

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Guía a través de sustratos inhibitorios de células de la glía envoltante del bulbo olfatorio por funcionalización de nanofibras de PLA con SDF1 α

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ANA LÓPEZ MENGUAL

TUTOR/A: JOSÉ ANTONIO DEL RÍO

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, 6 DE JULIO DEL 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias por el cariño recibido por mis compañeros de grupo en estos días de estrés y emociones fuertes, puesto que han supuesto un apoyo en mi integración en el grupo y en la vida laboral.

Me gustaría agradecer a mi jefe de grupo, Toni, la guía en este trabajo, y su paciencia en enseñarme. Y agradecer especialmente a Andreu su paciencia desde los primeros días hasta los últimos, en los que me ha enseñado a trabajar y en los que me ha dejado volar libremente después. Agradecer también a Oscar Castaño su colaboración en la realización de este trabajo, tanto aconsejándome, como pasándome el material necesario para los experimentos.

Muchas gracias a todos: Laura, Miriam, Ina, Ágata, Andreu, Toni, Vane, Arnau, Laia y Anna, por esas tardes de “colegueo” y relax después de una jornada dura de trabajo.

Gracias a mi familia por apoyarme en la decisión de salir de casa para buscar un TFM que me llenara, aunque ello implicara viajar hasta Barcelona y no verme en mucho tiempo.

Y muchas gracias a mis compañeros de máster por toda la información que han compartido desinteresadamente para que todos tuviésemos el trabajo de fin de máster bien hecho y entregado conforme a la normativa y los plazos.

Sin todos vosotros hubiese sido más duro y menos divertido. Muchas gracias.

ÍNDICE

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

1. Migración celular

2. La lesión medular

La cicatriz meningo-glial

Los inhibidores

Estrategias regenerativas valoradas en otros estudios

3. OECs y primeros resultados

4. Las OECs cómo terapia celular

Obtención de las OECs

Variabilidad en los estudios

Estrategias de mejora

5. Electrospinning y obtención de nanofibras

Funcionalización

Eje CXCR4/CXCL12

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

ANEXO

ABSTRACT

La lesión de la médula espinal produce muerte celular y disrupción de los vasos sanguíneos de la región afectada. La desorganización de la barrera hematoencefálica recluta neutrófilos, macrófagos y leucocitos para eliminar los restos celulares y reducir daños secundarios en el tejido dañado. Unos días después, se produce la cicatriz glial en la zona de la lesión, formada mayoritariamente por astrocitos reactivos. Estos secretan muchas moléculas, como el proteoglicano condroitin sulfato (CSPG) o inhibidores asociados derivados de la mielina (MAIs), que inhiben el crecimiento axonal aberrante. Esta inhibición molecular y física de la cicatriz glial es uno de los problemas más importantes en el tratamiento en la lesión medular.

En este contexto, una de las últimas áreas de estudio en el tratamiento de la lesión medular (Spinal Cord Injury, SCI) es la terapia celular, como la basada en las células de la glía envolvente del bulbo olfatorio (Olfactory Ensheathing Cells, OECs). Estas células ayudan a los axones de la vía olfativa a entrar en el bulbo. Debido a estas propiedades se han propuesto para trasplantes en modelos de SCI para ayudar a los axones dañados en la regeneración. Uno de los principales problemas en este tipo de terapia es aumentar la migración a través de los sustratos inhibitorios típicos de la SCI como el CSPG o los MAIs.

En el presente estudio analizamos el potencial de nanofibras de ácido poliláctico (PLA) funcionalizadas con SDF1 α como una ruta migratoria *in vitro* para las OECs a través de sustratos inhibitorios. Las nanofibras de 80L/20D se funcionalizan con la quimioquina SDF1 α , el ligando de CXCR4. Las TEG3, la línea estable de las OECs, expresan el receptor CXCR4 y son capaces de responder a SDF1 α vía pERK $\frac{1}{2}$. Cuando cuantificamos la migración de TEG3 sobre nanofibras funcionalizadas o no funcionalizadas a través de un sustrato inhibitorio observamos mayor migración en las nanofibras funcionalizadas. Por tanto, la funcionalización de las nanofibras de PLA aporta una ruta migratoria más eficaz para las OECs en la terapia de la lesión medular en un modelo *in vitro*. El siguiente paso será testar la capacidad migratoria de las OECs sobre las nanofibras funcionalizadas en un modelo de lesión medular *ex vivo*.

PALABRAS CLAVE: lesión medular, OECs, CSPG, nanofibras de PLA, CXCR4/SDF1 α

INTRODUCCIÓN

1. La migración celular

La migración celular es un fenómeno físico-químico muy importante a nivel celular que permite a las células una mayor interacción con el medio externo tanto en condiciones fisiológicas como en patología. Por ejemplo, encontramos fenómenos de migración en la metástasis, en el desarrollo embrionario, en la inflamación o en la regeneración de tejidos. Este proceso implica la coordinación de los diferentes componentes celulares en respuesta a las señales recibidas del medio (Harunaga and Yamada, 2011).

Las células deben de tener la suficiente plasticidad como para moverse a través de la matriz extracelular (ECM) pero la suficiente rigidez como para no desestabilizar su citoesqueleto y perder la forma celular. Este compromiso viene determinado tanto por los componentes del citoesqueleto celular como por la composición de la ECM. En este último caso, hay ECM que favorece la migración y otras inhibitorias, como las que ocurren en las lesiones neurales. Además, se sabe que los gradientes juegan un papel clave en la modulación de la migración celular aportando direccionalidad al movimiento. En conjunto, las características del sustrato sobre el que la célula va a migrar van a determinar su dirección, su plasticidad y, en definitiva, su velocidad (Rodríguez et al., 2003).

2. La lesión medular

En la lesión del sistema nervioso central (SNC), la lesión medular juega un papel muy relevante en la actualidad debido a su elevada morbilidad derivada de los problemas de déficit neurológicos. Actualmente no existen intervenciones terapéuticas adecuadas ni exitosas para su regeneración, debido a la complejidad de esta patología. Por ello, comprender la fisiopatología de las lesiones medulares es fundamental para desarrollar estrategias terapéuticas mejores y establecer modelos más simples de estudio que nos permitan seguir investigando y desarrollando estrategias.

A partir del momento en el que se produce la lesión medular, ocurren una serie de cambios a corto y largo plazo que revierten en la comorbilidad y la imposibilidad fisiológica de regeneración. Destacamos tres fases o etapas principales (Hyun and Kim, 2010; James et al., 2011):

A) Fase aguda

En la fase aguda se produce una lesión primaria en la cual se produce una sección total o parcial, más o menos limpia, del cordón medular y del resto de sus componentes. La destrucción de la barrera hematoencefálica y de sus vasos sanguíneos locales produce isquemia, anoxia e hipoglicemia, lo cual aumenta la gravedad de la lesión más allá de la sección. En estas condiciones en un periodo de entre 8 a 24 horas, se produce la muerte neuronal y la degeneración de la mielina de los axones dañados, que los fagocitos empezarán a eliminar 48 horas después. Todo esto conlleva en primer lugar un ambiente anaerobio y en segundo lugar la formación de un edema en el lugar de la lesión medular (Dusart and Schwab, 1994; Tator and Fehlings, 1991). En el nivel bioquímico se observan variaciones en los niveles de iones extracelulares que alterna la transmisión sináptica y la excitabilidad de las neuronas. Ello conlleva una subida de Ca^{2+} intracelular, que activa rutas de muerte celular y libera neurotransmisores excitatorios como glutamato y aspartato. Esta liberación de neurotransmisores daña las neuronas sanas, con lo que se extiende el campo de lesión (Balentine and Spector, 1977; Lotan et al., 1994). Además, debido a la respuesta inflamatoria se liberan otros factores proinflamatorios como IL-1, IL-6, TNF α y MIP que promueven el edema (infiltración de células inflamatorias y cambios en la permeabilidad vascular), liberan radicales libres y promueven la pérdida progresiva de la mielina en los axones lesionados (Alexander and Popovich, 2009; Caballero, 2005). En suma, se produce muerte neuronal de las dañadas y de las sanas por varios factores y fallo general del SNC durante varias semanas.

B) Fase Subaguda

Después de la lesión primaria sobreviene una lesión secundaria derivada del proceso de activación glial. La necrosis, la isquemia y la hemorragia provocan un aumento de la actividad glial en la zona más inmediata a la lesión, denominada zona de penumbra, donde tendrá lugar la muerte neuronal secundaria o retrasada, mucho más importante que la lesión primaria (Reier et al., 1983). La activación glial se inicia en microglía y astrocitos a los pocos días de la lesión. Como respuesta al daño se produce una hipertrofia del cuerpo nuclear, una sobreexpresión de GFAP y vimentina, hiperproliferación y acaban formando una malla extensa y densa denominada cicatriz meningo-glial (Cregg et al., 2014). En esta fase es importante la infiltración de células inflamatorias que darán paso a procesos de fagocitosis de las células dañadas y muertas (Moreno-Flores et al., 1993). Esta fagocitosis inicia el proceso de degeneración walleriana, a través de la cual los axones dañados degeneran completamente, produciendo cambios morfológico en el segmento axonal distal (Bruck et al., 1995). Estas células inflamatorias además liberan citoquinas como el TNF- α que tiene tanto propiedades neurodegenerativas como neuroprotectoras (Yan et al., 2001). Además de las citoquinas, la degeneración de la mielina libera inhibidores que impiden la regeneración axonal en el tiempo que tarda en formarse la cicatriz glial, y los oligodendrocitos expresan proteoglicanos inhibitorios y moléculas de guía axonal que forman parte del proceso inhibitorio (Sandvig et al., 2004).

C) Fase crónica

Es el estado más estable, a partir del cual no se producen más cambios histológicos ni funcionales. También suele ser el más predominante en la población, ya que todas las lesiones llegan a esta fase. Aunque no hay un tiempo determinado, ya que depende del tipo de lesión, se sabe que en animales de experimentación esta fase llega a partir del tercer mes (Hill et al., 2001). Se producen una serie de cambios endógenos que llevan a la pérdida gradual de la regeneración neuronal, como la disminución en la expresión de moléculas promotoras del crecimiento (GAP), la expresión de inhibidores del

crecimiento axonal y cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares (Mar et al. 2014; Selzer, 2003).

En su totalidad, el proceso de lesión medular conlleva una serie de cambios en el tiempo que se traducen en un impedimento en la regeneración de la zona lesionada. El conocimiento de dichas fases y sus principales características nos ayuda a elaborar estrategias terapéuticas basándose en el papel de cada componente y su peso en la inhibición del proceso regenerativo.

La cicatriz meningo-glial

Dentro del proceso de lesión medular, la cicatriz meningo-glial es una de los acontecimientos que mayor peso tiene dentro del impedimento de la regeneración medular. Formada debido a los astrocitos hiperproliferativos, se trata de una malla extensa y gruesa que cubre la lesión. A nivel molecular está formada por una compleja mezcla de factores inhibitorios (CSPG, semaforinas secretables, efrinas y tenascinas) que reprimen el crecimiento axonal (Fig1) (Fitch and silver, 2008). A nivel celular destaca la presencia de microglía, oligodendrocitos, células meníngeas y pericitos, que conforman una barrera física obstruyendo el crecimiento axonal (Goritz et al., 2011; Silver and miller, 2004). Aunque lo ideal sería eliminar esta barrera física, diversos estudios apuntan a un empeoramiento de la lesión y desmielinización severa en el caso de eliminar la cicatriz, con lo que se establece un compromiso entre la inhibición del crecimiento axonal y la protección frente a la degeneración y la extensión del daño neuronal (Bush et al., 1999; Pekny et al., 2014).

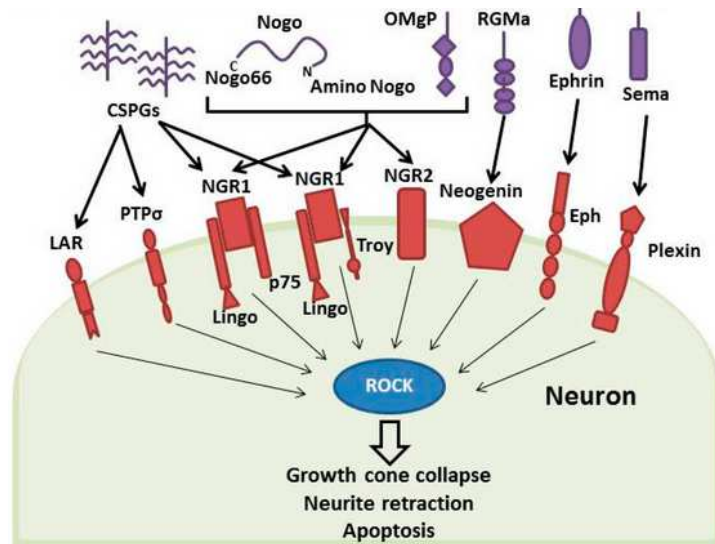


Figura 1: Esquema simplificado de los inhibidores del crecimiento axonal presentes en la cicatriz meningo-glial. La Rho-quinasa (ROCK) se activa a través de moléculas inhibitoras como CSPG, OMgp, MAIs, Efrinas y semaforina que interactúan con sus receptores, dando lugar al colapso del cono de crecimiento, retracción de las neuritas y la apoptosis. Adaptado de Abeysinghe et al., 2016.

Los inhibidores

En la lesión secundaria de la medula espinal, aparecen una serie de inhibidores asociados que frenan el crecimiento axonal. Estas moléculas se agrupan en inhibidores asociados a mielina, proteoglicanos y moléculas de guía axonal.

Los proteoglicanos son glicoproteínas de la matriz extracelular altamente glicosiladas que constan de una estructura central proteica unida covalentemente a cadenas repetidas de glicosaminoglicanos (GAGs) (Silver and Miller, 2004; Mikami and Kitagawa, 2013). Según como se organicen dentro de la proteína, y de los glucósidos que contenga, así como de los sulfatos, se determina su actividad biológica (Volpi and Tarugi, 1999). Estructuralmente existen cuatro tipos de disacáridos: Heparán sulfato (HS), condroitin sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y queratán sulfato (QS). En especial, los CS proteoglicanos (CSPG) participan en migración, diferenciación, proliferación, crecimiento axonal, sinaptogénesis y polaridad neuronal (Galtrey and Fawcett, 2007). Todo ello depende de la etapa de desarrollo, del tipo neuronal, de la

concentración y de la presencia de otras moléculas. Los CSPGs se expresan como moléculas secretables, moléculas ancladas a membrana y moléculas transmembrana (Sandvig et al., 2004). Son importantes en las primeras 24 horas desde el daño neuronal hasta varios meses después (Carulli et al., 2005). Son secretados por astrocitos reactivos, oligodendrocitos y células meníngeas produciendo inhibición del crecimiento axonal por el efecto repulsivo (Shearer et al., 2003).

Las moléculas de guía axonal comprenden semaforinas, efrinas, slits y netrinas como las mejor estudiadas. Las semaforinas son una gran familia de proteínas transmembrana y secretables que participan en migración celular, crecimiento vascular, sinaptogénesis, progresión tumoral y regulación del sistema inmune (Kruger et al., 2005). Cuando son secretadas inhiben el crecimiento del axón en zonas específicas, lo que ayuda a dirigir el crecimiento específicamente en una dirección. En el daño medular la Sema3A es secretada en la zona de lesión por meninges y fibroblastos de la cicatriz glial y contribuye al ambiente inhibitorio de la zona lesionada. Otras semaforinas participan en el proceso inhibitorio (sema4D, sema7D, sema5A y sema6B) de manera transitoria o en lesiones determinadas (Sandvig et al., 2004). El otro gran grupo está compuesto por proteínas secretables relacionadas con la guía axonal durante el desarrollo. Las netrinas actúan como ligandos bifuncionales, en el proceso de atracción axonal se unen al receptor DDC, en cambio, en los procesos inhibitorios se unen al receptor UNC5 (Low et al., 2008; Lai Wing Sun et al., 2011). Los slits son la tercera gran familia de proteínas difusibles que participan en el desarrollo neuronal, en la guía axonal y en migración a través de los receptores roundabout (Robo). Aunque muchas moléculas se expresan en lesiones de médula, Slit2 muestra una expresión más intensa en astrocitos reactivos que rodean al tejido necrótico de la lesión, lo que sugiere que podrían formar parte del ambiente inhibitorio de la zona lesionada (Hagino et al., 2003). El último gran grupo lo constituyen las efrinas transmembranas (EfrinasB) o unidas a membrana mediante GPI (EfrinasA), y sus respectivos receptores EphB y EphA (Martínez and Soriano, 2005). Se conoce su papel en migración y guía axonal en desarrollo y se sobreexpresan en la zona de lesión, ya sea en astrocitos reactivos (Efrina-2) o en oligodendrocitos (Efrina-B3) (Sandvig et al., 2004; Beanson et al., 2005).

El último gran grupo de inhibidores del crecimiento axonal que participan en la lesión medular son los inhibidores derivados de mielina (MAIs) y sus respectivos receptores. Aunque el papel de la mielina como inhibidora del crecimiento axonal se conoce desde hace tiempo (Carbonetto et al., 1987), actualmente está mejor descrita su acción inhibitoria y las moléculas que participan en ello. De hecho, se han encontrado tres proteínas que participan en la acción inhibitoria de la mielina: Nogo-A, MAG (Glucoproteína glial asociada a la mielina) y OMgp (Glucoproteína mielínica oligodendrocítica) (Schwab et al., 2005). Las tres proteínas son capaces de interactuar con un mismo receptor (NgR1) y desencadenar el efecto inhibitorio. El complejo NgR1 por sí sólo puede interactuar con los MAIs, pero carece de un dominio transductor de señales por lo que su asociación con otros correceptores es fundamental. Se identificaron tres proteínas correceptoras: p75, Lingo-1 y TROY. Aun así, otros receptores son capaces de interactuar con los MAIs: gangliósidos, diversas integrinas y PirB (Filbin et al., 2003). Además, se han encontrado lípidos inhibitorios asociados a la mielina, de hecho, aunque no se conoce exactamente que lípidos son, se sabe que eliminando la expresión de las tres proteínas inhibitorias de mielina, aún sigue habiendo un efecto inhibitorio de la mielina (Cafferty et al., 2010; Lee et al., 2010).

Estrategias regenerativas valoradas en otros estudios

Existe una gran variedad de estrategias terapéuticas probadas en las lesiones de médula espinal, pero ninguna ha logrado una regeneración completa. Aun así, algunas de ellas están cerca de los ensayos clínicos puesto que aportan una pequeña mejora, que en su combinación podrían aportar mejoras funcionales significativas. Una de las estrategias es la de administrar factores neuroprotectores y promotores de la regeneración neural. Otra estrategia contempla la potenciación de la capacidad regenerativa intrínseca neuronal intentando que no respondan a los estímulos inhibitorios del entorno y puedan regenerar (Thuret et al., 2006).

Cómo hemos visto, el ambiente inhibitorio perjudica la regeneración, por ello, muchas estrategias se han centrado en eliminar dicho ambiente a través del bloqueo de moléculas inhibitorias. Se puede centrar en el bloqueo de las MAIs: KO de MAIs,

anticuerpos neutralizantes contra Nogo-A, péptidos agonistas como NEP1-40, fragmentos solubles del receptor NgR1, enzima neuraminidasa (NANasa), etc. Ninguno de ellos a establecerse como una opción terapéutica (Thuret et al., 2006). Estas estrategias se pueden focalizar en el bloqueo de la inhibición del CSPG mediante la enzima bacteriana condroitinasa ABC (ChABC), que corta las cadenas de carbohidratos asociadas al proteoglicano, y permite una recuperación parcial de la función motora después de su aplicación en ratas (Bradbury et al., 2002).

Otras estrategias se basan en el trasplante celular, desde trasplante de nervios periféricos, células de Schwann, OECs de la mucosa olfativa, de células embrionarias de SNC, de trasplante de células madre adultas o embrionarias modificadas o sin modificar y de trasplante de macrófagos activados (Thuret et al., 2006).

Por último, muchos son los estudios que se centran en el avance de la regeneración de los axones mediante el uso de biomateriales, ya sea ellos solos, o bien combinándolos con otras estrategias ya descritas cómo liberación de factores neurotróficos o guía de las terapias celulares mencionadas (Shoichet et al., 2008).

3. OECs y primeros resultados

Unas de las estrategias usadas para la regeneración medular es la terapia celular con células de la glía envolvente del bulbo olfatorio (OECs). Hace más de diez años que estas células tienen una atención especial debido a que participan en la regeneración del Sistema Nervioso Central (SNC) *in vivo*. Durante la vida de los mamíferos las OECs acompañan los nuevos axones de las neuronas sensoriales olfativas desde el Sistema Nervioso Periférico (SNP) hasta el bulbo olfatorio, dentro del SNC del mamífero adulto (Fig2). Debido a esta capacidad única las OECs se han usado en modelos de regeneración de lesiones del SNC con resultados prometedores (Li et al. 1997; Ramón-Cueto et al. 1998).

Las OECs tienen unas características fenotípicas que las diferencian del resto de glía. Estas células expresan varios antígenos, sin embargo su expresión no es constante ni regular, por lo que no se pueden usar como marcadores (Franssen et al., 2007). Estos

marcadores son tanto centrales (GAFP) como periféricos (S-100 y p75) (Ramón-Cueto et al. 1998). Se han descrito dos subpoblaciones: las schwan-like OECs (sOECs) y las astrocyte-like OECs (aOECs); que varían tanto en morfología como en propiedades migratorias. Las sOECs tienen morfología fusiforme y migran 3 veces más que las aOECs, con morfología estrellada plana (Kumar et al., 2005). Esta variación puede significar que la morfología refleja un estado funcional diferente. Además, estas células presentan una elevada plasticidad, pudiendo variar su morfología dependiendo del ambiente (Huang et al., 2008). Además de la morfología, se ha observado la alta dinámica de los lamelipodios laterales, los cuales actuarían como un sensor de contacto célula-célula durante el proceso migratorio, con lo que se postula que el proceso migratorio puede ser inducido por contacto (Windus et al., 2007).

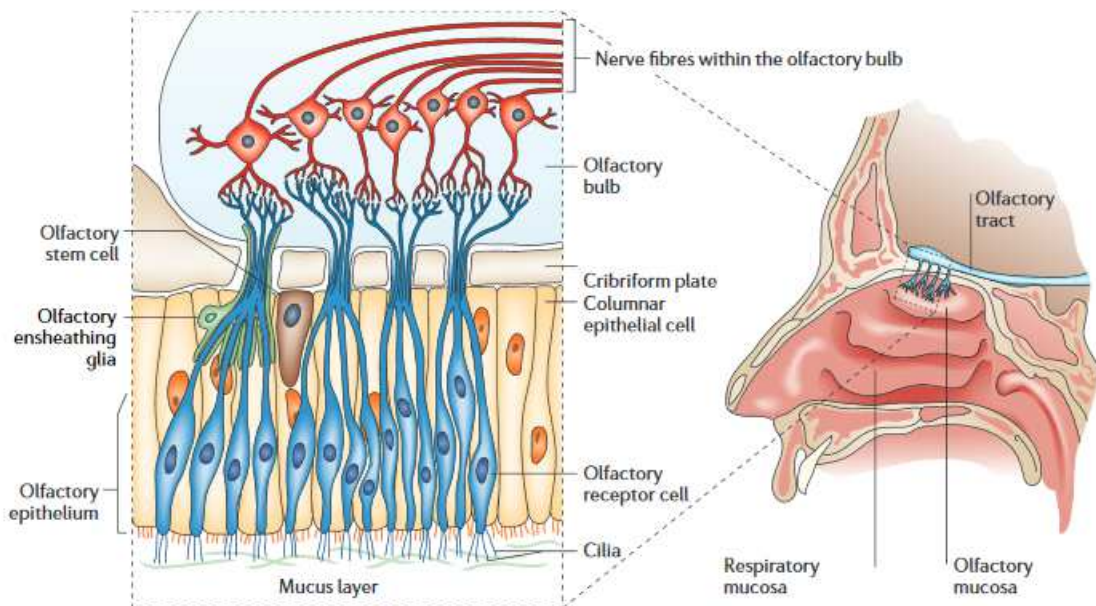


Figura 2: Esquema de una sección sagital que muestra el sistema nervioso olfativo (derecha) y con una sección del sistema nervioso olfativo (izquierda). Las células madre del epitelio olfativo generan nuevas neuronas receptoras olfativas durante toda la vida, que extienden axones *de novo* al bulbo olfatorio. Estos axones están rodeados por la glía envolvente olfativa a medida que pasan a través de la lámina propia de la mucosa olfativa y en el SNC a través de la lámina cribrosa. Extraído de Thuret et al., 2006.

4. Las OECs cómo terapia celular

En 2001 Raisman describió la necesidad de subcultivar durante varios pasos estas células para poder obtener mejores resultados en la regeneración del SNC. Es por ello que los cultivos primarios de OECs extraídas directamente desde el bulbo olfatorio no son efectivas *in vitro* para estudios de regeneración del axón neuronal. Por ello, en 2003, Moreno-Flores et al describieron la generación de una línea de OECs estables inmortal que resuelve la ardua tarea de extraer estas células, seleccionarlas y subcultivarlas para que adquieran las propiedades necesarias para la regeneración, paso limitante en humanos.

Las OECs se han probado a inmortalizar de muchas maneras con el antígeno T grande del virus oncogénico SV40, pero la que mejor se adapta al co-cultivo con neuronas es la del antígeno *wilt-type*, ya que la transformación se produce a una temperatura fisiológica de 37°C. Con este antígeno las células adquieren el carácter inmortal que buscamos y se ha demostrado en experimentos de trasplante que no son oncogénicas *in vivo*. También se han analizado los patrones de expresión molecular de la línea inmortal y tienen *pattern* similares a las OECs de cultivo primario (Moreno-Flores et al., 2003).

La línea celular inmortal de OECs, llamada TEG3, se ha establecido infectando cultivos primarios de OECs de ratas adultas con el plásmido pEF321-T, que expresa el antígeno T grande del virus oncogénico SV40, bajo el control del promotor constitutivo EF1 α . Esta línea celular se caracterizó para su expresión de tres marcadores bioquímicos: beta-III tubulina, MAP2C axonal y sinaptofisina, cuyos valores fueron muy similares a los cultivos primarios de OECs. Además, del resto de clones obtenidos, sólo las TEG3 consiguieron ayudar a regenerar neuritas más largas en el modelo de regeneración axonal de neuronas ganglionares de la retina (RGN, de Retinal Ganglion Neuron) (Moreno-Flores et al., 2003).

Goodman et al describieron en 1993 que líneas celulares de OECs inmortalizadas con este antígeno T SV40 tenían la efectos neuritogénicos en RGN de embriones de pollo. Por todo ello, la línea inmortal TEG3 establecida por Moreno-Flores et al será la elegida para nuestros experimentos *in vitro*.

Hoy en día no está claro cuál es el mecanismo exacto por el cual las OECs ayudan a regenerar los axones en una SCI. Diversas teorías se han postulado al respecto, que se centran en dos posibles mecanismos. El primero será que la elevada expresión de factores solubles (factores neurotróficos y factores de crecimiento) ayudarían a la supervivencia neuronal (Lipson et al., 2003). El segundo implica la formación de una estructura aislante entre el ambiente inhibitorio y el axón que acompaña, generando un tubo envolvente (Li et al., 2005). Además, se sabe que las OECs secretan toda una serie de factores propicios para el crecimiento axonal (laminina, heparan sulfato proteoglicano, fibronectinas, moléculas de adhesión, etc.) (Tisay and Key, 1999).

Las OECs tienen ventajas respecto a otros tipos celulares, ya que logran integrarse y migrar en la cicatriz meningo-glial, además, secretan factores neuroprotectores y neurotróficos, promueven la angiogénesis, forman un tubo que aísla los axones del ambiente inhibitorio y pueden obtenerse del propio individuo adulto (Rhoet and Verhaagen, 2014). Así pues, se promueve la regeneración axonal, se disminuyen los problemas éticos asociados al uso de células embrionarias y al ser autólogas no producen rechazo.

Obtención de las OECs

Las células de la glía envolvente olfativa se pueden obtener del individuo adulto, tanto del epitelio nasal (OEC-OE) como de las capas superficiales del bulbo olfativo (OEC-OB), aunque algunos estudios indican la fuente bulbar como la más óptima en estudios de regeneración medular (Rubio et al., 2008; López-Vales et al., 2006).

Variabilidad en los estudios

Muchos son los estudios realizados sobre las OECs y su papel en la regeneración de la lesión medular, y no todos afirman un papel beneficioso de las OECs. Esto puede deberse a la variabilidad en la fuente de extracción, las diferencias de edad de los animales, los métodos de cultivos y a la estrategia de trasplante (Harvey and Plant,

2006). Por todo ello se hace tan complicado interpretar los resultados de los trasplantes de OECs en SCI.

Estrategias de mejora

En el campo de la terapia celular, muchas veces se tiende a modificar las propias células para añadir o quitar características y mejorar la terapéutica. En las OECs se han probado diversas técnicas a fin de mejorar su migración y potenciar su capacidad regenerativa. Por ejemplo, en 2015 se obtuvo una línea celular estable de OECs que secretaban el ectodominio de NgR1, obteniendo un efecto antagonista de los factores inhibitorios en estas células y mejorado su migración en modelos *in vitro* y en modelos animales de SCI (Reginensi et al., 2015). En combinación con las modificaciones se aplican otras estrategias para mejorar los tratamientos: terapia génica para liberar factores que mejoren el crecimiento axonal; factores neutralizantes de las moléculas inhibitorias o de sus señales; y biomateriales que guíen y aporten direccionalidad y soporte estructural a las células migratorias. En este último campo es en el que se centrará nuestro estudio, ya que usaremos nanofibras de PLA modificadas para guiar las OECs.

5. Electrospinning y obtención de nanofibras

El proceso de electrospinning permite obtener fibras a partir de la aplicación de altos voltajes eléctricos (10-20KV) en soluciones poliméricas. Esto permite crear un fino flujo expulsado desde la punta de la jeringa que contiene la solución acoplada a una bomba de infusión hasta el plato colector conectado a tierra. Durante el proceso se evapora el solvente y las nanofibras se depositan en el colector (Teo and Ramakrishna, 2006).

Dependiendo de la viscosidad y el voltaje obtendremos un grosor determinado y según el tipo de colector que usemos una disposición específica de las nanofibras. Por ejemplo, si usamos un colector fijo plano obtendremos una disposición entrecruzada, pero si usamos un colector rotatorio a alta velocidad (>500 rpm), iremos recogiendo las fibras de manera ordenada conforme se depositan (Fig3). En este último caso

obtendremos nanofibras alineadas entre sí. Además, dependiendo del material del colector y del tiempo de electrospinning obtendremos una compactación de las fibras determinada (Baji et al., 2010).

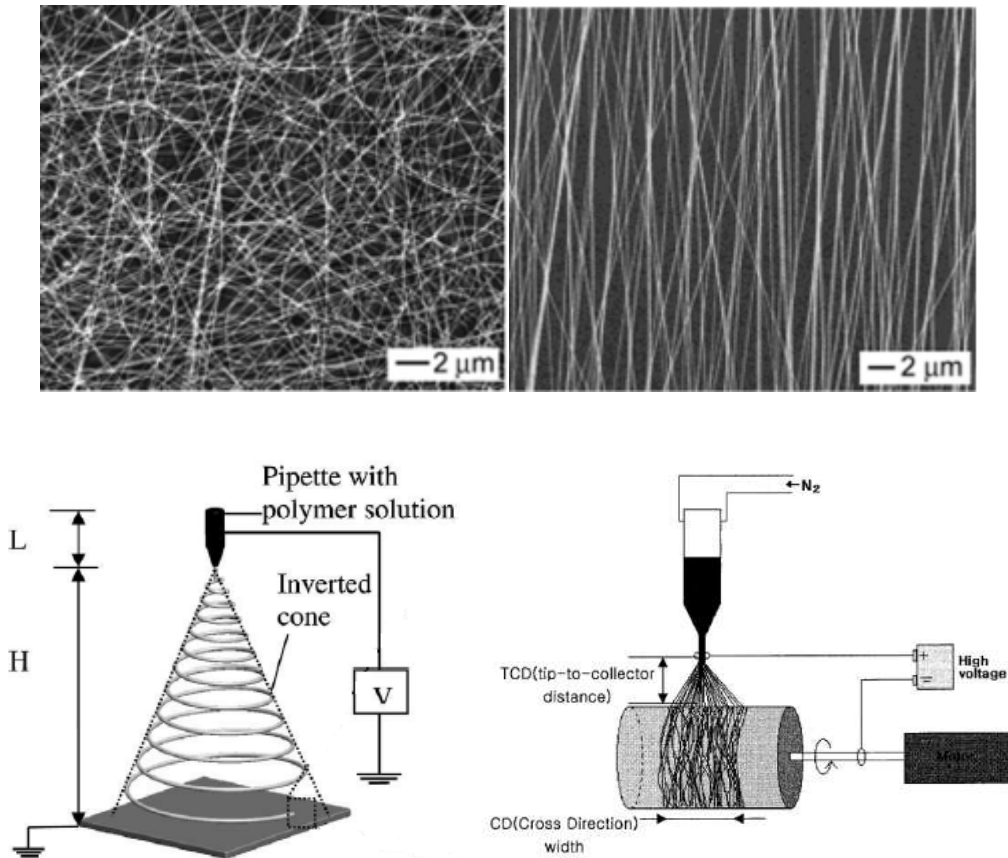


Figura 3: Para obtener nanofibras alineadas deberemos de usar un colector rotatorio, porque al usar un colector plano obtenemos una malla de nanofibras entrecruzadas.

Dependiendo del ensayo nos interesa tener un diámetro determinado de nanofibras. Los principales factores que controlan este diámetro son: (I) la concentración de polímero en la solución, y por tanto su viscosidad, (II) el tipo de solvente utilizado, (III) la conductividad de la solución, y (IV) el flujo de salida de la solución (Baji et al., 2010).

Por último, la variedad de materiales que se pueden usar en esta técnica es muy amplia: polímeros naturales (colágeno, almidón, quitina y quitosano) y polímeros sintéticos biodegradables (ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), etc). Además, los diferentes polímeros se pueden mezclar para obtener nuevas características que junto a la gran diversidad de variables que implican la técnica del electrospinning aportan un amplio abanico de posibilidades.

La aplicación de estas fibras es tan grande como sus posibilidades en cuanto a características, aunque las que nos interesan son aquellas que tienen relación con la biomedicina y la ingeniería de tejidos. Las nanofibras de polímeros biodegradables se pueden usar en la ingeniería de tejidos debido a su elevada área, su volumen y su alta porosidad, por otra parte su flexibilidad las hacen ideales para el sostén de células. Estas fibras además se pueden modificar químicamente su superficie para mejorar sus características en base a las aplicaciones o a las características de las células usadas (funcionalización). Usando las fibras orientadas de manera aleatoria podemos obtener estructuras similares a la matriz extracelular con alta resistencia que se pueden usar en estrategias regenerativas o como sustitutas de tejido, promoviendo su regeneración natural en una lesión (por ejemplo) de piel (Baji et al., 2010). Si en cambio usamos estructuras alineadas se pueden reproducir características de otros tejidos como nervios o tejido musculoesquelético (músculo, tejido cardíaco, tendones y ligamentos).

Funcionalización

Aunque la técnica del electrospinning permite gran variedad de características, a veces podemos mejorar estas fibras y añadir nuevas características mediante la funcionalización con moléculas bioactivas. La funcionalización de la superficie de nanofibras en gradiente es un concepto relativamente nuevo que está empezando a ser explorado. Shi et al. presentaron un método para hacer gradientes en nanofibras mediante el control de la velocidad de sumergido en una solución con la proteína de interés y fisadsorción. Por otra parte, aunque la generación de fibras con gradiente puede ser una solución, no se puede usar con todas las moléculas, por eso se puede recurrir a la funcionalización por quimioadsorción de moléculas en nanofibras ya formadas. En el caso de la funcionalización mediante química EDC/NHS primero se deben preparar químicamente las nanofibras mediante la inducción de grupos carboxilos y seguidamente se añaden los intermedio de acoplamiento (EDC/NHS) para finalmente unir la biomolécula a través de una amina primaria resultando en un enlace amida. (Mateos-Timoneda et al., 2014).

Eje CXCR4/CXCL12

Las quimioquinas son una familia citoquinas proinflamatorias de bajo peso molecular (8-10 KDa) y son las principales responsables de la quimiotaxis, que induce dirección migracional. Están implicadas en respuesta del sistema inmune, en angiogénesis, desarrollo embrionario, metástasis, hematopoyesis, etc. Los receptores de quimioquinas son proteínas transmembrana con siete dominios, que pertenecen al grupo de las proteínas G que activan e inhiben diferentes enzimas enviando señales intracelulares (Kucia et al., 2004).

El factor derivado de células de estroma-1 (SDF-1/CXCL12) es una quimioquina que regula la quimiotaxis de leucocitos, la diferenciación de linfocitos T, reclutamiento de precursores osteoclasticos y participa en angiogénesis. Los receptores de SDF1 α son CXCR4 y CXCR7 y presentan un amplio patrón de expresión en los tejidos. Ambos receptores contribuyen de forma diferente a las respuestas mediadas por CXCL12, no obstante cada vez está más aceptado el papel de CXCR7 como modulador de la señalización vía CXCR4 (Levoye et al., 2009). Dependiendo de la activación de la proteína G α_i , CXCL12 promueve la activación de PI3K, Erk1/2, y la fosforilación de tirosinas en las proteínas de la adhesión focal (Fig4).

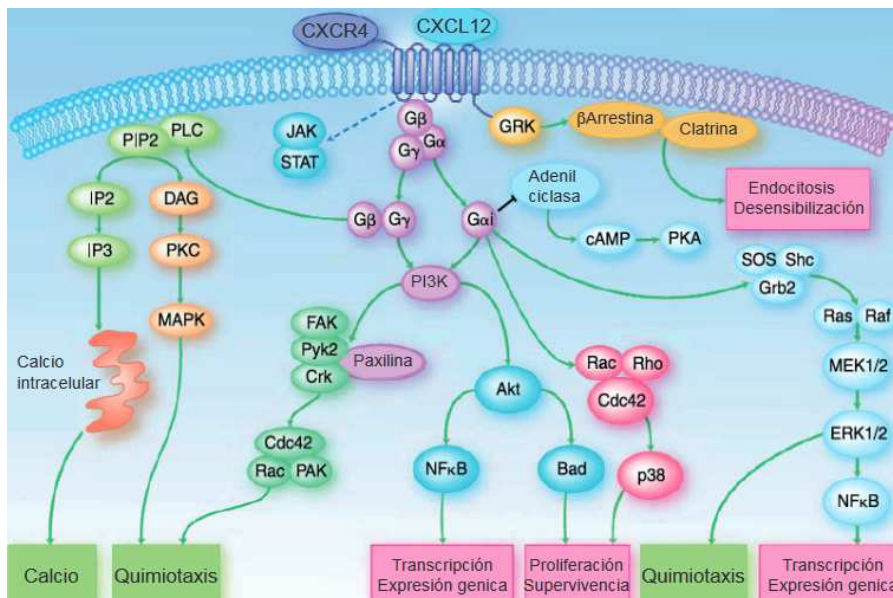


Figura 4: La activación del CXCR4 mediante la unión de CXCL12 desencadena una amplia variedad de respuestas fisiológicas como la quimiotaxis, la supervivencia y la proliferación celular. Adaptado de Teicher and Fricker, 2010.

OBJETIVOS

En el presente estudio intentamos determinar la capacidad de las nanofibras funcionalizadas con quimioatrayentes como rutas migratorias para las OECs en un modelo *in vitro* preliminar de lesión medular. Para ello primero intentaremos determinar si las OECs responden a SDF1 α como molécula clave. Además, probaremos la correcta funcionalización de las nanofibras que usaremos a continuación. Por último, intentaremos determinar la preferencia de las OECs en nanofibras funcionalizadas y determinaremos si la funcionalización ayuda a conseguir mayores distancias y direccionar la migración de las OECs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos y reactivos

Los anticuerpos primarios usados en los ensayos de Western blot e inmunocitoquímicas son: Akt-Phospho (Ser473) Rabbit (Cell Signalling), AKT1 Goat (Santa Cruz), SDF1 alpha antibody (Abcam; AB25117), CXCR4/CD184 (Thermo Fisher Scientific; PA3-305), Actin (pan-Actin): rabbit (Cell Signaling; 4968), Erk phospho(p44/42 MAP Kinasa) rabbit (Cell Signaling; 9101S) y ERK (panERK) mouse (BD Transduction Laboratories; 610123).

Los anticuerpos secundarios usados para detectar los primarios son: anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell Signalling; 7076), Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Cell Signalling; 7074) y Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (Dako; P0447).

Otros reactivos usados tanto para los tratamientos de los cubres como para sus coatings: BSA Alexa Fluor 594 (Invitrogen), extracellular chondroitin sulfate proteoglycan mixture (millipore), Poly-L-Lysine (Sigma; P4707), Laminin (Sigma; L2020), Recombinant murine SDF-1 (CXCL12) (Peprotech; 250-20A), Boric acid (Sigma; B1934),

Líneas celulares

Para todos los experimentos usaremos una línea celular estable de OECs denominada TEG3. Para mantener estas células en cultivo necesitan D-MEM/F-12 (1:1) (1X), liquid (Invitrogen; 31330-038) con un 10% de BCS (Bovine Calf Serum, SAFC Biosciences, 12133C-500ML), Fungizona 1% (Invitrogen; 15290-026), extracto de pituitaria (Invitrogen) y forskolina (Sigma; F6886). En ocasiones usamos una línea TEG3-GFP para determinar la posición de las células sin necesidad de teñirlas previamente para reducir los lavados en las inmunocitoquímicas que pueden perturbar la muestra.

Electrospinning y funcionalización nanofibras

Para el electrospinning recurrimos a un grupo del IBEC especializado en biomateriales y regeneración, en concreto al grupo de Elisabeth Engel. Para los diferentes experimentos usaremos una mezcla de ácido poli-láctico (PLA) que polimeriza por la técnica del electrospinning. Estas nanofibras se depositan en una ventana de parafina que luego usaremos para funcionalizar con una solución de SDF1 α sumergiéndola durante unos minutos en un extremo (Mateos-Timoneda et al., 2014). Estas ventanas son la que usaremos en los experimentos con TEG3 sobre cubres tratados (ver protocolo).

Tratamiento de los cubres

Todos los cubres redondos usados en estos experimentos han sido previamente lavados con etanol 70% durante 10 minutos en agitación suave y con H₂O mili-Q durante 10 minutos en agitación suave. Después de dejarlos secar se incuban toda la noche (ON) a 4°C con una solución de tampón borato. Al día siguiente se realiza un lavado con H₂O mili-Q y se incuba durante 1 hora a 37°C con poly-l-lisina. Después se realiza un lavado con H₂O mili-Q y se deja secar para poder enganchar los diferentes chips de PDMS que usaremos tanto para los coatings inhibitorios como para el ensayo de bandas (stripes assay).

Stripes assay

Para el ensayo de bandas usaremos cubres tratados con el protocolo nombrado anteriormente. Encima del cubre seco depositaremos ejerciendo una ligera presión un chip de microfluídica que dispone de una serie de bandas de silicona que separan los diferentes canales que tienen un lugar de entrada por donde introduciremos el coating y uno de salida. El primer coating lo dejaremos durante 1 hora a 37°C (ya sea CSPG, SDF1 α o laminina), pasado este tiempo se hace un lavado con H₂O mili-Q sin levantar el chip y se incuba durante 30 minutos con BSA-Alexa 594 a 37°C. Su vuelve a hacer un lavado con H₂O mili-Q y se saca el chip. El cubre entero se incuba con el segundo

coating según cada condición durante 1 hora a 37°C y se realiza un lavado con H₂O mili-Q pasado este tiempo. Sobre este cubre ya se pueden sembrar las TEG3 (100.000 células por cubre) y esperar durante 24 horas a que se enganchen antes de fijarlas. Para cada condición se fotografían 3 campos a 10x que se cuantifican contando las células en cada banda y haciendo la relación sobre el total de células. Luego hacemos el promedio y calculamos el error de cada condición.

Western Blot

En el contexto de determinación bioquímica de la activación de CXCR4 vía estimulación con SDF1 α usamos la separación mediante geles de acrilamida de los extractos celulares proteicos. Para ello se prepara la muestra separando el medio de las células y lisando estas con RIPA buffer más inhibidores de proteasas y separando las proteínas de los orgánulos y lípidos. El extracto proteico se desnaturaliza en el gel de acrilamida y se separa por peso molecular y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa, luego se incuba la membrana con las proteínas con el anticuerpo primario apropiado durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incuba con un anticuerpo secundario unido a HRP (*horseradish peroxidase*), que lo revelaremos con el sustrato ECL (*Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents*), dando lugar a una señal quimioluminiscente que, en una sala oscura, se transmite a un film de autorradiografía y se revela. Los anticuerpos secundarios usados son Rabbit HRP secondary antibody (dilución 1:2000), Mouse HRP secondary antibody (dilución 1:4000) y Goat HRP secondary antibody (dilución 1:2000) (Invitrogen).

Inmunocitoquímica

La detección de ciertos componentes y su revelado en una muestra se realiza a través de una serie de pasos que empiezan fijando la muestra en el momento deseado y permeabilizándola. A partir de este punto incorporamos los anticuerpos primarios y los secundarios. En nuestro caso procederemos con el mismo método variando los anticuerpos usados según el tipo de muestra.

El primer paso es fijar la muestra con paraformaldehído al 2% en hielo durante 5 minutos, y luego con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Después de lavar con PBS 1x (2 veces, 10 minutos), procedemos a permeabilizar la muestra con PBS 1x + tritón 0.05% (3 veces, 10 minutos). A partir de este punto empezaremos con el bloqueo con PBS gelatina, FBS 5% y tritón 0.05% durante 30 minutos. Después de lavar con PBS 1x + tritón 0,05% (2 veces, 5 minutos) se incuba durante 90 minutos el anticuerpo primario con PBS gelatina, FBS 5% y tritón 0.05%. Para revelar la muestra una vez lavada con PBS 1x + tritón 0.05% (2 veces, 5 minutos) se usa un anticuerpo secundario que normalmente usaremos unido a un fluorocromo como los Alexa en sus diferentes variedades (488nm, 594nm, etc.). Este anticuerpo fluorescente se incuba en una solución de PBS gelatina, FBS 5% y tritón 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizan dos lavados de 5 minutos con PBS 1x + tritón 0.05% y dos lavados con PBS 1x de 10 minutos.

En este punto podemos guardar la muestra en frío con PBS 1x + azida 0.02%, o hacer una tinción de núcleo en el caso de tener células. Para marcar núcleo se suele realizar una tinción Hoescht (1:200, stock a 200ug/ml) durante 7 minutos protegido de la luz. Pasado este tiempo se realizan lavados con PBS y se conserva la muestra a 4 °C con PBS-Azida 0.02%.

Montaje experimentos *in vitro* con nanofibras

Con los cubres de vidrio tratados según el experimento se deben de dejar secar y se montan las ventanas de parafina con las nanofibras de PLA alineadas. Para ello se usan adhesivos no citotóxicos y placas individuales de 35mm de diámetro. Se orientan las nanofibras según convenga con los coatings inhibitorios y se fijan a la placa y al cubre de vidrio. Esta construcción se esteriliza mediante rayos UV durante 15 minutos. En condiciones de esterilidad situamos una pieza de PDMS rectangular con un agujero donde situaremos las células. Estas se dejan 3 horas en el incubador a 37°C y 5% CO₂ y pasado este tiempo se añade a toda la placa 2 ml de medio completo OECs. A las 12 horas comprobamos que las células estén adheridas y retiramos la pieza de PDMS. Así

conseguimos localizar las células en un lugar determinado y valorar la migración de estas sobre las nanofibras de PLA.

Microscopia y software

Para las fotografías de fluorescencia y de contraste de fase de cada experimento se usa tanto un microscopio invertido (IX71 Olympus, Japan) cómo un microscopio Olympus BX61. En cada caso se usa el programa Cell Sense o el programa Cell[^]P para capturar las imágenes y ajustar las diversas características. Para cuantificar y procesar estas imágenes usamos el software ImageJ (NIH).

RESULTADOS

El condroitin sulfato proteoglicano es un sustrato inhibitorio para las OECs

Las OECs prefieren sustratos permisivos como laminina o SDF1 α a sustratos inhibitorios como el condroitin sulfato proteoglicano (CSPG). En un ensayo de bandas (*stripes assay*), incubamos CSPG (12 μ M) en una zonas y en la otra sustratos permisivos como SDF1 α (100ng/mL) o Laminina (2 μ m/mL). Uno de los sustratos siempre se marca con Alexa 594 0.1% BSA para delimitar la zona del coating con fluorescencia. Después de lavar los coatings la línea celular estable TEG3 se siembra en todo el cubreobjetos y a las 24 horas vemos que sólo se adhieren a los sustratos permisivos como el SDF1 α (Fig5a). Al hacer la cuantificación del número de células en cada combinación de sustratos seguimos viendo esta tendencia, en los sustratos inhibitorios se adhieren muchas menos células. El 11% de las células se sitúan en el sustrato CSPG mientras que el 89% las encontramos en el sustrato permisivo SDF1 α . En cambio, en las bandas con dos sustratos permisivos no vemos diferencias entre bandas (Fig5b; Figura suplementaria 1), sugiriendo que no es efecto del coating fluorescente y validando la repulsión de las OECs en estos sustratos inhibitorios.

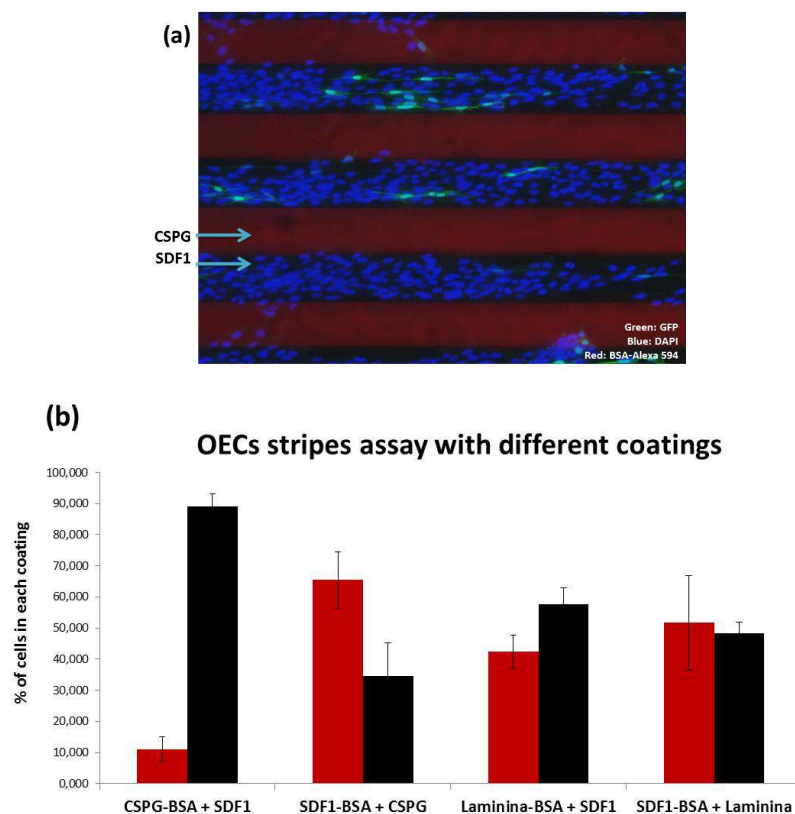


Figura 5: Ensayo de bandas con CSPG (12 μ M + Alexa 594 0.1% BSA) en rojo y SDF1 α en las regiones negras. Los núcleos de las células se han teñido con DAPI, y vemos un pequeño porcentaje de ellas GFP positivas debido a la línea celular (a). Cuantificación del número de células que se sitúa en cada banda según los coating de las moléculas testadas. En rojo las bandas incubadas con el coating y Alexa 594 0.1% BSA, y en negro el resto del coating. Se calcula el porcentaje respecto del total de células (b) en un total de 3 imágenes diferentes para cada condición a 10X (200 micras) en microscopio Olympus bx61.

Las OECs responden a la estimulación con SDF1 α a través del receptor CXCR4

El eje CXCR4/CXCL12 (SDF1) está implicado en migración celular a través de las vías de pAKT y pERK. Mediante la estimulación de TEG3 a varios tiempos con SDF1 intentamos ver si las TEG3 se activan en su presencia a través de las rutas implicadas en migración. Para ello tratamos con SDF1 (100 ng/mL) a varios tiempos (0, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos) en la línea celular TEG3. La fosforilación de AKT ocurre sobre el minuto 5 desde la estimulación con SDF1, es una activación rápida (Fig6a y fig6b). En cambio, pERK aparece fosforilada un poco más tarde, sobre el minuto 10 (Fig6a y fig6c) siguiendo un patrón claro de activación. Por otra parte, aunque el receptor natural de CXCR4 es SDF1, comprobamos mediante inmunocitoquímica que estas células disponen del receptor. Para ello incubamos TEG3 fijadas con paraformaldehído con el anticuerpo primario de CXCR4 y lo revelamos con un secundario fluorescente Alexa 488. Las células tienen marcada parte de la membrana, que es dónde se sitúa el receptor (Fig6d) sólo en aquellas muestras que se añade el anticuerpo primario. En las muestras con sólo anticuerpo secundario no encontramos marca alguna (Fig6e), por lo que podemos determinar la existencia de CXCR4 en la membrana plasmática de las TEG3.

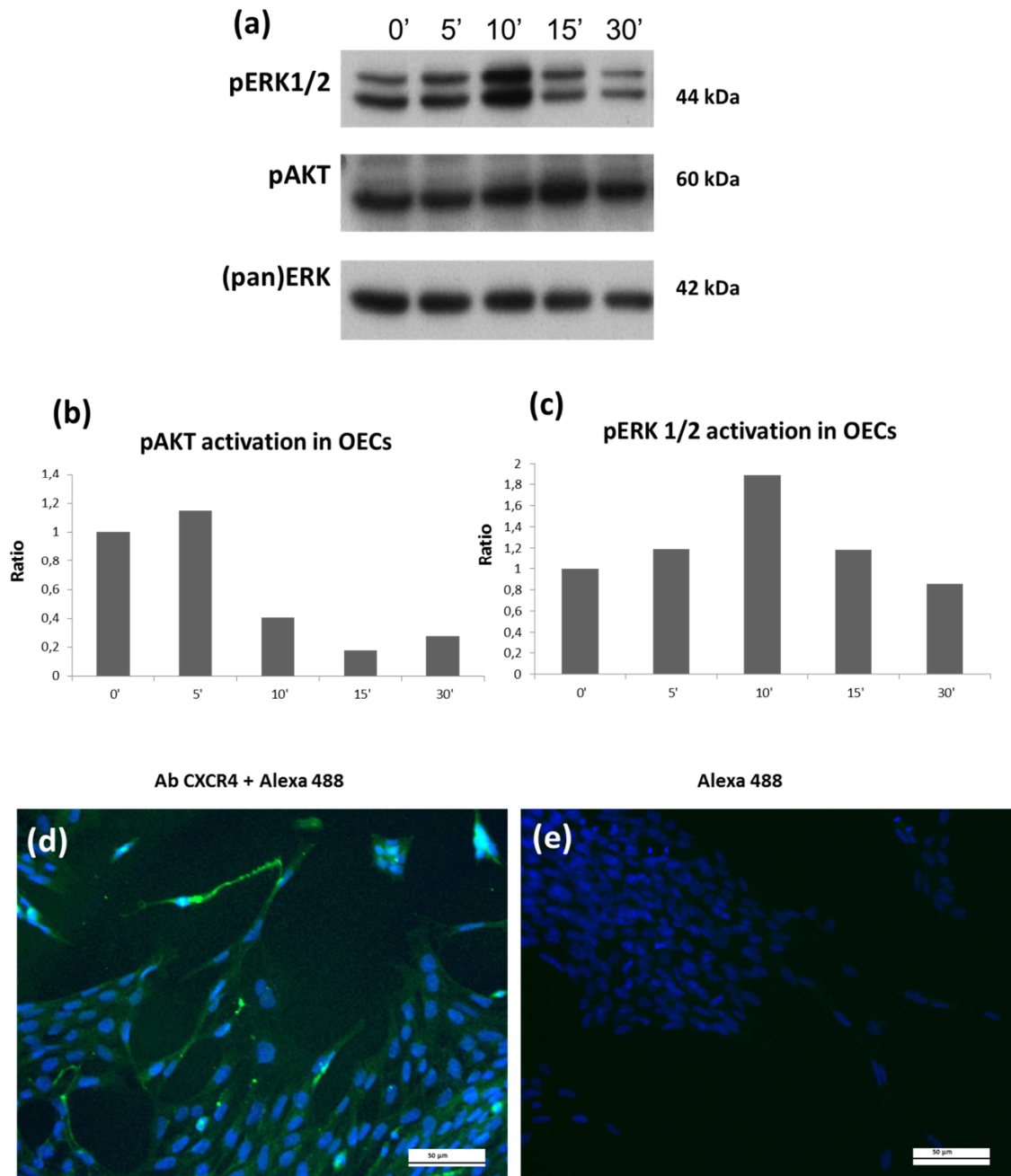


Figura 6: Estudio del eje CXCR4/CXCL12 en TEG3 mediante activación de la vía y expresión y detección del receptor. Para determinar la activación de la vía se lisan las células estimuladas y se analizan pAKT y pERK por Western Blot (a). Mediante un control de carga se hace la ratio y observamos activación a los pocos minutos de pAKT (b) y a los 10 y 60 minutos se observan dos picos de pERK (c). La existencia de CXCR4 en la membrana de las TEG3 se detecta mediante inmunocitoquímica con el receptor primario de CXCR4 y un secundario fluorescente Alexa 488 (d), que no marca en ausencia de primario (e). Magnificación 10x (200 μ m) en Olympus bx61.

Las nanofibras de PLA se pueden funcionalizar con SDF1 α

Las nanofibras de PLA D80/L20 se obtienen mediante electrospinning en colaboración con el grupo de Engel E. (*Institute for Bioengineering of Catalonia, Barcelona*), quienes además funcionalizan las nanofibras de PLA según sus protocolos. Para conseguir alinear las fibras se usa un colector rotatorio (Fig7b) sobre el cual se coloca una ventana de parafina, consiguiendo un soporte y las nanofibras se alinean en este espacio vacío y conseguir sólo funcionalizar las fibras. Las nanofibras que se obtienen tienen un calibre aproximado de 700 nm (Fig7b). La funcionalización se consigue sumergiendo la ventana con las nanofibras en una serie de soluciones activadoras, y por último en una solución con SDF1 α durante un tiempo determinado (*dip-coating*), consiguiendo así la conjugación de la molécula al PLA (c). Primero comprobamos que las fibras están correctamente funcionalizadas para así validar el protocolo. Para ello se incuban con un anticuerpo primario específico para SDF1 α y se revelan con un secundario fluorescente Alexa 488. Para testar que realmente no es un artefacto y la nanofibra contiene SDF1 α , se prueban nanofibras funcionalizadas y sin funcionalizar, y el anticuerpo secundario Alexa 488 sólo. Como vemos en la figura 7d, sólo aquellas nanofibras funcionalizadas se marcan con color verde, con lo que podemos confirmar que las nanofibras se funcionalizan con SDF1 α siguiendo este protocolo.

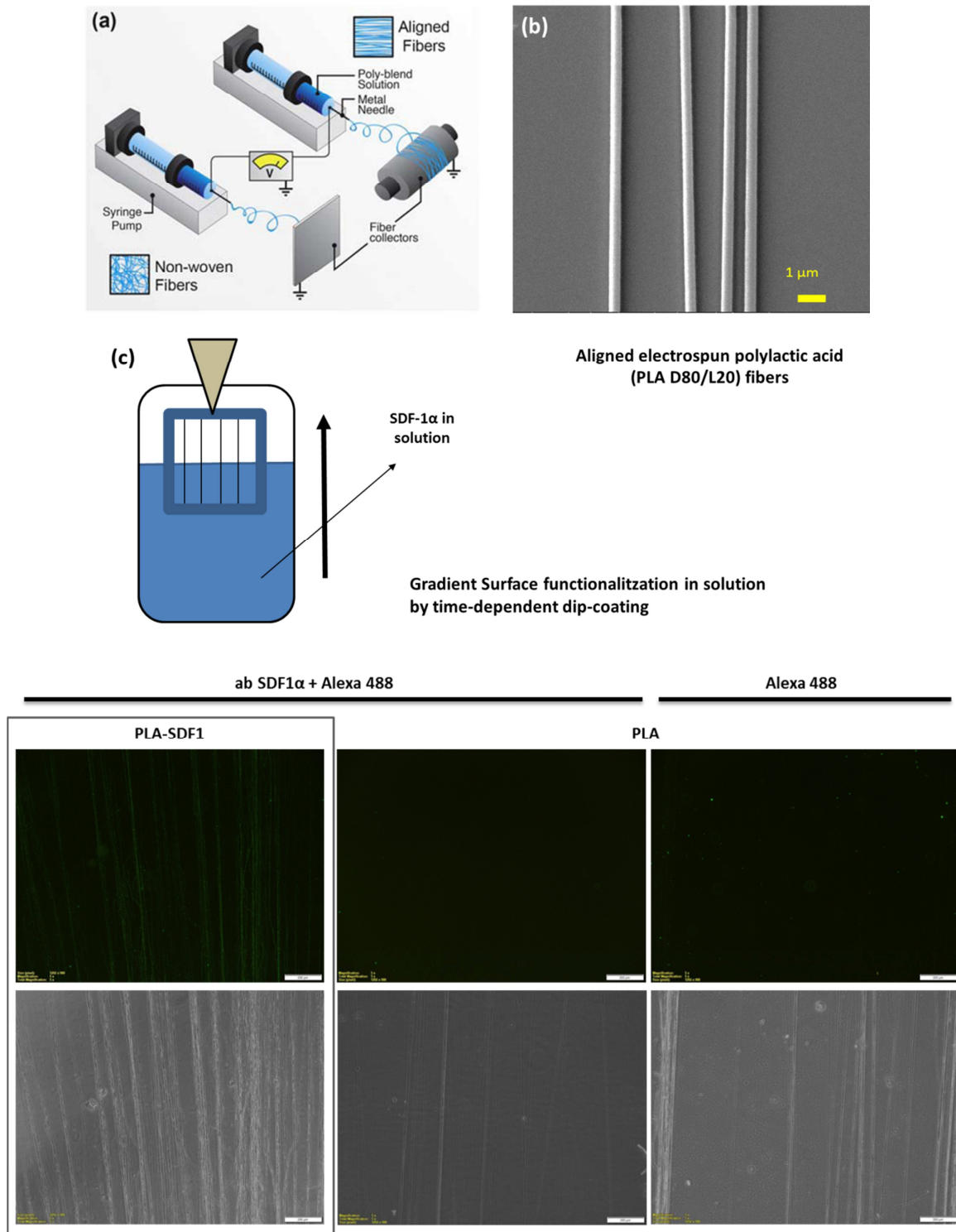


Figura 7: Las nanofibras de 700 nm se obtienen mediante electrospinning (a) y se colectan en un colector rotatorio para conseguir que estén alineadas (b). Para funcionalizarlas con SDF1 α se sumerge la ventana de parafina con las nanofibras en una solución con SDF1 α durante un tiempo determinado (c). Mediante una inmunotinción específica de SDF1 α comprobamos que realmente estén

funcionalizadas y no se deba a un artefacto (autofluorescencia, unión inespecífica del anticuerpo secundario, etc.) (d). Magnificación de 10x (200 μm) en Olympus inverted.

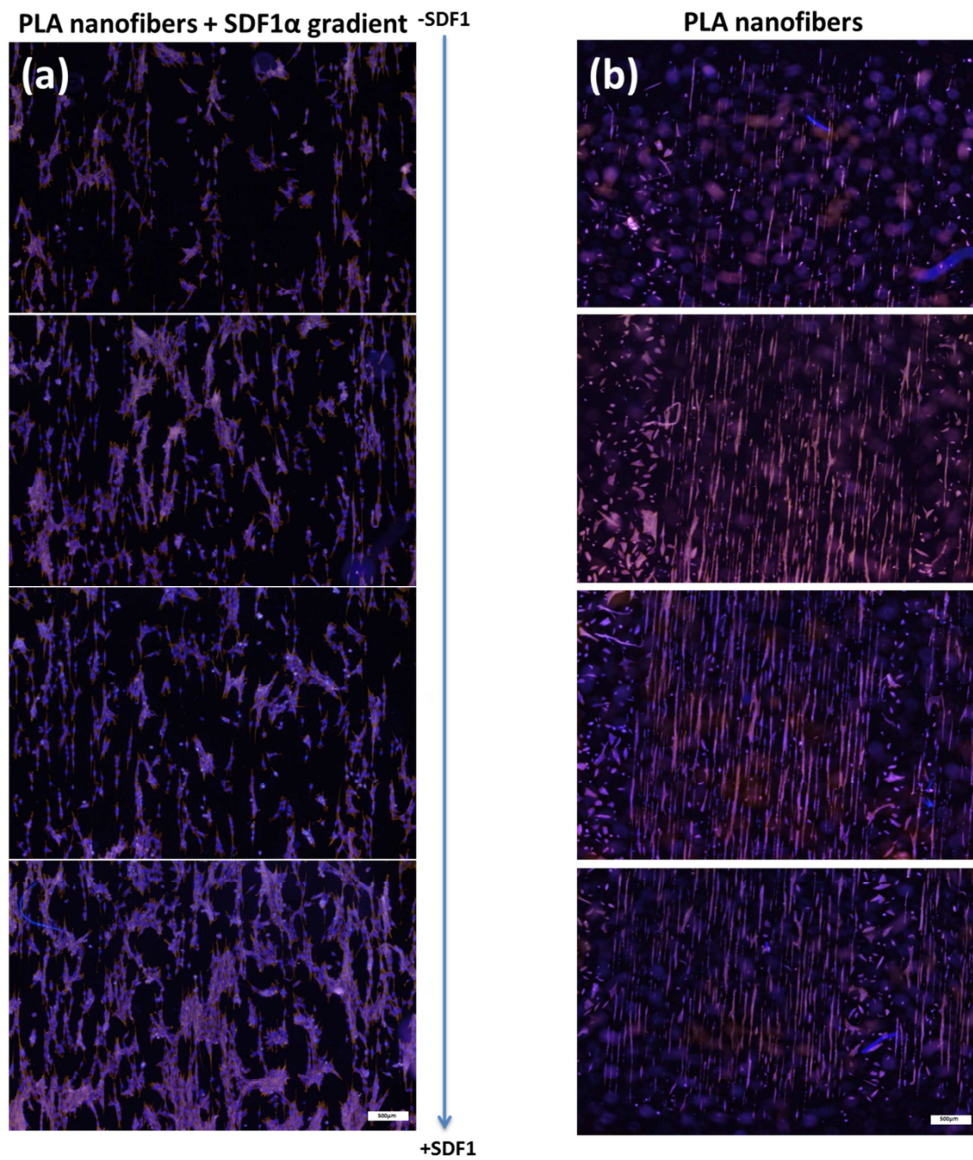
En otras investigaciones realizadas por el grupo se obtuvo que los diámetros adecuados para la migración de las OECs eran entre 900 y 1000 nm (no se muestra). Estas investigaciones fueron realizadas por Diego Reginensis y Òscar Castaño.

Las nanofibras de PLA funcionalizadas con SDF1 α ayudan en la migración de las OECs

Una vez sabemos que las nanofibras se funcionalizan correctamente y que las TEG3 se activan ante el estímulo con SDF1 α , comprobaremos si la funcionalización ayuda a la migración de las OECs. Para ello se hizo un ensayo preliminar en el que se enganchaban nanofibras sobre cubres de vidrio previamente tratados. Sobre estos cubres con las nanofibras se hacia la funcionalización por dip-coating en gradiente, sumergiendo un poco cada un tiempo determinado. En otros cubres control no se hacia la funcionalización. Después de esterilizar las nanofibras y el cubre mediante UV se sembraban 200.000 células y se dejaban enganchar durante 48 horas y se determinaba la preferencia de las mismas. En la Figura 8a se ve cómo a medida que aumenta la cantidad de SDF1 α en el gradiente hay más células enganchadas, mientras que en el cubre con PLA sin funcionalizar no se observa esta distribución siguiendo el gradiente (Fig8b).

Para tener la seguridad de que la funcionalización de sólo las nanofibras ayuda en la migración se crearon las ventanas de parafina con nanofibras funcionalizadas hasta el mitad y el resto no se funcionaliza, con lo que tenemos control negativo en la misma muestra. Situamos una pieza de PDMS para localizar las células en esta mitad y una vez unidas se dejan migrar durante 4 y 6 días. Pasados estos días se fijan las células y se tiñen para comprobar que están encima de las nanofibras (rodamina al 0.01%). Cómo se aprecia en la imagen (Fig8c) migran desde el frente de avance por encima de las nanofibras, que además de constituir un soporte físico, actúan como una guía migratoria. Además, en la parte funcionalizadas las TEG3 llegan más lejos que las que no están funcionalizadas (Fig8c). Para basarse en unos resultados más sólidos cuantificamos muestras a los 4 y 6 días y analizamos la distancia de migración de cada condición respecto al frente de avance. Las nanofibras por si solas ya consiguen buenas

tasas de migración a los 6 días ($2077,55 \mu\text{m} \pm 89,5$), pero las funcionalizadas promueven la migración de las OECs de manera significativa a partir del día 6 ($3022,889 \mu\text{m} \pm 121,74$), mientras que en el día 4 no se observan cambios significativos (Fig8d).



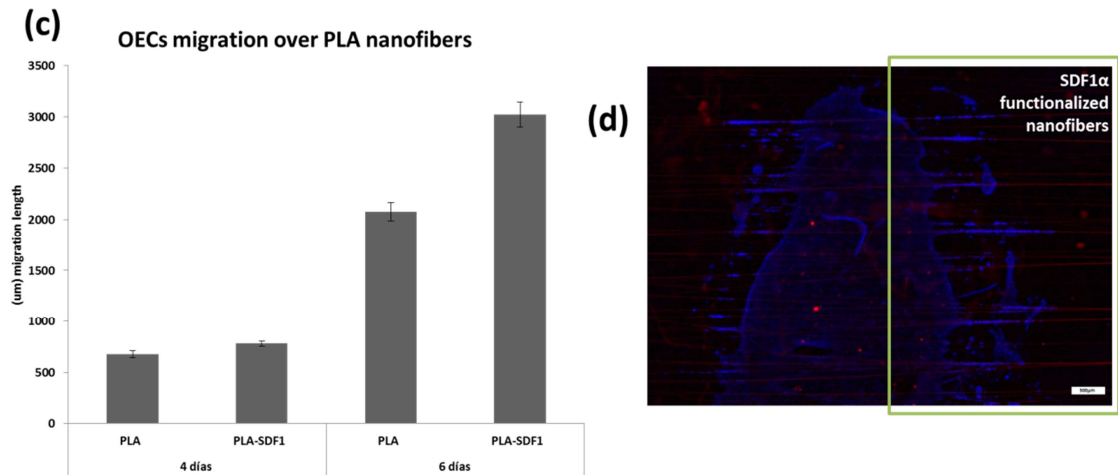


Figura 8: La funcionalización de las nanofibras aumenta la migración de las TEG3 tanto cuando se funcionaliza en gradiente estando sobre un cubre (a, b) como cuando se funcionalizan sólo las nanofibras en una ventana (c, d). En este último caso la migración aumento a partir del sexto día ($3022,889 \mu\text{m} \pm 121,74$) con respecto al control interno sin funcionalizar ($2077,55 \mu\text{m} \pm 89,5$). Magnificación 4x ($500 \mu\text{m}$).

DISCUSIÓN

En las lesiones de médulas espinal se sigue un patrón más o menos establecido, en el que los inhibidores secretados en la cicatriz meningo-glial inhiben el crecimiento de nuevos axones. Estos inhibidores, están bien establecidos, y actualmente hay varios modelos *in vitro* para estudiar sus efectos en el crecimiento de las neuritas. El papel que juegan las células envoltentes del bulbo olfatorio (OECs) está bien estudiado dentro de estos modelos, si bien es verdad, falta muchos estudios sobre estas células. En el presente trabajo valoraremos una nueva estrategia para la implantación de estas células en la lesión de médula espinal. En primer paso es definir el comportamiento de dichas células respecto a los sustratos inhibitorios y la molécula que hemos considerado como idónea en nuestra estrategia. Para ello, hacemos un ensayo de bandas, dónde confrontamos los diferentes sustratos inhibitorios (CSPG) o no (SDF1 α y laminina). Las OECs tienden eludir los sustratos inhibitorios y no tienen preferencia entre el sustrato preferencial por excelencia (laminina) o el sustrato escogido para la estrategia (SDF1 α). Esto podría ser una de las causas de la baja eficiencia de los trasplantes de OECS en lesiones medulares, por ello, necesitamos establecer una guía migratoria para que las OECs puedan travesar estos sustratos inhibitorios en una dirección concreta y buscada, acompañando así a los axones y estableciendo estos conductos que los ayudan a regenerar.

Muchas son las estrategias en materia de scaffolds e hidrogeles que se están estudiando en las lesiones de médula, aunque ninguna de ellas supone un soporte guía mejor que las nanofibras de materiales biodegradables para las OECs. De hecho, las OECs prefieren estar sobre nanofibras de PLA que sobre un sustrato plano. Aunque sabemos que las OECs migran bien sobre nanofibras, debemos de tener en cuenta que siguen siendo polímeros biodegradables no naturales, y que no son del todo propicios para la migración celular. Es por ello, que la biofuncionalización en superficie de las nanofibras con moléculas bioactivas puede suponer una mejora significativa.

En nuestra estrategia usamos el SDF1 α para la funcionalización, ya que se conoce por estudios previos que señala en células de la glía y en las OECs. Teniendo esto en cuenta, comprobamos que la línea células TEG3 expresaba el receptor CXCR4 y que

estas eran capaces de responder a la quimioquina a través de la fosforilación de ERK1/2 y de AKT al cabo de un tiempo. La biofuncionalización de las nanofibras se hace siguiendo el protocolo establecido por Mateos-Timoneda et al para unir proteínas a la superficie de nanofibras de PLA. Aunque este protocolo se estableció inicialmente para otras proteínas, el SDF1 α se engancha correctamente a las nanofibras, por lo que este protocolo es válido en la biofuncionalización con SDF1 α .

Teniendo esta herramienta, el siguiente paso es determinar la longitud de las OECs sobre nanofibras funcionalizadas o sin funcionalizar. En un primer momento se hacía el electrospinning directamente sobre cubreobjetos, y la funcionalización afectaba a las nanofibras y al vidrio. Aun así ya se pudo determinar la preferencia de las OECs a los sitios donde había mayor SDF1 α en el PLA. Pero en una lesión real, implantaríamos las nanofibras funcionalizadas sin el vidrio, así que usando unas ventanas se hizo el mismo experimento y obtuvimos mayores tasas de migración en las nanofibras funcionalizadas a partir del día 6, con unas distancias de hasta 3mm. Aunque los resultados son prometedores, hay la necesidad tanto de hacer más réplicas de estos experimentos, como de dejar más tiempo las OECs sobre nanofibras, para determinar si migran mayores distancias, ya que en lesiones reales la distancia a regenerar puede ser mayor. Por otra parte, este experimento también debería de probarse en un ambiente inhibitorio para ver si realmente migran más sobre estos ambientes inhibitorios y no tienen afectación de las OECs sobre las nanofibras.

Aunque los resultados que varios investigadores obtienen son positivos, sigue haciéndose necesaria más investigación hasta lograr alcanzar la recuperación funcional de una lesión de médula espinal. Para ello un buen planteamiento es usar las estrategias ya conocidas e implementándolas. En nuestro trabajo hemos mencionado la existencia de una línea que expresa el ectodominio de NgR, que hace de antagonista de los inhibidores regeneración neural en SCI, propiciando un ambiente menos inhibitorio. Si combinamos la funcionalización de nanofibras como guía para estas células modificadas, podríamos obtener mejores resultados. Otras variables implicarían el uso de factores neurotróficos o enzimas que mejoren estos ambientes inhibitorios. Por todo ello se hace necesario seguir investigando y combinando terapias, para estar un paso más cerca de la recuperación funcional en SCI.

CONCLUSIONES

En un modelo *in vitro* simple de cicatriz glial, donde el entorno es muy inhibitorio debido a las diferentes moléculas que lo componen como el CSPG o los derivados de mielina inhibitorios, el ensayo de *stripes* reproduce la repulsión del CSPG en la línea celular estable TEG3. Como molécula candidata a la quimioatracción de TEG3 probamos SDF1 α en varios tiempos y en TEG3 se activa la vía por pAKT y pERK, además comprobamos mediante inmunocitoquímica que las TEG3 expresan el receptor CXCR4. Con SDF1 α en solución se pueden funcionalizar las nanofibras de PLA de manera satisfactoria. Las nanofibras funcionalizadas con SDF1 α mejoran la migración de las TEG3 comparado con nanofibras sin funcionalizar, y constituyen una ruta migratoria para TEG3. Las nanofibras de PLA funcionalizadas con moléculas quimioatrayentes pueden ser una ruta migratoria a través de sustratos inhibitorios para OECs en un modelo preliminar *in vitro* de SCI.

BIBLIOGRAFIA

Abeyasinghe HCS, Phillips EL, Chin-Cheng H, Beart PM and Roulston CL. Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. *International Journal of Molecular Science*. 2016; 17(3): 288; doi:10.3390/ijms17030288

Alexander JK. and Popovich PG. Neuroinflammation in spinal cord injury: therapeutic targets for neuroprotection and regeneration. *Progress in brain research*. 2009; 175: 125-137.

Baji A, Mai YW, Wongc SC, Abtahi M and Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Review. Composites Science and Technology*. 2010; 70: 703–718

Balentine JD. and Spector M. Calcification of axons in experimental spinal cord trauma. *Annals of neurology*. 1997; 2: 520-523

Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M and Parada LF. Ephrin-B3 is a myelin based inhibitor of neurite outgrowth. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America*. 2005; 102: 10694-10699

Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW and McMahon SB. Chondroitinase ABC promote functional recovery after spinal cord injury. *Nature*. 2002; 416: 636-640.

Bruck W, Bruck Y, MaruschakB and Friede RL. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta neuropathological*. 1995; 89: 363-367

Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfield T, Svendsen CN, Mucke L, Johnsons MH and Sofroniew MV. Leuckocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999; 23: 297-308

Caballero SN. Fisiopatología de la lesión medular. *Revisión literaria. Vet Mex*. 2005; 36(1): 75-87

Cafferty WB, Duffy P, Huebner E and Strittmatter SM. MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010; 30: 6825-6837

Carbonetto S, Evans D and Cochard P. Nerve fiber growth in culture on tissue substrata from central and peripheral nervous systems. *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1987; 7: 610-620

Carulli D, Laabs T, Geller HM and Fawcett JW. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Current opinion in neurobiology*. 2005; 15: 116-120

Cregg JM, DEPaul MA, Filous AR, Lang BT and Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology*. 2014; 253: 197-207

Dusart I and Schwab ME. Secondary cell death and the inflammation reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *The European journal of neuroscience*. 1994; 6: 712-724

Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nature reviews neuroscience*. 2003; 4: 703-713

Fitch MT and Silver J. CNS injury glial scars and inflammation: inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology*. 2008; 209: 294-301

Franssen EH, de Bree FM and Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain research reviews*. 2007; 56: 236-258

Galtrey CM and Fawcett JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain research reviews*. 2007; 54: 1-18

Goodman MN, Silver J and Jacobberger JW. Establishment and neurite outgrowth properties of neonatal and adult olfactory bulb glial cell lines. *Brain Res.* 1993; 619: 199-213

Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O and Frisen J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science.* 2011; 333: 238-242

Hagino S, Iseki K, Mori T, Zhang Y, Hikake T, Yokoya S, Takeuchi M, Hasimoto H, Kikuchi S and Wanaka A. Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia.* 2003; 42: 130-138

Harunaga A and Yamada KM. Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology.* 2011; 30: 363-368

Harvey A and Plant G. Olfactory ensheathing glia and spinal cord injury: basic mechanism to transplantation. *Future Neurol.* 2006; 1: 453-463

Hill CE, Beattie MS and Bresnahan JC. Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Experimental neurology.* 2001; 171: 153-169

Huang ZH, Wang Y, Su ZD, Geng JG, Chen YZ, Yuan XB and He C. Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay. *Cell research.* 2008; 18: 479-490

Hyun JK and Kim HW. Clinical and experimental advances in regeneration of spinal cord injury. *Journal of tissue engineering.* 2010;

James ND, Bartus K, Grist J, Bennett DL, McMahon SB and Bradbury EJ. Conduction failure following spinal cord injury: functional and anatomical changes from acute to chronic stages. *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2011; 31: 18543-18555

Kruger RP, Aurandt J and Guan KL. Semaphorins command cells to move. *Nature reviews Molecular and Cellular biology.* 2005; 6: 789-800

Kucia M, Jankowski K, Reca R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol.* 2004; 35(3): 233-45.

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

Lai Wing Sun K, Correia JP and Kennedy TE. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development.* 2011; 138: 2153-2169

Lee JK, Geoffroy CG, Chan AF, Tolentino KE, Crawford MJ, Leal MA, Kang B and Zheng B. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron.* 2010; 66: 663-670

Li Y, Field PM, and Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science.* 1997; 277: 2000-2002

Li Y, Li D, and 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'. *Journal of neurocytology.* 2005; 34: 343-351

Lipson AC, Widenfalk J, Lindqvist E, Ebendal T and Olson L. Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Experimental neurology.* 2003; 180: 167-171

Lopez-Vales R, Fores J, Navarro X and Verdu E. Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiology of disease.* 2006; 24: 443-454

Lotan M, Salomon A, Ben-Bassat Sand Schwartz M. Cytokines modulate the inflammatory response and change permissiveness to neuronal adhesion in injured mammalian central nervous system. *Experimental neurology.* 1994; 126: 284-290

Low K, Culberston M, Bradke F, Tessier-Lavigne M and Tuszynski MH. Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2008; 28: 1099-1108

Mar FM, Bonni A and Sousa MM. Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO reports*. 2014; 15: 254-263

Martinez A and Soriano E. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain research reviews*. 2005; 49: 211-226

Mateos-Timoneda MA, Castaño O, Planell JA and Engel E. Effect of structure, topography and chemistry on fibroblast adhesion and morphology. *J Mater Sci: Mater Med*. 2014; 25: 1781–1787

Mikami T and Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica and biophysica acta*. 2013; 1830: 4719-4733

Moreno-Flores MT, Boloventa P and Nieto-Sampedro M. Polymorphonuclear leukocytes in brain parenchyma after injury and their interactions with purified astrocytes in culture. *Glia*. 1993; 7: 146-157

Moreno-Flores MT, Lim F, Martín-Bermejo MJ, Díaz-Nido J, Ávila J, Wandosell F. Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. *Journal of Neurochemistry*. 2003; 85: 861-871

Pekny M, Wilhelmsson U and Pekna M. The dual role of astrocytes activation and reactive gliosis. *Neuroscience letters*. 2014; 565: 30-38

Raisman G. Olfactory ensheathing cells-another miracle cure for spinal cord injury? *Nat. Rev. Neurosci*. 2001; 2: 369-375

Ramón-Cueto A and Ávila J. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res. Bull*. 1998; 46: 175-187

Reginensi D, Carulla P, Nocentini S, Seira O, Serra-Picamal X, Torres-Espín A, Gavín R, Moreno-Torres M, Wandosell F, Samitier J et al. Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord. *Cellular and Molecular Life Science*. 2015; 72(14): 2719-37

Reier PJ, Perlow MJ and Guth L. Development of embryonic spinal cord transplants in the rat. *Brain research*. 1983; 312: 201-219

Rodríguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM and Waterman-Storer CM. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature cell biology*. 2003; 5: 599-609

Roet KC and Verhaagen J. Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheathing cell. *Experimental neurology*. 2014

Rubio MP, Munoz-Quiles C and Ramón –Cueto A. Adult olfactory ensheathing glia for cell therapy. *Glia*. 2008; 56: 539-551

Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A and Logan A. Myelin, reactive glia and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*. 2004; 46: 225-251

Schwab JM, Bernard F, Moreau-Fauvarque C and Chedotal A. Injury reactive myelin/oligodendrocyte-derived axon growth inhibition in the adult mammalian central nervous system. *Brain research reviews*. 2005; 49: 295-299

Selzer ME. Promotion of axonal regeneration in the injured CNS. *Lancet neurology*. 2003; 2: 157-166

Shearer MC, Niclou SP, Brown D, Asher RA, Holtmaat AJ, Levine JM, Verhaagen J and Fawcett JW. The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signaling pathways. *Molecular and cellular neuroscience*. 2003; 24: 913-925

Shi J, Wang L, Zhang F, Li H, Lei L, Liu L, and Chen Y. Incorporating protein gradient into electrospun nanofibers as scaffolds for tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2010; 2: 1025

Shoichet MS, Tate CC, Baumann MD, et al. Strategies for Regeneration and Repair in the Injured Central Nervous System. In: Reichert WM, editor. *Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2008. Chapter 8.

Silver J and Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews neuroscience*. 2004; 5: 146-156

Tator CH and Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery*. 1991; 75: 15-26

Teicher BA and Fricker SP CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 2927-2931

Teo WE and Ramakrishna S. A Review on Electrospinning Design and Nanofiber Assemblies. *Nanotechnology*. 2006; 17

Thuret S, Lawrence DFM, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature neuroscience reviews*. 2006; 7: 628-643

Tisay KT and Key B. The extracellular matrix modulates neurite outgrowth on ensheating cells. *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999; 19: 9890-9899

Volpi N and Tarugi P. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu^{2+} -mediated oxidation of human low-density lipoproteins: effects of normal human plasma-derived chondroitin sulfate. *Journal of biochemistry*. 1999; 125: 297-304

Windus LC, Claxton C, Allen CL, Key B, St John JA. Motile membrane protrusions regulate cell-cell adhesion and migration of olfactory ensheathing glia. *Glia*. 2007; 55: 1708-1719

Yan P, Li Q, Kim GM, Xu J, Hsu CY and Xu XM. Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *Journal of neurotrauma*. 2001; 18: 563-568

ANEXO

Figura suplementaria 1: stripes assay

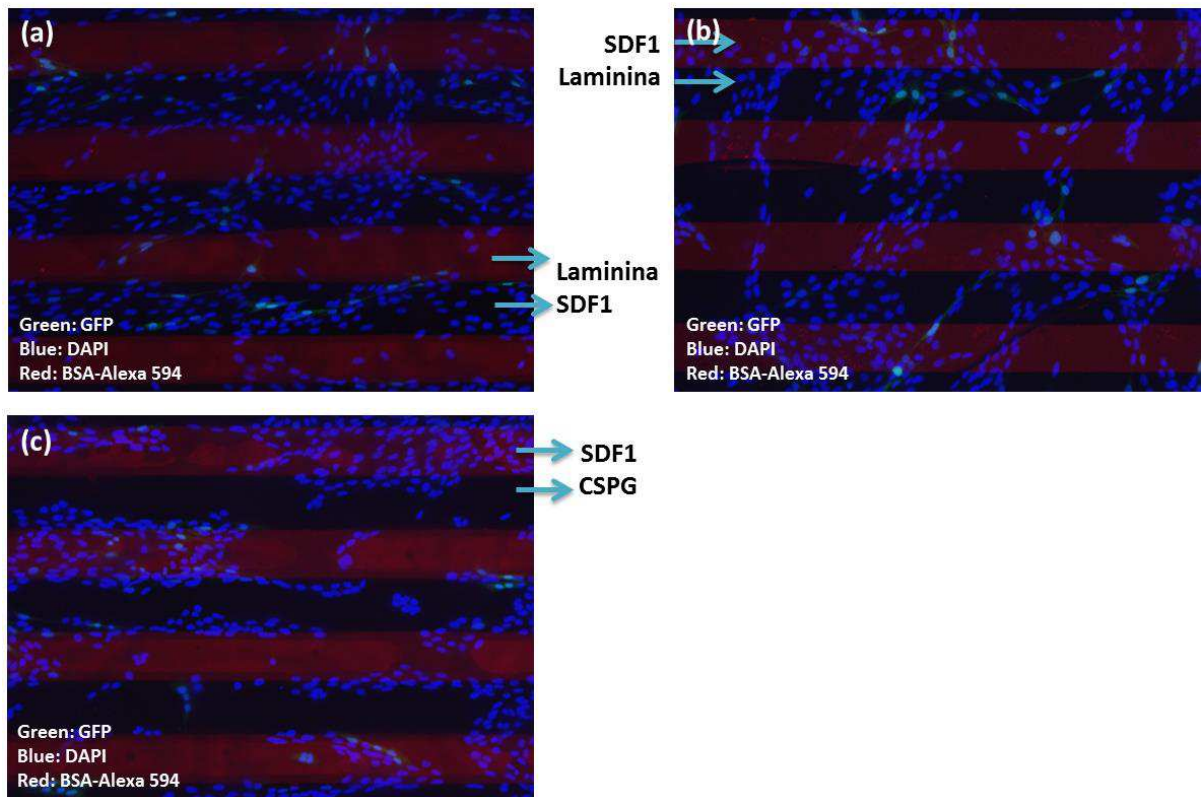


Figura suplementaria 1: Ensayo de bandas con la línea celular TEG3. Coatings en rojo con Alexa 594 0.1% BSA más la molécula correspondiente. En ay b se prueban dos coating permisivos, y en c se prueba un coating permisivo contra uno inhibitorio.