bribian et al., 2014). No obstante, en el estudio de Barber et al., se postula que hay otros factores que intervienen en esta regionalización específicas. Nuestros resultados actuales están en línea con este último estudio, ya que hipotetizamos que los factores mecánicos podrían participar en la distribución de las células CR en el eje dorsolateral en la zona marginal en desarrollo.

Los factores mecánicos juegan papeles relevantes en el guiado de axones, la migración neuronal, el crecimiento de neuritas y el desarrollo del cerebro (Franze et al., 2013; Gangatharan et al., 2018; Oliveri et al., 2021). Más concretamente, el desarrollo de la zona palial se ha estudiado mediante mediciones de AFM (Nagasaka et al., 2021), entre la zona ventricular palial y la eminencia ganglionar. En el estudio se obtuvieron valores de E mayores en la zona ventricular del palio que en la eminencia ganglionar (o subpalio ventricular), estableciendo así una relación con el plegamiento del palio. Nuestros resultados refuerzan, pero también amplían esta visión, demostrando una diferencia significativa entre los valores de E entre la parte dorsal de la zona marginal del palio en comparación con las regiones laterales.

Durante las primeras semanas del desarrollo cortical embrionario el palio se expande mediante la adición de nuevas neuronas para generar la placa cortical en un gradiente latero-medial y lateral (Bayer y Altman, 1991). Según un estudio reciente, la corriente migratoria dorsolateral de células de preplaca generadas dorsalmente (E10.5) participan en la expansión lateral (Saito et al., 2019), probablemente actuando sobre la orientación de las células de la glía radial y generando tensión axónica en el subpalio a E14,5 (Misson et al., 1988). Según estos resultados, la parte lateral del palio permitiría la migración tangencial de estas células de la preplaca (Saito et al., 2019).

Nuestros resultados apuntan a que las células CR derivadas del CH pueden migrar a una gran distancia en la zona marginal tanto en la parte lateral como en la dorsal del palio. Curiosamente, pueden migrar más en regiones laterales que dorsales en nuestro experimentos de trasplante quimera. Por el contrario, las células CR derivadas del PSB mostraron una migración reducida cuando se trasplantaron en las regiones dorsales del neocórtex. Esta observación probablemente esté relacionada con sus propiedades migratorias y con la diferente rigidez de las partes dorsal y lateral de la zona marginal, así como los experimentos *in vitro* con Matrigel™. Teniendo en cuenta nuestras observaciones y los resultados anteriores, podemos sugerir que la migración de las células CR sigue los cambios en la rigidez cortical generados entre E10 y E12.5. Esto es de relevancia ya que en ausencia de estas acciones coordinadas: las propiedades mecánicas de las células CR, las diferencias dorsolaterales de E en la zona ventricular y marginal, y la nueva corriente dorsolateral descrita de células derivadas de la preplaca podrían desencadenar un desarrollo neocortical alterado. De hecho, es bien sabido que la correcta distribución de las células CR en la capa de la zona marginal I juega un papel crucial en el mantenimiento de la glía radial (Super et al., 2000) y la migración radial neuronal (Rice et al., 2001), produciéndose producen cambios en el desarrollo de la placa cortical y en la especificación de la capa I cuando su distribución se ve alterada (Super et al., 2000; Alcantara et al., 2006; Villar-Cervino et al., 2013).

Si tenemos en cuenta los factores mecánicos obtenidos, y los datos sobre implicación de los factores moleculares en la migración de las CRs, obtenemos una visión bastante coherente sobre el proceso de migración tangencial desde las diferentes regiones. En este modelo, las CR-CH responden positivamente a CXCL12 y a los factores mecánicos, y responden negativamente a la semaforina 3E. Sabiendo que migran de la región medial, donde hay mayor expresión de semaforina 3E, que el CXL12 las mantiene en posición subpial en capa I y que tienen más capacidad migratoria en las regiones más blandas (lateral), podemos entender que es la conjunción de todos estos factores lo que las lleva a migrar hacia y hasta ciertas zonas. Por otra parte, las células CR-PSB responden positivamente a la semaforina 3E y a factores mecánicos, por lo que podrían estar motivada su salida de la zona ventricular del borde del palio y el subpalio por el efecto motogénico de la semaforina 3E de los procesos de la glía radial y por la alta rigidez de estas zonas en comparación con la zona marginal.

Por último, se debería de tener en cuenta para futuros estudios el papel de los factores mecánicos en los procesos fisiológicos y patológicos. Actualmente ya hay muchos estudios que se centran en el estudio de procesos patológicos como la fibrosis pulmonar (Jorba et al., 2019; Andreu et al., 2021) o la metástasis (ver revisión de Eble y Niland, 2019), entre otros (ver revisiones: Saneyasu et al., 2016; Durham et al., 2018; Hsu et al., 2018; Mihăilă et al., 2019; Nia et al., 2020; Gaetani et al., 2020). Y no apartar la interacción que existe en los procesos fisiológicos entre los factores mecánicos y los moleculares, ya que nos aportan la clave de la migración tanto en fisiología, como en patología.

Conclusiones generales de la tesis

Conclusiones generales de la tesis

- 1) El análisis de los factores mecánicos se postula como una herramienta fundamental para entender el proceso migratorio en regeneración neural y en el desarrollo cerebral.
- 2) Las células de la glía envolvente olfativa cambian su morfología según el sustrato al que se adhieren: permisivos, inhibitorios o nanofibras, teniendo preferencia por las nanofibras de PLA 80/20 del diámetro aproximado de 950nm.
- 3) Las nanofibras de PLA 80/20 se pueden funcionalizar químicamente con la quimiocina CXCL12/SDF-1 α , permitiendo que las células de la glía envolvente olfativa puedan migrar mayores distancias que con las no funcionalizadas.
- 4) Las células de Cajal-Retzius son capaces de responder a factores físicos según su origen, respondiendo de forma diferente a las variaciones de densidad de hidrogel *in vitro*.
- 5) Las CR-CH en posición ectópica-lateral prefieren migrar en la porción ventral que en la dorsal de la capa I del cerebro embrionario de ratón.
- 6) La capa I del cerebro de embrión de ratón a E12.5 presenta valores de módulo de Young diferentes entre la región dorsal y ventral.
- 7) Las células de Cajal-Retzius responde al GsMTx-4, un inhibidor de los mecanorreceptores catiónicos *in vitro*, cambiando su tasa de migración y mediante entrada de calcio.

Bibliografía

Bibliografía

- Abou-Khalil, R. et al. Autocrine and paracrine angiopoietin 1/Tie-2 signaling promotes muscle satellite cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5, 298–309 (2009).
- Acheson A, et al. Detection of brain derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 1991; 7: 265-75.
- Aguiló A, Schwartz TH, Kumar VS, Peterlin ZA, Tsiola A, Soriano E, Yuste R. Involvement of cajal-retzius neurons in spontaneous correlated activity of embryonic and postnatal layer 1 from wild-type and reeler mice. *J Neurosci.* 1999 Dec 15;19(24):10856-68.
- Akinlaja J, Sachs F. The breakdown of cell membranes by electrical and mechanical stress. *Biophysical J.* 1998;75:247–254.
- Alcamo EA, Chirivella L, Dautzenberg M, Dobрева G, Fariñas I, Grosschedl R, McConnell SK. Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron.* 2008;57:364–377.
- Alcantara S, Pozas E, Ibanez CF, Soriano E: BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cereb Cortex* 2006, 16(4):487-499.
- Alenghat FJ, Fabry B, Tsai KY, Goldmann WH, and Ingber DE. Analysis of cell mechanics in single vinculin-deficient cells using a magnetic tweezer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277(1):93-9.
- Álvarez, Z., Castaño, O., Castells, A. A., Mateos-Timoneda, M. A., Planell, J. A., Engel, E., et al. (2014). Neurogenesis and vascularization of the damaged brain using a lactate-releasing biomimetic scaffold. *Biomaterials* 35, 4769–4781.
- Andreu I, Falcones B, Hurst S, et al. The force loading rate drives cell mechanosensing through both reinforcement and cytoskeletal softening. *Nat Commun.* 2021;12(1):4229. Published 2021 Jul 9.
- Andrews EM, Richards RJ, Yin FQ, Viapiano MS, Jakeman LB. Alterations in chondroitin sulfate proteoglycan expression occur both at and far from the site of spinal contusion injury. *Experimental Neurology.* 2011;235(1):174-187

Anishkin A, Loukin SH, Teng J, Kung C. Feeling the hidden mechanical forces in lipid bilayer is an original sense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:7898–7905.

Anstötz M, Maccaferri G: A toolbox of criteria for distinguishing cajal-retzius cells from other neuronal types in the postnatal mouse hippocampus. *eNeuro* 2020.

Antypa M, Faux C, Eichele G, Parnavelas JG, Andrews WD: Differential gene expression in migratory streams of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 2011, 34:1584-1594.

Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Kawakita T, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H. TGF-beta1, IL-1beta and Th2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival fibroblasts. *Exp. Eye Res* 2005; 80:555–560.

Bakolitsa C, Cohen DM, Bankston LA, Bobkov AA, Cadwell GW, Jennings L, Critchley DR, Craig SW, and Liddington RC. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* 2004; 430(6999):583-6.

Bandler RC, Mayer C, Fishell G: Cortical interneuron specification: the juncture of genes, time and geometry. *Curr Opin Neurobiol* 2017, 42:17-24.

Bangasser BL, SS Rosenfeld, and DJ Odde. Determinants of maximal force transmission in a motor-clutch model of cell traction in a compliant microenvironment. *Biophys J*, 2013. 105(3): p. 581-92.

Barber M, Pierani A. Tangential migration of glutamatergic neurons and cortical patterning during development: Lessons from Cajal-Retzius cells. *Dev Neurobiol*. 2016 Aug;76(8):847-81.

Barber, M., Arai, Y., Morishita, Y., Vigier, L., Causeret, F., Borello, U., Ledonne, F., Coppola, E., Contremoulins, V., Pfrieder, F.W., et al. (2015). Migration Speed of Cajal-Retzius Cells Modulated by Vesicular Trafficking Controls the Size of Higher-Order Cortical Areas. *Curr Biol* 25, 2466-2478.

Barnett SC, Alexander CL, Iwashita Y, Gilson JM, Crowther J, Clark L, Dunn LT, Papanastassiou V, Kennedy PG, Franklin RJ. Identification of a human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons. *Brain*. 2000 Aug;123 (Pt 8):1581-8.

- Barnett SC, Hutchins AM, Noble M. Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Dev Biol* 1993; 155: 337-50.
- Batard P, Sansilvestri P, Scheinecker C, Knapp W, Debili N, Vainchenker W, Bühring HJ, Monier MN, Kukk E, Partanen J, Matikainen MT, Alitalo R, Hatzfeld J, Alitalo K. The Tie receptor tyrosine kinase is expressed by human hematopoietic progenitor cells and by a subset of megakaryocytic cells. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2212-20.
- Bayer SA, Altman J: Neocortical development. New York: Raven Press; 1991.
- Berger, O., Li, G., Han, S.M., Paredes, M., and Pleasure, S.J. (2007). Expression of SDF-1 and CXCR4 during reorganization of the postnatal dentate gyrus. *Dev Neurosci* 29, 48-58.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Nême N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A: Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 2005, 8:1002-1012.
- Binnig, G., Quate, C. F. y Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930-933.
- Blanquie O, Kilb W, Sinning A, Luhmann HJ: Homeostatic interplay between electrical activity and neuronal apoptosis in the developing neocortex. *Neuroscience* 2017, 358:190-200.
- Blanquie O, Liebmann L, Hübner CA, Luhmann HJ, Sinning A: NKCC1-mediated GABAergic signaling promotes postnatal cell death in neocortical Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex* 2017, 27:1644-1659.
- Blight AR. Remyelination, revascularization, and recovery of function in experimental spinal cord injury. *Adv Neurol*. 1993;59:91-104.
- Borrell V, Del Río JA, Alcántara S, Derer M, Martínez A, D'Arcangelo G, Nakajima K, Mikoshiba K, Derer P, Curran T, Soriano E. Reelin regulates the development and synaptogenesis of the layer-specific entorhino-hippocampal connections. *J Neurosci*. 1999 Feb 15;19(4):1345-58.
- Borrell V, Marín O: Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* 2006, 9:1284-1293.

- Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 115, 453-466 (1962).
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu W, Frydel B, Bramwell A. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;202:145-156
- Brenneke F, Bukalo O, Dityatev A, Lie AA. Mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-r show physiological and structural hallmarks of increased hippocampal excitability, but no increased susceptibility to seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Neuroscience*. 2004;124(4):841-855
- Bribian A, Nocentini S, Llorens F, Gil V, Mire E, Reginensi D, Yoshida Y, Mann F, del Rio JA: Sema3E/PlexinD1 regulates the migration of hem-derived Cajal-Retzius cells in developing cerebral cortex. *Nat Commun* 2014, 5:4265.
- Britanova O, Akopov S, Lukyanov S, Gruss P, Tarabykin V. Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissuespecific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS. *Eur J Neurosci*. 2005;21:658–668
- Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan KY, Schwark M, Gyorgy A, Vogel T, Akopov S, Mitkovski M, Agoston D, Sestan N, Molnár Z, Tarabykin V. Satb2 is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron*. 2008;57:378–392.
- Brohawn SG, Campbell EB, MacKinnon R. Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature*. 2014;516:126–130.
- Brohawn SG. How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1352:20–32.
- Brunstrom, J.E., Gray-Swain, M.R., Osborne, P.A., and Pearlman, A.L. (1997). Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* 18, 505-517.
- Butcher, D.T., T. Alliston, and V.M. Weaver, A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(2): p. 108-22.

- Cadwell CR, Bhaduri A, Mostajo-Radji MA, Keefe MG, Nowakowski TJ: Development and arealization of the cerebral cortex. *Neuron* 2019, 103:980-1004.
- Cai, L., Hayes, N.L., Takahashi, T., Caviness, V.S., Jr., Nowakowski, R.S., 2002. Size distribution of retrovirally marked lineages matches prediction from population measurements of cell cycle behavior. *J Neurosci Res* 69, 731-744.
- Cao L, Liu L, Chen ZY, Wang LM, Ye JL, Qiu HY. Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair. *Brain*. 2004; 127(Pt.3): 535-49.
- Cascone, I., Napione, L., Maniero, F., Serini, G. & Bussolino, F. Stable interaction between $\alpha 5\beta 1$ integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J. Cell Biol.* 170, 993–1004 (2005).
- Case, L. B. & Waterman, C. M. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat. Cell Biol.* 17, 955–963 (2015).
- Castaño O, López-Mengual A, Reginensi D, Matamoros-Angles A, Engel E, Del Rio JA. Chemotactic TEG3 Cells' Guiding Platforms Based on PLA Fibers Functionalized With the SDF-1 α /CXCL12 Chemokine for Neural Regeneration Therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Mar 22;9:627805.
- Caswell, P. T. & Zech, T. Actin- based cell protrusion in a 3D matrix. *Trends Cell Biol.* 28, 823–834 (2018).
- Caviness VS, Jr, Sidman RL. (1973). Time of origin or corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 148:141-151
- Caviness VS., Jr (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res* 256:293-302
- Chan CE, Odde DJ. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*. 2008 Dec 12;322(5908):1687-91.
- CHARNOCK-JONES DS, MACPHERSON AM, ARCHER DF, LESLIE S, MAKKINK WK, SHARKEY AM, SMITH SK. The effect of progestins on vascular endothelial growth factor, estrogen receptor and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell density in human endometrium. *Hum. Reprod* 2000; 15(Suppl. 3):85–95.

Chaudhuri O, Gu L, Darnell M, Klumpers D, Bencherif SA, Weaver JC, Huebsch N, Mooney DJ. Substrate stress relaxation regulates cell spreading. *Nat Commun.* 2015 Feb 19;6:6364.

Chen H, Choudhury DM, and Craig SW. Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(52):40389-98.

Chen J, Kriegstein AR: A GABAergic projection from the zona incerta to cortex promotes cortical neuron development. *Science* 2015, 350:554-558.

Choe, Y., Huynh, T., y Pleasure, S.J. (2014). Migration of oligodendrocyte progenitor cells is controlled by transforming growth factor beta family proteins during corticogenesis. *J Neurosci* 34, 14973-14983.

Choi, H. J. et al. Yes-associated protein regulates endothelial cell contact-mediated expression of angiopoietin-2. *Nat. Commun.* 6, 6943 (2015).

Choquet D, Felsenfeld DP, Sheetz MP. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell.* 1997 Jan 10;88(1):39-48.

Clark, E. R., Linton Clark, E. Reactions of cells in the tail of amphibian larvae to injected croton oil (aseptic inflammation). *American Journal of Anatomy.* 27, 221-254 (1920).

Clark, E. R., Linton Clark, E. The reaction of living cells in the tadpole's tail toward starch, agar-agar, gelatin, and gum arabic. *The Anatomical Record.* 24, (1922).

Clascá F, Porrero C, Galazo MJ, Rubio-Garrido P, Evangelio M: Anatomy and development of multispecific thalamocortical axons. *Axons and Brain Architecture.* 2016.

Cocas LA, Fernandez G, Barch M, Doll J, Diaz IZ, Pleasure SJ: Cell type-specific circuit mapping reveals the presynaptic connectivity of developing cortical circuits. *J Neurosci* 2016, 36:3378-3390.

Cohen DM, Kutscher B, Chen H, Murphy DB, and Craig SW. A conformational switch in vinculin drives formation and dynamics of a talin-vinculin complex at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(23):16006-15.

Cole KS. A Flexure Balance. *Review of Scientific Instruments.* 1932a;3:121–122

Cole KS. Surface Forces of the Arbacia Egg. *Journal of Cellular and Comparative Physiology.* 1932b;1:1–9

- Colello RJ, Chow WN, Bigbee JW, Lin C, Dalton D, Brown D, Jha BS, Mathern BE, Lee KD, Simpson DG (2013) The incorporation of growth factor and chondroitinase ABC into an electrospun scaffold to promote axon regrowth following spinal cord injury. *J Tissue Eng Regen Med* 10:656-668.
- Collazos-Castro, J. E., Muñetón-Gómez, V. C., and Nieto-Sampedro, M. (2005). Olfactory glia transplantation into cervical spinal cord contusion injuries. *J. Neurosurg. Spine* 3, 308–317.
- Conway DE, Breckenridge MT, Hinde E, Gratton E, Chen CS, Schwartz MA. Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Curr Biol.* 2013;23:1024–1030.
- Corbett JJ y Haines DE. Chapter 6: The ventricles, choroid plexus, and cerebrospinal fluid. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* (5ª edición), Elsevier (2018)
- Corey JM, Lin DY, Mycek KB, Chen Q, Samuel S, Feldman EL, Martin DC (2007) Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *J Biomed Mater Res Part A* 83:636-645
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science.* 2010;330:55–60.
- Cowan, WM (1987). Organización del cerebro. *Investigación y Ciencia.* 68-82.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol.* 2014;253:197–207
- Crick F, Hughes A. The physical properties of cytoplasm a study by means of the magnetic particle method. *Exp Cell Res.* 1950;1:37–80.
- Crossman A y Neary D. *Neuroanatomy: An Illustrated Colour Text* (6ª edición), Elsevier (2019)
- Custo Greig LF, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:755–769.
- D’Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Scares HD, Morgan JI, Curran T: A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 1995, 374:719-723.

- D'Souza RD, Burkhalter A: A laminar organization for selective cortico-cortical communication. *Front Neuroanat* 2017, 11:71.
- Dalton, A. C., Shlamkovitch, T., Papo, N. & Barton, W. A. Constitutive association of Tie1 and Tie2 with endothelial integrins is functionally modulated by angiopoietin-1 and fibronectin. *PloS ONE* 11, e0163732 (2016).
- Daly C, Wong V, Burova E, Wei Y, Zabski S, Griffiths J, Lai KM, Lin HC, Ioffe E, Yancopoulos GD, Rudge JS. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev.* 2004 May 1;18(9):1060-71.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature.* 1995 Apr 20;374(6524):719-23.
- David, S., Ghosh, C. C., Mukherjee, A. & Parikh, S. M. Angiopoietin-1 requires IQ domain GTPase-activating protein 1 to activate Rac1 and promote endothelial barrier defense. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2643–2652 (2011).
- Davies J, Tang X, Denning J, Archibald S, Davies S. Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *The European Journal of Neuroscience.* 2004;19:1226-1242
- de Frutos CA, Bouvier G, Arai Y, Thion MS, Lokmane L, Keita M, Garcia-Dominguez M, Charnay P, Hirata T, Riethmacher D et al.: Reallocation of olfactory Cajal-Retzius cells shapes neocortex architecture. *Neuron* 2016, 92:435-448.
- De Marco García NV, Karayannis T, Fishell G: Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* 2011, 472:351-355.
- De Marco García NV, Priya R, Tuncdemir SN, Fishell G, Karayannis T: Sensory inputs control the integration of neurogliaform interneurons into cortical circuits. *Nat Neurosci* 2015, 18:393-401.
- De Palma, M. et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8, 211–226 (2005).

- de Ruyter GC, Malessy MJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Spinner RJ. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus*. 2009 Feb;26(2):E5.
- De Vincentiis S, Falconieri A, Scribano V, Ghignoli S, Raffa V: Manipulation of Axonal Outgrowth via Exogenous Low Forces. *Int J Mol Sci* 2020, 21(21).
- del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 2009;323:638–641.
- Del Río JA, Heimrich B, Borrell V, Förster E, Drakew A, Alcántara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*. 1997 Jan 2;385(6611):70-4.
- Del Rio JA, Heimrich B, Super H, Borrell V, Frotscher M, Soriano E: Differential survival of Cajal-Retzius cells in organotypic cultures of hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 1996, 16(21):6896-6907.
- Del Río JA, Martínez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E. Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex*. 1995 Jan-Feb;5(1):13-21.
- Dembo, M. and Y.L. Wang, Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*, 1999. 76(4): p. 2307-16.
- Deng, C., Gorrie, C., Hayward, I., Elston, B., Venn, M., Mackay-Sim, A., et al. (2006). Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 83, 1201–1212.
- Devon R, Doucette R. Olfactory ensheathing cells do not require L-ascorbic acid in vitro to assemble a basal lamina or to myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res* 1995; 688: 223-9.
- Di Donato V, De Santis F, Albadri S, Auer TO, Duroure K, Charpentier M, Concordet JP, Gebhardt C, Del Bene F: An attractive reelin gradient establishes synaptic lamination in the vertebrate visual system. *Neuron* 2018, 97:1049-1062.e6.
- Doring, Y.; Pawig, L.; Weber, C.; Noels, H. The cxcl12/cxcr4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front. Physiol.* 2014, 5, 212.

- Doucette JR, Kiernan JA, Flumerfelt BA. The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system. *J Anat* 1983; 137(Pt.1): 1-19.
- Doucette R. Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech.* 1993 Feb 1;24(2):113-30.
- Doucette R. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 1990; 3: 433-49.
- Doucette R. Glial progenitor cells of the nerve fiber layer of the olfactory bulb: effect of astrocyte growth media. *J Neurosci Res* 1993; 35: 274-87.
- Doucette R. Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol Histopathol.* 1995 Apr;10(2):503-7.
- Doyle, A. D., Wang, F. W., Matsumoto, K. & Yamada, K. M. One- dimensional topography underlies three- dimensional fibrillar cell migration. *J. Cell Biol.* 184, 481–490 (2009).
- Dumont, D. J., Yamaguchi, T. P., Conlon, R. A., Rossant, J. & Breitman, M. L. Tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 1992;7:1471–1480
- Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res.* 2018 Mar 15;114(4):590-600.
- Eble JA, Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2019 Jun;36(3):171-198.
- Eklund, L. & Saharinen, P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Exp. Cell Res.* 319, 1271–1280 (2013).
- Zraggen E, Boitard M, Roman I, Kanemitsu M, Potter G, Salmon P, Vutskits L, Dayer AG, Kiss JZ. Early postnatal migration and development of layer II pyramidal neurons in the rodent cingulate/retrosplenial cortex. *Cereb Cortex.* 2012 Jan;22(1):144-57
- Elosegui-Artola A, Bazellières E, Allen MD, Andreu I, Oria R, Sunyer R, Gomm JJ, Marshall JF, Jones JL, Trepas X, Roca-Cusachs P. Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types. *Nat Mater.* 2014 Jun;13(6):631-7.

- Elosegui-Artola A, Trepap X, Roca-Cusachs P. Control of Mechanotransduction by Molecular Clutch Dynamics. *Trends Cell Biol.* 2018 May;28(5):356-367.
- Englund C, Fink A, Lau C, et al. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 2005;25:247–251.
- Ezzell RM, Goldmann WH, Wang N, Parashurama N, Parasharama N, and Ingber DE. Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 1997; 231(1):14-26.
- Farbman AI, Squinto LM. Early development of olfactory receptor cell axons. *Brain Res.* 1985 Apr;351(2):205-13.
- Felcht, M. et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J. Clin. Invest.* 122, 1991–2005 (2012).
- Fenlon LR, Suárez R, Richards LJ: The anatomy, organisation and development of contralateral callosal projections of the mouse somatosensory cortex. *Brain Neurosci Adv* 2017, 1:1-9.
- Fernandez-Sanchez, M.E., et al., Mechanical induction of the tumorigenic beta-catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature*, 2015. 523(7558): p. 92-5.
- Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669.
- Finney EM, Stone JR, Shatz CJ: Major glutamatergic projection from subplate into visual cortex during development. *J Comp Neurol* 1998, 398:105-118.
- Franceschini IA, Barnett SC. Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol.* 1996 Jan 10;173(1):327-43.
- Franck C, Maskarinec SA, Tirrell DA, Ravichandran G (2011) Three-Dimensional Traction Force Microscopy: A New Tool for Quantifying Cell-Matrix Interactions. *PLOS ONE* 6(3): e17833
- Franco SJ, Muller U. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron.* 2013;77:19–34.

- Franze K: The mechanical control of nervous system development. *Development* 2013, 140(15):3069-3077.
- Frotscher, M., 1998. Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Current Opinion in Neurobiology* 8, 570–575.
- Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Tsusaka, M., Kinukawa, H., Nitta, A., Nomoto, H., Mima, T., and Furukawa, S. (1998). Simultaneous expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in Cajal-Retzius, subplate and ventricular progenitor cells during early development stages of the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 84, 115-127.
- Gaetani R, Zizzi EA, Deriu MA, Morbiducci U, Pesce M, Messina E. When Stiffness Matters: Mechanosensing in Heart Development and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020 May 25;8:334.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci.* 2006;26:1045–1056.
- Galie, P. A., Nguyen, D. H., Choi, C. K., Cohen, D. M., Janmey, P. A., & Chen, C. S. (2014). Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 7968–7973
- Gamble, J. R. et al. Angiotensin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ. Res.* 87, 603–607 (2000).
- Gangatharan G, Schneider-Maunoury S, Breaux MA: Role of mechanical cues in shaping neuronal morphology and connectivity. *Biol Cell* 2018, 110(6):125-136.
- Gavard, J., Patel, V. & Gutkind, J. S. Angiotensin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev. Cell* 14, 25–36 (2008).
- Geiger B, Volk T, and Volberg T. Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J. Cell Biol.* 1985; 101(4):1523-31.
- Ghassemi S, Meacci G, Liu S, Gondarenko AA, Mathur A, Roca-Cusachs P, Sheetz MP, Hone J. Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Apr 3;109(14):5328-33.

- Gil V, Del Rio JA: Generation of 3-D Collagen-based Hydrogels to Analyze Axonal Growth and Behavior During Nervous System Development. *J Vis Exp* 2019(148).
- Gillespie, P. G., & Walker, R. G. (2001). Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, 413, 194–202.
- Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM (2002) The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4: 720–724
- Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Shibuya M, Neufeld G (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem* 276: 18688–18694
- Gnanasambandam R, Ghatak C, Yasman A, Nishizawa K, Sachs F, Ladokhin AS, Sukharev SI, Suchyna TM: GsMTx4: Mechanism of Inhibiting Mechanosensitive Ion Channels. *Biophys J* 2017, 112(1):31-45.
- Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH JR, Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1996; 137:2262–2268.
- Goldmann WH, Schindl M, Cardozo TJ, and Ezzell RM. Motility of vinculin deficient F9 embryonic carcinoma cells analysed by video, laser confocal, and reflection interference contrast microscopy. *Exp. Cell Res.* 1995; 221(2):311-9.
- Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:777–788.
- Graziadei GA, Graziadei PP. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 1979; 8: 197-213.
- Griveau A, Borello U, Causeret F, Tissir F, Boggetto N, Karaz S, Pierani A. A novel role for Dbx1-derived Cajal-Retzius cells in early regionalization of the cerebral cortical neuroepithelium. *PLoS Biol.* 2010 Jul 27;8(7):e1000440.
- Gu X, Liu B, Wu X, Yan Y, Zhang Y, Wei Y, Pleasure SJ, Zhao C. Inducible genetic lineage tracing of cortical hem derived Cajal-Retzius cells reveals novel properties. *PLoS One.* 2011;6(12):e28653.

Gudiño-Cabrera, G., and Nieto-Sampedro, M. (2000). Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia* 30, 49–63.

Guo C, Eckler MJ, McKenna WL, McKinsey GL, Rubenstein JL, Chen B. Fezf2 expression identifies a multipotent progenitor for neocortical projection neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neuron*. 2013;80:1167–1174.

Gupta M, Sarangi BR, Deschamps J, Nematbakhsh Y, Callan-Jones A, Margadant F, Mège RM, Lim CT, Voituriez R, Ladoux B. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nat Commun*. 2015 Jun 25;6:7525.

Hakanpää, L. et al. Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin β 1 activation. *Nat. Commun*. 6, 5962 (2015).

Han BW, Mullins ME, Cregg JM, Hurtado A, Oudega M, Trombley MT, Gilbert RJ (2009) Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications. *J Neural Eng* 6:016001

Hand RA, Khalid S, Tam E, Kolodkin AL: Axon dynamics during neocortical laminar innervation. *Cell Rep* 2015, 12:172-182.

Harris NG, Carmichael ST, Hovda DA, Sutton RL. Traumatic brain injury results in disparate regions of chondroitin sulfate proteoglycan expression that are temporally limited. *Journal of Neuroscience Research*. 2009;87(13):2937-2950

Harvey EN. The Tension at the Surface of marine Eggs, Especially Those of the Sea Urchin, *Arbacia*. *Biological Bulletin*. 1931;61:273–279.

Hashiyama, M. et al. Predominant expression of a receptor tyrosine kinase, TIE, in hematopoietic stem cells and B cells. *Blood* 87, 93–101 (1996).

He M, Tucciarone J, Lee SH, Nigro MJ, Kim Y, Levine JM, Kelly SM, Krugikov I, Wu P, Chen Y et al.: Strategies and tools for combinatorial targeting of GABAergic neurons in mouse cerebral cortex. *Neuron* 2016, 91:1228-1243.

Hertz, H., On the contact of elastic solids, *Journal Reine Angew. Math*. 92, 156 (1881).

Herz J, Chen Y: Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2006, 7:850-859.

- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL. Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron*. 2001;29:353–366.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011.
- Hilton B, Lang B, Cregg J. Keratan sulfate proteoglycans in plasticity and recovery after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(13):4331-4333
- Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*. 1986;320:531–533.
- Hsu CK, Lin HH, Harn HI, Hughes MW, Tang MJ, Yang CC. Mechanical forces in skin disorders. *J Dermatol Sci*. 2018 Jun;90(3):232-240.
- Hu JS, Vogt D, Sandberg M, Rubenstein JL. Cortical interneuron development: a tale of time and space. *Development*. 2017;144:3867–3878.
- Hu X, Margadant FM, Yao M, Sheetz MP. Molecular stretching modulates mechanosensing pathways. *Protein Sci*. 2017;26:1337–1351.
- Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, and Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol*. 2007; 179(5):1043-57.
- Hurtado A, Cregg JM, Wang HB, Wendell DF, Oudega M, Gilbert RJ, McDonald JW (2011) Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly--lactic acid microfibers. *Biomaterials* 32:6068-6079.
- Ibrahim LA, Schuman B, Bandler R, Rudy B, Fishell G: Mining the jewels of the cortex's crowning mystery. *Curr Opin Neurobiol* 2020, 63:154-161.
- Imaizumi T, Lankford KL, Burton WV, Fodor WL, Kocsis JD. Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nat Biotechnol* 2000; 18(9): 949-53.
- Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA, Kocsis JD. Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J Neurosci*. 1998 Aug 15;18(16):6176-85.

- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*. 2008 Oct;11(10):1153-61.
- Imitola, J.; Raddassi, K.; Park, K.I.; Mueller, F.J.; Nieto, M.; Teng, Y.D.; Frenkel, D.; Li, J.; Sidman, R.L.; Walsh, C.A.; et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXCL12 chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 18117–18122.
- Inoue R, Jian Z, Kawarabayashi Y. Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther*. 2009;123(3):371–85.
- Ishii K, Kubo KI, Nakajima K: Reelin and Neuropsychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2016 Oct 18;10:229.
- Issue Economic Impact of SCI. *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation*, Volume 16, Number 4, 2011.
- Ito K, Turcotte R, Cui J, Zimmerman SE, Pinho S, Mizoguchi T, Arai F, Runnels JM, Alt C, Teruya-Feldstein J, Mar JC, Singh R, Suda T, Lin CP, Frenette PS, Ito K. Self-renewal of a purified Tie2⁺ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science*. 2016 Dec 2;354(6316):1156-1160.
- Iwashita M, Kataoka N, Toida K, Kosodo Y: Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain. *Development* 2014, 141(19):3793-3798.
- Jacobson M, Rao MS: *Developmental neurobiology*, 4th edn. New York: Kluwer Academic/Plenum; 2005.
- Jain NB, Ayers GD, Peterson EN, et al. Traumatic spinal cord injury in the United States, 1993-2012. *JAMA*. 2015;313(22):2236-2243.
- Janiesch PC, Krüger HS, Pöschel B, Hanganu-Opatz IL: Cholinergic control in developing prefrontal-hippocampal networks. *J Neurosci* 2011, 31:17955-17970.
- Javier-Torrent M, Zimmer-Bensch G, Nguyen L: Mechanical Forces Orchestrate Brain Development. *Trends Neurosci* 2021, 44(2):110-121.
- Jones, P., 1984. *Classification of cortical neurons*. Plenum Press, New York.

- Jorba I, Beltrán G, Falcones B, Suki B, Farré R, García-Aznar JM, Navajas D. Nonlinear elasticity of the lung extracellular microenvironment is regulated by macroscale tissue strain. *Acta Biomater.* 2019 Jul 1;92:265-276.
- Kafitz KW, Greer CA. Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia.* 1999 Jan 15;25(2):99-110.
- Kanold PO, Kara P, Reid RC, Shatz CJ: Role of subplate neurons in functional maturation of visual cortical columns. *Science* 2003, 301:521-525.
- Kawakubo T, Naruse K, Matsubara T, Hotta N, Sokabe M. Characterization of a newly found stretch-activated K_{Ca},ATP channel in cultured chick ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6):H1827-38.
- Keyvan-Fouladi N, Raisman G, Li Y. Functional repair of the corticospinal tract by delayed transplantation of olfactory ensheathing cells in adult rats. *J Neurosci* 2003; 23: 9428-34.
- Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3^l-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res.* 2000 Jan 7-21;86(1):24-9.
- Kirmse K, Dvorzhak A, Henneberger C, Grantyn R, Kirischuk S: Cajal-Retzius cells in the mouse neocortex receive two types of pre- and postsynaptically distinct GABAergic inputs. *J Physiol* 2007, 585:881-895.
- Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci.* 2007;98:1652–1658.
- Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell.* 1993. 75: 1389–1399
- Kontos, C. D., Cha, E. H., York, J. D. & Peters, K. G. The endothelial receptor tyrosine kinase Tie1 activates phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to inhibit apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1704–1713 (2002).
- Korhonen EA, Lampinen A, Giri H, Anisimov A, Kim M, Allen B, Fang S, D'Amico G, Sipilä TJ, Lohela M, Strandin T, Vaheri A, Ylä-Herttuala S, Koh GY, McDonald DM, Alitalo K,

- Saharinen P. Tie1 controls angiopoietin function in vascular remodeling and inflammation. *J Clin Invest*. 2016 Sep 1;126(9):3495-510.
- Krause, M., Gautreau, A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014. 15, 577–590.
- Krey JF y Gillespie PG. Chapter 53: Molecular Biology of Hearing and Balance. *Basic Neurochemistry*, Eighth Edition. 2012, American Society for Neurochemistry. Elsevier Inc.
- Kriegstein AR, Gotz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*. 2003;43:37–43.
- Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.
- Kruger RP, Aurandt J, Guan KL. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Oct;6(10):789-800.
- Kumanogoh A, Watanabe C, Lee I, Wang X, Shi W, Araki H, Hirata H, Iwahori K, Uchida J, Yasui T, Matsumoto M, Yoshida K, Yakura H, Pan C, Parnes JR, Kikutani H. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):621-31.
- Kumanogoh A, Marukawa S, Suzuki K, Takegahara N, Watanabe C, Ch'ng E, Ishida I, Fujimura H, Sakoda S, Yoshida K, Kikutani H. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*. 2002 Oct 10;419(6907):629-33.
- Kung, C. (2005). A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*, 436(7051), 647–654.
- Kuo, JC., Han, X., Hsiao, CT. et al. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol* 13, 383–393 (2011).
- Kupferman JV, Basu J, Russo MJ, Guevarra J, Cheung SK, Siegelbaum SA. Reelin signaling specifies the molecular identity of the pyramidal neuron distal dendritic compartment. *Cell*. 2014 Sep 11;158(6):1335-1347.
- Kusakawa, Y., Mikawa, S., and Sato, K. (2015). BMP5 expression in the adult rat brain. *Neuroscience* 284, 972-987.

- Kwon, H.J., Ma, S., and Huang, Z. (2011). Radial glia regulate Cajal-Retzius cell positioning in the early embryonic cerebral cortex. *Dev Biol* 351, 25-34.
- Lakatos A, Barnett SC, Franklin RJ. Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan expression than Schwann cells following transplantation into adult CNS white matter. *Exp Neurol*. 2003 Nov;184(1):237-46.
- Lakatos A, Franklin RJ, Barnett SC. Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes. *Glia* 2000; 32(3): 214-25.
- Lancerotto, L. and D.P. Orgill, Mechanoregulation of Angiogenesis in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2014. 3(10): p. 626-634.
- Landin Malt, A., et al., Alteration of TEAD1 expression levels confers apoptotic resistance through the transcriptional up-regulation of Livin. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e45498.
- Lasfargues JE, Custis D, Morrone F, Carswell J, Nguyen T. A model for estimating spinal cord injury prevalence in the United States. *Paraplegia*. 1995;33(2):62-68
- Latsari M, Dori I, Antonopoulos J, Chiotelli M, Dinopoulos A: Noradrenergic innervation of the developing and mature visual and motor cortex of the rat brain: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol* 2002, 445:145-158.
- Leber, T. Ueber die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der entzündungserregenden Schädlichkeiten. *Fortschritte der Medizin*. 6, 460-464 (1888).
- Ledonne F, Orduz D, Mercier J, Vigier L, Grove EA, Tissir F, Angulo MC, Pierani A, Coppola E: Targeted inactivation of bax reveals a subtype-specific mechanism of Cajal-Retzius neuron death in the postnatal cerebral cortex. *Cell Rep* 2016, 17:3133-3141.
- Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, et al. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J*. 2004;18(11):1200–1208.
- Lee S, Kumar S. Actomyosin stress fiber mechanosensing in 2D and 3D. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-2261.
- Lee, H. S. et al. Gln-362 of angiopoietin-2 mediates migration of tumor and endothelial cells through association with $\alpha 5\beta 1$ integrin. *J. Biol. Chem*. 289, 31330–31340 (2014).

- Lee, J. et al. Angiopoietin-1 guides directional angiogenesis through integrin $\alpha\beta 5$ signaling for recovery of ischemic retinopathy. *Sci. Transl Med.* 5, 203ra127 (2013).
- Legant, W.R., et al., Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three dimensional matrices. *Nat Methods*, 2010. 7(12): p. 969-71.
- Lehtimäki, J., Hakala, M. & Lappalainen, P. Actin filament structures in migrating cells. *Handb. Exp. Pharmacol* 235, 123–152 (2017).
- Léna M, Emilie P, Samuel V, Myriam B, François G, Edwige P. (2011) Angiopoietin-2 regulates cortical neurogenesis in the developing telencephalon. *Cereb Cortex* 21:1695.
- Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*. 2015;125:2019–2028.
- Leone DP, Heavner WE, Ferenczi EA, Dobrev G, Huguenard JR, Grosschedl R, McConnell SK. *Satb2* regulates the differentiation of both callosal and subcerebral projection neurons in the developing cerebral cortex. *Cerebral Cortex*. 2015;25
- Leone DP, Srinivasan K, Chen B, Alcamo E, McConnell SK. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol*. 2008;18:28–35.
- Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 2000;275:28398–28405.
- Li G, Adesnik H, Li J, Long J, Nicoll RA, Rubenstein JLR, Pleasure SJ: Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J Neurosci* 2008, 28:1085-1098.
- Li GL, Brodin G, Farooque M, Funa K, Holtz A, Wang WL, Olsson Y. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996 Mar;55(3):280-9.
- Li J, Sun L, Peng XL, Yu XM, Qi SJ, et al. (2021) Integrative genomic analysis of early neurogenesis reveals a temporal genetic program for differentiation and specification of preplate and Cajal-Retzius neurons. *PLOS Genetics* 17(3): e1009355.

- Li Y, Decherchi P, Raisman G. Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci* 2003; 23: 727-31.
- Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 1997; 277(5334): 2000-2.
- Li Y, Li D, Raisman G. 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* 2005; 34: 343-51.
- Liehn EA, Zerneck A, Postea O, Weber C. Chemokines: inflammatory mediators of atherosclerosis. *Arch Physiol Biochem*. 2006;112:229–238.
- Lim JS, Koh GY, Koh JY. (2015) Angiopoietin-1 blocks neurotoxic zinc entry into cortical cells via PIP2 hydrolysis-mediated ion channel inhibition. *Neurobiol Dis*. 81:203-213
- Lim L, Pakan JMP, Selten MM, Marques-Smith A, Llorca A, Bae SE, Rochefort NL, Marín O: Optimization of interneuron function by direct coupling of cell migration and axonal targeting. *Nat Neurosci* 2018, 21:920-931.
- Liu S, Xie YY, Wang B. Role and prospects of regenerative biomaterials in the repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2019 Aug;14(8):1352-1363.
- Liu T, Xu J, Chan BP, Chew SY (2012) Sustained release of neurotrophin-3 and chondroitinase ABC from electrospun collagen nanofiber scaffold for spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res Part A* 100A:236-242.
- Lo, C.M., et al., Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 2000. 79(1): p. 144-52.
- Lodato, S., Arlotta, P., 2015. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *Annual review of cell and developmental biology* 31, 699-720.
- López-Bendito G, Molnár Z. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nature Reviews. Neuroscience*. 2003;4:276–289.
- López-Bendito G, Sánchez-Alcañiz JA, Pla R, Borrell V, Picó E, Valdeolmillos M, Marín O: Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci* 2008, 28:1613-1624.

- López-Vales R, Forés J, Navarro X, Verdú E. Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2006 Dec;24(3):443-54.
- Lu J, Ashwell KW, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000 Jul 15;25(14):1859-66.
- Lu J, Feron F, Ho SM, et al. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res* 2001; 889: 344-57.
- Luhmann HJ, Kirischuk S, Sinning A, Kilb W: Early GABAergic circuitry in the cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 2014, 26:72-78.
- Luhmann, H.J., Kilb, W., Hanganu-Opatz, I.L., 2009. Subplate cells: Amplifiers of neuronal activity in the developing cerebral cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* 3, 19.
- Luo Y, Raible D, Raper JA (1993) Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75: 217–227
- Lysko DE, Putt M, Golden JA: SDF1 reduces interneuron leading process branching through dual regulation of actin and microtubules. *J Neurosci* 2014, 34:4941-4962.
- Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem.* 1999;274:1381–1387.
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R.F., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501-509.
- Maity A, Cerniglia GJ, Karar J, Koumenis C. (2005) Angiopoietin-1 promotes neurite outgrowth from dorsal root ganglion cells positive for Tie-2 receptor. *Cell & Tissue Research* 320:11-19.
- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescentactivated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* 2000;127: 5253–5263.
- Mandriota, S. J. & Pepper, M. S. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ. Res.* 83, 852–859 (1998).

- Marín O. Chapter 3 -Tangential Migration in the Telencephalon (2015). The Rat Nervous System (Fourth Edition) Pages 45-58
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293, 872-875.
- Marín-Padilla M: Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 1998, 21:64-71.
- Marín-Padilla, M., 1978. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anatomy and embryology* 152, 109-126.
- Mateo I, Llorca J, Infante J, et al. Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 116, 56–58 (2007).
- Mezger, T.G.: *Applied Rheology*, 2017 (4th edition).
- Mierke CT, Kollmannsberger P, Zitterbart DP, Smith J, Fabry B, and Goldmann WH. Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophys. J.* 2007; 94(2):661-70.
- Mihăilă RG. Liver stiffness in chronic hepatitis C virus infection. *Rom J Intern Med.* 2019 Jun 1;57(2):85-98.
- Misson JP, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS, Jr.: Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res* 1988, 44(1):95-108.
- Mitchison, T and Kirschner, M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–772
- Mittaud P, Labourdette G, Zingg H, Guenot-Di Scala D. Neurons modulate oxytocin receptor expression in rat cultured astrocytes: Involvement of TGF-beta and membrane components. *Glia.* 2002;37:169-177
- Miyamae T, Chen K, Lewis DA, Gonzalez-Burgos G: Distinct physiological maturation of parvalbumin-positive neuron subtypes in mouse prefrontal cortex. *J Neurosci* 2017, 37:4883- 4902.

- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R., Macklis, J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 8, 427-437.
- Moreno-Flores MT, Martin-Aparicio E, Martin-Bermejo MJ, Agudo M, McMahon S, Avila J, Diaz-Nido J, Wandosell F (2003) Semaphorin 3C preserves survival and induces neuritogenesis of cerebellar granule neurons in culture. *J Neurochem* 87: 879–890
- Murthy S, Niquille M, Hurni N, Limoni G, Frazer S, Chameau P, Van Hooft JA, Vitalis T, Dayer A: Serotonin receptor 3A controls interneuron migration into the neocortex. *Nat Commun* 2014, 5:5524.
- Nagasaka A, Miyata T. Comparison of the Mechanical Properties Between the Convex and Concave Inner/Apical Surfaces of the Developing Cerebrum. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:702068.
- Nagasaka A, Shinoda T, Kawaue T, Suzuki M, Nagayama K, Matsumoto T, Ueno N, Kawaguchi A, Miyata T. Differences in the Mechanical Properties of the Developing Cerebral Cortical Proliferative Zone between Mice and Ferrets at both the Tissue and Single-Cell Levels. *Front Cell Dev Biol*. 2016 Nov 25;4:139.
- Navarro X, Valero A, Gudiño G, Forés J, Rodríguez FJ, Verdú E, Pascual R, Cuadras J, Nieto-Sampedro M. Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. *Ann Neurol*. 1999 Feb;45(2):207-15.
- Nelson WJ. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36 (Pt 2): 149- 55.27.
- Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:632.
- Nguyen-Lefebvre AT, Selzner N, Wrana JL, Bhat M: The hippo pathway: A master regulator of liver metabolism, regeneration, and disease. *FASEB J* 2021, 35(5):e21570.
- Nia HT, Munn LL, Jain RK. Physical traits of cancer. *Science*. 2020 Oct 30;370(6516):eaaz0868.
- Niclou, S.P., Franssen, E.H., Ehlert, E.M., Taniguchi, M., and Verhaagen, J. (2003). Meningeal cell-derived semaphorin 3A inhibits neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 24, 902-912.

- Niquille M, Limoni G, Markopoulos F, Cadilhac C, Prados J, Holtmaat A, Dayer A: Neurogliaform cortical interneurons derive from cells in the preoptic area. *Elife* 2018, 7:e32017.
- Nocentini S, Reginensi D, Garcia S, Carulla P, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Trepast X, Bribian A, del Río JA. 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.* 2012 May;69(10):1689-703.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7, 136-144.
- Nomura T, Takahashi M, Hara Y, Noriko O: Patterns of neurogenesis and amplitude of reelin expression are essential for making a mammalian-type cortex. *PLoS One* 2008, 3:e1454.
- Nyholm TK, Ozdirekcan S, Killian JA. How protein transmembrane segments sense the lipid environment. *Biochemistry (Mosc)* 2007;46:1457–1465.
- O'Dell RS, Cameron DA, Zipfel WR, Olson EC: Reelin prevents apical neurite retraction during terminal translocation and dendrite initiation. *J Neurosci* 2015, 35:10659-10674.
- Obermayer J, Luchicchi A, Heistek TS, de Kloet SF, Terra H, Bruinsma B, Mnie-Filali O, Kortleven C, Galakhova AA, Khalil AJ et al.: Prefrontal cortical ChAT-VIP interneurons provide local excitation by cholinergic synaptic transmission and control attention. *Nat Commun* 2019, 10:5280.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron.* 1995 May;14(5):899-912
- Oh, H. et al. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 15732–15739 (1999).
- Oliveri H, Franze K, Goriely A: Theory for Durotactic Axon Guidance. *Phys Rev Lett* 2021, 126(11):118101.

Orlandi JG, Stetter O, Soriano J, Geisel T, Battaglia D: Transfer entropy reconstruction and labeling of neuronal connections from simulated calcium imaging. *PLoS One* 2014, 9(6):e98842.

Owen LM, Adhikari AS, Patel M, Grimmer P, Leijnse N, Kim MC, Notbohm J, Franck C, Dunn AR. A cytoskeletal clutch mediates cellular force transmission in a soft, three-dimensional extracellular matrix. *Mol Biol Cell*. 2017 Jul 7;28(14):1959-1974.

Pang M, Shu T, Chen RQ, Liu C, He L, Yang Y, Bardeesi ASA, Lin CK, Zhang LM, Wang X (2016) Neural precursor cells generated from induced pluripotent stem cells with gelatin sponge-electrospun PLGA/PEG nanofibers for spinal cord injury repair. *Int J Clin Exp Med* 9:17985-17994.

Paredes MF, Li G, Berger O, Baraban SC, Pleasure SJ: Stromal derived factor-1 (CXCL12) regulates laminar position of Cajal-Retzius cells in normal and dysplastic brains. *J Neurosci* 2006, 26:9404-9412.

Parikh, S. M. et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PloS Med*. 3, e46 (2006).

Park, S. W. et al. Angiopoietin 2 induces pericyte apoptosis via $\alpha 3\beta 1$ integrin signaling in diabetic retinopathy. *Diabetes* 63, 3057–3068 (2014).

Parpaite T, Coste B: Piezo channels. *Curr Biol* 2017, 27(7):R250-R252.

Parsons, J. T., Horwitz, A. R. & Schwartz, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 633–643 (2010).

Partanen J, Armstrong E, Mäkelä TP, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, Knuutila S, Huebner K, Alitalo K. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol*. 1992 Apr;12(4):1698-707.

Pasapera AM, Schneider IC, Rericha E, Schlaepfer DD, Waterman CM. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J Cell Biol*. 2010;188(6):877-890.

Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin AL (2003) Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424: 398–405

- Pawig, L.; Klasen, C.; Weber, C.; Bernhagen, J.; Noels, H. Diversity and inter-connections in the cxcr4 chemokine receptor/ligand family: Molecular perspectives. *Front. Immunol.* 2015, 6, 429.
- Pérez-Bouza A, Wigley CB, Nacimiento W, Noth J, Brook GA. Spontaneous orientation of transplanted olfactory glia influences axonal regeneration. *Neuroreport.* 1998 Sep 14;9(13):2971-5.
- Petersen CC. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron.* 2007;56:339–355.
- Pixley SK. The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia.* 1992;5(4):269-84.
- Plotnikov SV, Pasapera AM, Sabass B, Waterman CM. Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell.* 2012 Dec 21;151(7):1513-27.
- Polleux F, Morrow T, Ghosh A (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404: 567–573
- Prönneke A, Scheuer B, Wagener RJ, Mock M, Witte M, Staiger JF: Characterizing VIP neurons in the barrel cortex of VIPcre/tdTomato mice reveals layer-specific differences. *Cereb Cortex* 2015, 25:4854-4868.
- Provias, J., Jeynes, B. Reduction in vascular endothelial growth factor expression in the superior temporal, hippocampal, and brainstem regions in Alzheimer's disease. *Curr Neurovasc Res.* 11,202–209 (2014).
- Radtke C, Akiyama Y, Brokaw J, Lankford KL, Wewetzer K, Fodor WL, Kocsis JD. Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *FASEB J.* 2004 Feb;18(2):335-7.
- Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol.* 2004 May 17;473(1):1-15.
- Ramon y Cajal S: Sobre la existencia de células nerviosas especiales en la primera capa de las circunvoluciones cerebrales. *Gaceta Medica Catalana*; 1980.

- Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*. 2000 Feb;25(2):425-35.
- Ramón-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience*. 1992;47(1):213-20.
- Raspa A, Pugliese R, Maleki M, Gelain F (2016) Recent therapeutic approaches for spinal cord injury. *Biotechnol Bioeng* 113:253-259.
- Reginensi D, Carulla P, Nocentini S, Seira O, Serra-Picamal X, Torres-Espín A, Matamoros-Angles A, Gavín R, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Samitier J, Trepát X, Navarro X, del Río JA. Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Jul;72(14):2719-37.
- Reid, S.E., et al., Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium. *EMBO J*, 2017. 36(16): p. 2373-2389.
- Rice DS, Curran T: Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24:1005-1039.
- Rice, A.J., et al., Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 2017. 6(7): p. e352.
- Richter MW, Fletcher PA, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *J Neurosci*. 2005 Nov 16;25(46):10700-11.
- Ridley, A. J. et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709 (2003).
- Rieger A, Deitmer JW, Lohr C. Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* 2007; 55: 352-9.
- Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P., and Ibanez, C.F. (1998). BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 305-315.

- Riva M, Genescu I, Habermacher C, Orduz D, Ledonne F, Rijli FM, López-Bendito G, Coppola E, Garel S, Angulo MC et al.: Activity dependent death of transient cajal-retzius neurons is required for functional cortical wiring. *Elife* 2019, 8:e50503.
- Robertson IB, Rifkin DB. Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGF-beta-Related Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8:a021907.
- Roca-Cusachs, P., V. Conte, and X. Trepats, Quantifying forces in cell biology. *Nat Cell Biol*, 2017. 19(7): p. 742-751.
- Roloff, F., Ziege, S., Baumgärtner, 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 Neurosci.* 14:141.
- Roman JA, Reucroft I, Martin RA, Hurtado A, Mao HQ (2016) Local release of paclitaxel from aligned, electrospun microfibers promotes axonal extension. *Adv Healthc Mater* 5:2628-2635.
- Rosenbluth J (1980) Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J Comp Neurol* 194:639–48.
- Roussos, E., Condeelis, J. & Patsialou, A. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 573–587 (2011).
- Ruitenbergh MJ, Plant GW, Christensen CL, Blits B, Niclou SP, Harvey AR, Boer GJ, Verhaagen J. Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene Ther.* 2002 Jan;9(2):135-46.
- Sachot, N., Engel, E., and Castaño, O. (2014). Hybrid organic-inorganic scaffolding biomaterials for regenerative therapies. *Curr. Org. Chem* 18, 2299–2314.
- Sachot, N., Mateos-Timoneda, M. A., Planell, J. A., Velders, A. H., Lewandowska, M., Engel, E., et al. (2015). Towards 4th generation biomaterials: a covalent hybrid polymer-ormoglass architecture. *Nanoscale* 7, 15349–15361.
- Saharinen P, Eklund L, Miettinen J. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and Cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol* 2008;10:527-37.

- Saharinen, P, Eklund, L., Alitalo, K. Therapeutic targeting of the angiopoietin–TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov.* 2017. 16, 635–661.
- Sahu MR, Mondal AC: Neuronal Hippo signaling: From development to diseases. *Dev Neurobiol* 2021, 81(2):92-109.
- Saneyasu T, Akhtar R, Sakai T. Molecular Cues Guiding Matrix Stiffness in Liver Fibrosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2646212.
- Santos-Benito FF, Ramón-Cueto A. Olfactory ensheathing glia transplantation: a therapy to promote repair in the mammalian central nervous system. *Anat Rec B New Anat.* 2003 Mar;271(1):77-85.
- Schachtrup C, Ryu J, Helmrick M, Vagena E, Galanakis D. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *The Journal of Neuroscience.* 2010;30:5843-5854
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 2005;118:771-80
- Schieber, M. H. Chapter 2 Comparative anatomy and physiology of the corticospinal system. *Handb. Clin. Neurol.*, 82:15-37, 2007.
- Schuman XB, Machold XRP, Hashikawa Y, Fishell GJ, Rudy XB: Four unique interneuron populations reside in neocortical layer 1. *J Neurosci* 2019, 39:125-139.
- Schwartz Levey M, Chikaraishi DM, Kauer JS. Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J Neurosci* 1991; 11: 3556-64.
- Segklia, A., Seuntjens, E., Elkouris, M., Tsalavos, S., Stappers, E., Mitsiadis, T.A., Huylebroeck, D., Remboutsika, E., and Graf, D. (2012). Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS One* 7, e34088.
- Sensharma P, Madhumathi G, Jayant RD, Jaiswal AK (2017) Biomaterials and cells for neural tissue engineering: current choices. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 79:1302-1315.

- Sharma A Verhaagen J, Harvey A. Receptor complexes for each of the class 3 semaphorins. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2012;6:28-- Yamashita N, Yamane M, Suto F, Goshima Y. TrkA mediates retrograde semaphorin3A signaling through PlexinA4 to regulate dendritic branching. *Journal of Cell Science*. 2016;129(9):1802-1814.
- Sharma VP, Beaty BT, Patsialou A, Liu H, Clarke M, Cox D, Condeelis JS, Eddy RJ. Reconstitution of in vivo macrophage-tumor cell pairing and streaming motility on one-dimensional micro-patterned substrates. *Intravital*. 2012 Jul 1;1(1):77-85.
- Shearer, M.C., Niclou, S.P., Brown, D., Asher, R.A., Holtmaat, A.J., Levine, J.M., Verhaagen, J., y 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 signalling pathways. *Mol Cell Neurosci* 24, 913-925.
- Shen HY, Yin DZ, Tang Y, Wu YF, Cheng ZA, Yang R. Influence of cryopreserved olfactory ensheathing cells transplantation on axonal regeneration in spinal cord of adult rats. *Chin J Traumatol* 2004; 7: 179-83.
- Shinozaki K, Miyagi T, Yoshida M, Miyata T, Ogawa M, Aizawa S, Suda Y: Absence of Cajal-Retzius cells and subplate neurons associated with defects of tangential cell migration from ganglionic eminence in *Emx1/2* double mutant cerebral cortex. *Development* 2002, 129:3479-3492.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843–845.
- Siegenthaler, J.A., Ashique, A.M., Zarbalis, K., Patterson, K.P., Hecht, J.H., Kane, M.A., Folias, A.E., Choe, Y., May, S.R., Kume, T., et al. (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 139, 597-609.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007;86:306–319.
- Silver, J., and Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 146–156.
- Simon, M. P., Tournaire, R. & Pouyssegur, J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J. Cell. Physiol.* 217, 809–818 (2008).

- Smale, K. A., Doucette, R., and Kawaja, M. D. (1996). Implantation of olfactory ensheathing cells in the adult rat brain following fimbria-fornix transection. *Exp. Neurol.* 137, 225–233.
- Smith, D., Wagner, E., Koul, O., McCaffery, P., and Drager, U.C. (2001). Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon. *Cereb Cortex* 11, 894-905.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92: 735–745
- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Kondo S, Hanatani M, Suzuki H, Yamashita K. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1996; 221:193–198.
- Spinal cord injury facts and figures at a glance (2011). National Spinal Cord Injury Statistical Center, Birmingham, Alabama.
- Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest.* 113, 14–18 (2004).
- Stricker J, Beckham Y, Davidson MW, Gardel ML (2013) Myosin II-Mediated Focal Adhesion Maturation Is Tension Insensitive. *PLOS ONE* 8(7): e70652.
- Stupack DG, Cheresch DA (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 115: 3729–3738
- Sukharev, S., & Corey, D. P. (2004). Mechanosensitive channels: Multiplicity of families and gating paradigms. *Science's STKE [Electronic Resource]: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2004(219), re4.
- Sultan, K.T., Brown, K.N., Shi, S.H., 2013. Production and organization of neocortical interneurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 221.
- Sunyer R, Jin AJ, Nossal R, Sackett DL: Fabrication of hydrogels with steep stiffness gradients for studying cell mechanical response. *PLoS One* 2012, 7(10):e46107.
- Sunyer R, Conte V, Escribano J, Elosegui-Artola A, Labernadie A, Valon L, Navajas D, García-Aznar JM, Muñoz JJ, Roca-Cusachs P, Trepát X. Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission. *Science*. 2016 Sep 9;353(6304):1157-61.

- Super H, Del Rio JA, Martínez A, Pérez-Sust P, Soriano E: Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex* 2000, 10(6):602-613.
- Supèr H, Martínez A, Del Río JA, Soriano E. Involvement of distinct pioneer neurons in the formation of layer-specific connections in the hippocampus. *J Neurosci.* 1998 Jun 15;18(12):4616-26.
- Supèr H, Soriano E, Uylings HB. The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 Jun;27(1):40-64.
- Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci.* 2002 Aug 1;22(15):6670-81.
- Takiguchi-Hayashi K, Sekiguchi M, Ashigaki S, Takamatsu M, Hasegawa H, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Nakanishi S, Tanabe Y. Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci.* 2004 Mar 3;24(9):2286-95.
- Tamagnone L and Comoglio PM (2000) Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* 10: 377–383
- Tamamaki, N., Fujimori, K., Nojyo, Y., Kaneko, T., and Takauji, R. (2003). Evidence that *Sema3A* and *Sema3F* regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 455, 238-248.
- Tan X, Shi SH. Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2:443–459.
- Tanzila Mukhtar and Verdon Taylor. Untangling Cortical Complexity During Development. 2018. *Journal of Experimental Neuroscience.* Volume 12: 1–12.
- Tasic B, Yao Z, Graybiuck LT, Smith KA, Nguyen TN, Bertagnolli D, Goldy J, Garren E, Economo MN, Viswanathan S et al.: Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature* 2018, 563:72-78.

- Tauber, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4, 897-901 (2003).
- Terraf P, Kouhsari SM, Ai J, Babaloo H (2016) Tissue-engineered regeneration of hemisectioned spinal cord using human endometrial stem cells, polyε-caprolactone scaffolds, and crocin as a neuroprotective agent. *Mol Neurobiol* 54:1-11.
- Theriot JA, Mitchison TJ. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*. 1991 Jul 11;352(6331):126-31.
- Tissir F, Ravni A, Achouri Y, Riethmacher D, Meyer G, Goffinet AM: DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:16871-16876.
- Tiveron, M.C., Boutin, C., Daou, P., Moepps, B., and Cremer, H. (2010). Expression and function of CXCR7 in the mouse forebrain. *J Neuroimmunol*.
- Tojkander S, Gateva G, Husain A, Krishnan R, Lappalainen P. Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly. *Elife*. 2015
- Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD (2001) Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13954–13959
- Toshihiko T et al. (2004) Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through regionspecific association of its receptor, Plexin-A1, with Off-Track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev* 18
- Trichet L, Le Digabel J, Hawkins RJ, Vedula SR, Gupta M, Ribault C, Hersen P, Voituriez R, Ladoux B. Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 1;109(18):6933-8.
- Trousse F, Poluch S, Pierani A, Dutriaux A, Bock HH, Nagasawa T, Verdier JM, Rossel M: CXCR7 receptor controls the maintenance of subpial positioning of cajal-retzius cells. *Cereb Cortex* 2015, 25:3446-3457.

- Ubink R, Halasz N, Zhang X, Dagerlind A, Hökfelt T. Neuropeptide tyrosine is expressed in ensheathing cells around the olfactory nerves in the rat olfactory bulb. *Neuroscience*. 1994 Jun;60(3):709-26.
- Valable S, Bellail A, Lesné S, Liot G, Mackenzie E, Vivien D, Bernaudin M, Petit E. Angiotensin-1-induced PI3-kinase activation prevents neuronal apoptosis. *FASEB J* 2003;17:443-445
- Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S, Yancopoulos GD. (1999) Angiotensins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1904-1909.
- Valverde, F., 2002. [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Revista de neurologia* 34, 758-780.
- Villar-Cervino V, Molano-Mazon M, Catchpole T, Valdeolmillos M, Henkemeyer M, Martinez LM, Borrell V, Marin O: Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* 2013, 77(3):457-471.
- Vincent AJ, West AK, Chuah MI. Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J Neurocytol.* 2005 Mar;34(1-2):65-80.
- Vitalis T, Verney C: Sculpting cerebral cortex with serotonin in rodent and primate. *Serotonin - A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells*. 2017.
- Vles F. Les tensions de surface et les déformations de l'oeuf d'Oursin. *Arch d Physique Biol T.* 1926;4:263
- von Wild KR, Brunelli GA. Restoration of locomotion in paraplegics with aid of autologous bypass grafts for direct neurotisation of muscles by upper motor neurons--the future: surgery of the spinal cord? *Acta Neurochir Suppl.* 2003;87:107-12.
- Wagner P. Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy. *FEBS Lett.* 1998 Jun 23;430(1-2):112-5.
- Walker RG, Willingham AT, Zuker CS. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science*. 2000;287:2229-2234.

- Wamsley B, Fishell G. Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18:299–309.
- Wang YL. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol.* 1985 Aug;101(2):597-602.
- Wang, Y., and Huang, Z. (2012). Morphological phenotypes of olfactory ensheathing cells display different migratory responses upon Slit-2. *Exp. Cell Res.* 318, 1889–1900.
- Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells—over and over and over again. *Nat Cell Biol* 4: E97–E100
- Weekes J, Barry ST, and Critchley DR. Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem. J.* 1996; 314 (Pt 3):827-32.
- Weigelin, B., Bakker, G. J. & Friedl, P. Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion: Principles of interface guidance and microvesicle dynamics. *Intravital* 1, 32–43 (2012).
- Weis SM. CD. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature.* 2005; 437 (7058): 497- 504.26.
- Weiss, P. Experiments on cell and axon orientation in vitro; the role of colloidal exudates in tissue organization. *J. Exp. Zool.* 100, 353–386 (1945).
- Wilhelm, K. et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* 529, 216–220 (2016).
- Wolfenson H, Meacci G, Liu S, Stachowiak MR, Iskratsch T, Ghassemi S, Roca-Cusachs P, O'Shaughnessy B, Hone J, Sheetz MP. Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices. *Nat Cell Biol.* 2016 Jan;18(1):33-42
- Wu Z, Guan KL: Hippo Signaling in Embryogenesis and Development. *Trends Biochem Sci* 2021, 46(1):51-63.

- Wu Z, Plotnikov SV, Moalim AY, Waterman CM, Liu J. Two Distinct Actin Networks Mediate Traction Oscillations to Confer Focal Adhesion Mechanosensing. *Biophys J*. 2017 Feb 28;112(4):780-794.
- Xu XY, Li XT, Peng SW, Xiao JF, Liu C, Fang G, Chen KC, Chen GQ (2010) The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. *Biomaterials* 31:3967-3975.
- Xue, M. and C.J. Jackson, Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2015. 4(3): p. 119-136.
- Yamada KM and Sixt M. Mechanisms of 3D cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019; 20: 738–752
- Yao M, Qiu W, Liu R, et al. Force-dependent conformational switch of alpha-catenin controls vinculin binding. *Nat Commun*. 2014;5:4525.
- Yoshida M, Assimacopoulos S, Jones KR, Grove EA: Massive loss of Cajal-Retzius cells does not disrupt neocortical layer order. *Development* 2006, 133:537-545.
- Yuan HT, Venkatesha S, Chan B. Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival. *FASEB J* 2007;21:3171-83
- Zarbali K, Choe Y, Siegenthaler JA, Orosco LA, Pleasure SJ: Meningeal defects alter the tangential migration of cortical interneurons in Foxc1 hith/hithmice. *Neural Dev* 2012, 7:2.
- Zemel A, Rehfeldt F, Brown AE, Discher DE, Safran SA. Optimal matrix rigidity for stress fiber polarization in stem cells. *Nat Phys*. 2010 Jun 1;6(6):468-473.
- Zigmond, S. H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *The Journal of Cell Biology*. 75, 606-616 (1977).
- Zimmer C, Lee J, Griveau A, Arber S, Pierani A, Garel S, Guillemot F. Role of Fgf8 signalling in the specification of rostral Cajal-Retzius cells. *Development*. 2010 Jan;137(2):293-302.
- Zurn AD, Nick H, Monard D. A glia derived nexin promotes neurite outgrowth in cultured chick sympathetic neurons. *Dev Neurosci* 1988; 10: 17-24.

