



ARTÍCULO

Mecanismos de Proyección Axonal Durante el Desarrollo Embionario, Lecciones importantes para la Neuroregeneración y el desarrollo de Biomateriales

Mechanisms of Axonal Projection during Development, Important lessons for Neuroregeneration and Biomaterials Fields

Elisa H. Tamariz Domínguez.

RESUMEN

La formación de redes neuronales se da principalmente durante el desarrollo embrionario, en esta etapa los axones en crecimiento siguen numerosas señales que los guían hasta llegar a su blanco o sitio de inervación. Estas señales guía son de diversos tipos y su expresión es modulada de manera que en el adulto pueden desaparecer o expresarse en sitios diferentes en comparación con el tejido embrionario. Durante el proceso de regeneración del sistema nervioso en adultos también existe una fina regulación de la expresión de señales guía, influyendo de manera positiva o negativa en la adecuada regeneración del tejido dañado. En la presente revisión se abordan los diferentes tipos de señales guía y su papel durante el desarrollo embrionario, resaltando la importancia de conocer su función durante el establecimiento de las redes neuronales, para comprender su posible papel durante la reparación del sistema nervioso, y su utilidad para mejorar los procesos de regeneración; particularmente en terapias de sustitución neuronal o en el desarrollo de biomateriales para aplicaciones biomédicas.

Palabras Clave: Proyección neuronal, moléculas guía, neuroregeneración, biomateriales.

ABSTRACT

During development neural axons navigate to reach their target and to wire the nervous system. Several guidance cues are involved in the correct innervation and in the targeting of the axons. Guidance cues can be up or down regulated in the adult tissue as compared with the embryonic tissue, or can be expressed in different locations than during development. During regeneration of the adult nervous system exists a fine regulation of guidance cues, influencing in a positive or negative way the regeneration process of the damaged tissue. In this review the different kind of guidance cues present during the embryonic development are summarized, focusing on their role of wiring the nervous system; besides, it will be discussed the importance to understand some aspects of the adult neural tissue regeneration, particularly to enhance regeneration through neuronal replacement therapies and to develop materials for medical applications.

Key words: Neuronal projection, guidance cues, neuroregeneration, biomaterials

INTRODUCCIÓN

La compleja estructura del sistema nervioso central se forma durante el desarrollo embrionario con la proyección axonal de neuronas que pueden localizarse cercanas al sitio de innervación, o a gran distancia de este. La precisión de este proceso es fundamental para el correcto funcionamiento del cerebro y es regulado por diversas señales guía que se localizan a lo largo de los sitios por donde proyectaran los axones. Una vez que los axones llegan a su sitio blanco, cesa la proyección y se forman las arborizaciones y contactos sinápticos que pueden ser posteriormente refinados y modulados por procesos de plasticidad neuronal. Tras un daño o lesión, la regeneración del sistema nervioso central conlleva también a la proyección de axones para restablecer los fascículos o vías neuronales perdidas; sin embargo estos procesos no son tan eficientes como los observados durante el desarrollo. Muchas de las alternativas planteadas para promover la regeneración neuronal provienen del conocimiento generado a partir del estudio de la formación de vías neuronales en embriones de diversos modelos animales; por lo que el emular el ambiente embrionario ha mostrado ser una alternativa para promover la regeneración neuronal en el tejido adulto. En la presente revisión se abordan los mecanismos celulares y moleculares que determinan la proyección neuronal, y posteriormente se hace un recuento de las principales señales que convergen en los axones y que inhiben o estimulan su proyección durante el desarrollo embrionario. Finalmente, se ejemplifica como la aplicación del conocimiento obtenido en embriones ha permitido desarrollar estrategias para tratar de inducir una regeneración más eficiente en el sistema nervioso central adulto, particularmente desde la perspectiva del desarrollo de biomateriales que funcionen como andamios y que emulen el ambiente embrionario.

Mecanismos celulares de la proyección axonal

Para comprender de qué manera actúan las señales guía sobre las neuronas en proyección, es de suma importancia conocer los mecanismos celulares que promueven tanto la proyección como la retracción de axones. El cono de crecimiento es una estructura localizada al final del axón y se caracteriza por ser altamente dinámica y capaz de recibir las señales del ambiente implicadas en el avance, retroceso, o cambio de dirección del axón. La motilidad de esta estructura depende primariamente de la regulación del citoesqueleto, formado fundamentalmente por filamentos de actina y microtúbulos⁽¹⁾. En este apartado mencionaremos de manera somera la estructura del cono de crecimiento y los mecanismos generales que modula su comportamiento a nivel del citoesqueleto, ya que la compleja regulación de su movimiento, particularmente a este nivel, abarca por sí mismo un tema extenso al cual se han avocado

numerosas revisiones.

El cono de crecimiento, originalmente descrito por Santiago Ramón y Cajal⁽²⁾, se localiza en la parte más externa de la neurita o prolongación neuronal, tiene una región periférica constituida por lamelipodos o delgadas extensiones membranales, y por filopodos o pequeñas espículas que sobresalen de los lamelipodos (Fig. 1A). Cada una de estas regiones tiene una distribución característica de filamentos de actina y microtúbulos. En los lamelipodos se encuentran numerosas fibras cortas de actina que forman una red, y en ocasiones se encuentran también microtúbulos; mientras que en los filopodos se encuentran generalmente fibras de actina. La parte central del cono de crecimiento está formado principalmente por microtúbulos y se caracteriza por la presencia de gran cantidad de organelos celulares. En la zona de transición, que se localiza entre la zona central y periférica, se encuentra la parte más distal de los microtúbulos en interacción con las fibras de actina de la zona periférica^(1, 3) (Fig. 1A, B).

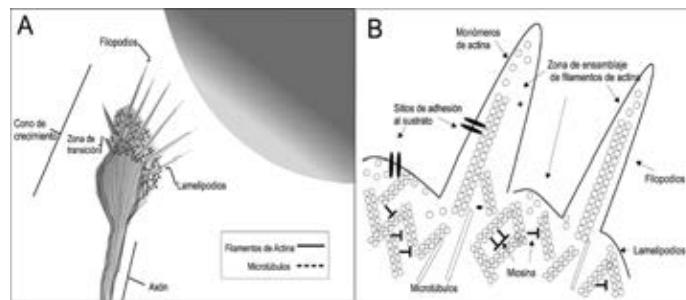


Figura 1. (A) Esquema que representa la parte terminal de una neurona donde se aprecia un fragmento del axón y el cono de crecimiento con sus estructuras características, y la distribución de las dos principales proteínas del citoesqueleto. (B) Amplificación de la zona de los lamelipodos y filopodos donde se representa la distribución y orientación de los filamentos de actina y los microtúbulos. Los monómeros de actina son añadidos en los extremos positivos de los filamentos que se orientan hacia la parte externa de filopodos y de lamelipodos. Otras proteínas involucradas en el movimiento del cono de crecimiento y la respuesta a señales guía son la miosina tipo II que interactúan con los filamentos de actina, y los receptores transmembranales que forman sitios de adhesión al sustrato.

La proyección de las prolongaciones neuronales o neuritas comprende tres pasos principales que se suceden de manera continua y ordenada: 1) El avance de la zona periférica del cono de crecimiento, 2) el "llenado" de la zona periférica con organelos adquiriendo la característica de zona central, 3) La consolidación, mediante la "invasión" del citoesqueleto en la zona central, y la constreñimiento y formación de una estructura cilíndrica que formará el nuevo segmento del axón⁽⁴⁾. Cuando no existe movimiento de las neuritas se dice que el cono de crecimiento está en un estado estático-dinámico en donde hay una exploración continua del medio y los lamelipodos y filopodos están en constante extensión-retracción.

La activación de receptores membranales por señales guía converge en la modulación del citoesqueleto a través de diversas vías de transducción de señales. La familia de las

GTPasas pequeñas, y en especial la familia de las GTPasas Ras y Rho tiene un papel fundamental modulando la polimerización y despolimerización de los filamentos y activando vías de transducción de señales como las de ERK o MAP cinasas^(5, 6).

Tanto los microtúbulos como los filamentos de actina son estructuras polarizadas con un segmento "positivo" y otro "negativo"; en el extremo positivo se añaden los monómeros de actina globular o los heterodímeros de tubulina alfa y beta, y en el extremo menos o negativo existe una constante despolimerización de las subunidades de cada filamento. Los microtúbulos tienen su extremo positivo hacia la zona periférica del cono de crecimiento en donde se asocian con los filamentos de actina, mientras que los filamentos de actina tiene su extremo positivo, también llamado extremo barbado, hacia la parte más externa de los filopodios⁽⁷⁾ (Fig. 1B).

Las señales repelentes pueden causar la disminución en la adición de monómeros de actina y la pérdida o disminución de los filamentos en la zona más externa del cono de crecimiento induciendo su colapso^(8, 9); mientras que señales atrayentes favorecen la adición de nuevos monómeros de actina y el desplazamiento retrogrado de los filamentos por interacción con miosina tipo II, que produce una fuerza que impulsa al cono de crecimiento hacia adelante, a través de la extensión de la membrana celular y la extensión de los filopodios^(3, 8).

La polimerización-despolimeración de los filamentos de actina está regulada por numerosas proteínas accesorias que favorece la formación de los filamentos, como profilina, o proteínas de la familia de Ena/VASP⁽¹⁰⁻¹²⁾, y de proteínas que inducen la despolimerización como gelsolina y cofilina entre muchas otras⁽¹³⁻¹⁵⁾. Finalmente, cabe mencionar que la estabilidad o el avance de los conos de crecimiento no sería posible si no existe un acoplamiento entre el citoesqueleto y el sustrato a través de receptores transmembranales que forman sitios de adhesión, permitiendo que la fuerza generada por la contractilidad del sistema actina-miosina impulse el cono de crecimiento hacia adelante⁽¹⁶⁾. De esta manera la respuesta a moléculas guía también implica necesariamente la regulación de la formación y/o desensamblaje de los sitios de adhesión, que mantienen al cono de crecimiento en estrecho contacto con el sustrato^(17, 18).

Regulación de la proyección axonal por señales guía

Durante la formación de las redes neuronales los axones siguen trayectos específicos que son delimitados mediante señales de naturaleza química y mecánica, y que pueden actuar como señales atrayentes o permisivas, y repelentes o no permisivas^(19, 20). Una señal atrayente induce el crecimiento y atrae a las proyecciones, pero también una señal repelente delimita el sitio por el cual las neuritas deben avanzar contribuyendo a la proyección correcta.

Un ejemplo son las proteínas quimiotrópicas semaforina y slit que delimitan la proyección del fascículo longitudinal medio (FLM), uno de los tractos más prominentes y conservados en los vertebrados, y de los primeros tractos en proyectar a partir de la zona limítrofe entre el mesencéfalo y el diencéfalo embrionario. El FLM es dirigido hacia la zona caudal del embrión extendiéndose como un denso fascículo por la zona ventral del tubo neural; La semaforina 3A y slit tienen un importante papel al restringir la proyección de los fascículos en la zona rostral del embrión, y mantener una proyección caudal, ventral y longitudinal, evitando que los fascículos del FLM crucen la línea media del tubo neural y proyecten contralateralmente de modo aberrante⁽²¹⁾ (Fig. 2). La falta de proyección axonal o la proyección aberrante de los axones puede llevar a fallas en la funcionalidad del sistema nervioso, de manera que las mutaciones o ausencia de algunas de las proteínas implicadas en la guía axonal se han relacionado con patologías como la esquizofrenia, desórdenes bipolares, retardo mental, dislexia, autismo e inhibición de la regeneración del sistema nervioso central⁽²²⁻²⁶⁾.

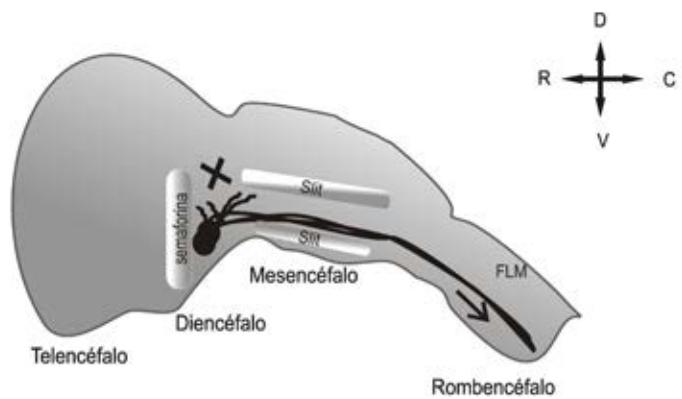


Figura 2. Representación del tubo neural en desarrollo donde se señala el sitio de proyección del fascículo longitudinal medio (FLM) a partir de la zona del pretectum en el diencéfalo. Este tracto longitudinal de proyección caudal está delimitado por la expresión de semaforina 3A que impide su proyección rostral, y por las proteínas slit en la zona dorsal y ventral del tubo neural, ubicando así la proyección del fascículo en la zona ventral del embrión. D, dorsal, V, ventral, R, rostral. (Modificado de Ahsan y cols. 2007).

Moléculas Quimiotrópicas

Las moléculas quimiotrópicas son señales químicas que pueden ser secretadas y difundidas a gran distancia, o estar ancladas a la matriz extracelular o a la membrana de otras células, y se caracterizan por formar gradientes de concentración que determina la dirección de las neuritas⁽²⁰⁾. Experimentos pioneros realizados con explantes del ganglio trigémino mostraron que las neuronas del ganglio son incapaces de proyectar sus axones cuando son cultivadas *in vitro* en una matriz de colágeno, aún con la presencia del factor de crecimiento neural (NGF); sin embargo al estar en presencia del sitio blanco de inervación en el embrión, un explante del arco maxilar, se induce la proyección

de los axones en dirección del explante⁽²⁷⁾. Posteriormente se describió que el arco maxilar tiene efectos atrayentes o repelentes para el ganglio trigémino dependiendo del estadio embrionario del que se obtenga⁽²⁸⁾, mostrando que la regulación espacio-temporal de la expresión de proteínas quimiotrópicas es determinante para la correcta inervación.

Entre las moléculas quimiotrópicas más importantes encontramos a las proteínas netrinas, slits, semaforinas y efrinas.

Las netrinas fueron descubiertas primeramente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* al observar que mutantes de la proteína unc-6, la versión de netrina en este nematodo, presentaba alteraciones en la proyección de los axones que proyectan de la zona dorsal a la ventral⁽²⁹⁾. Posteriormente, también en este nematodo, se identificaron la proteínas transmembranales que fungen como receptores a netrina^(29, 30). Al igual que en el caso de otras moléculas quimiotrópicas, las netrinas y sus receptores presentan homólogos en vertebrados⁽³¹⁻³⁴⁾, lo que destaca la permanencia y conservación de estos sistemas de guía a lo largo de la evolución. Las netrinas son proteínas secretadas y bifuncionales con efectos tanto atrayentes como repelentes; así en presencia del receptor DCC (siglas que corresponden al nombre en inglés deleted in colorectal cancer), el efecto es atrayente, y si interacciona con el receptor Unc 5 o con el heterodímero DCC-Unc5 el efecto es repelente⁽³⁵⁾.

Las proteínas slit son proteínas secretadas de efecto repelente, originalmente se describieron en la mosca *Drosophila melanogaster* durante la guía de las neuronas comisurales que se localizan en la zona dorsal del tubo neural y proyectan hacia la zona ventral para atravesar la línea media ventral o placa del piso, y continuar su proyección en el lado contralateral a su sitio de origen^(36, 37). En esta proyección también están implicadas las netrinas aunque con efectos contrapuestos. Las netrinas atraen los axones favoreciendo el cruce de las neuritas hacia el lado contralateral, mientras que las proteínas slit los repelen induciendo que las neuritas dejen la placa del piso y continúen su proyección en la zona contralateral, o que las que han cruzado no regresen al lado ipsilateral^(38, 39). La proyección de los axones de neuronas comisurales está regulada por un fino control de la expresión de los receptores tanto para netrina como para slit. En el caso de los vertebrados, el receptor a slit conocido como Rig-1 o Robo3, y particularmente la isoforma 3.1, se expresa cuando los axones se aproximan y cruzan la placa del piso. Esta isoforma del receptor interfiere con el efecto repelente de slit mediado por los receptores Robo1 y Robo 2. Posteriormente, al aumentarse la expresión de Robo 1, 2 y la isoforma 3.2, se transduce el efecto repelente y se favorece la salida de los axones de la línea media ventral, evitando así que recrucen la placa del piso. Además se ha reportado la interacción de Robo

con el receptor a netrina DCC, impidiendo la acción atrayente de esta proteína en los axones que han cruzado la línea media⁽³⁹⁻⁴²⁾.

Las semaforinas son también proteínas secretadas con efectos bifuncionales. Originalmente se describieron por su efecto en el colapso de conos de crecimiento de axones de neuronas sensoriales, recibiendo el nombre de colapsinas⁽⁴³⁾, posteriormente se han descrito otros miembros de la familia de las semaforinas, todos ellos caracterizados por poseer un dominio de aproximadamente 500 aminoácidos, denominado dominio sema⁽⁴⁴⁾. Actualmente hay descritas 8 familias de semaforinas entre las que se encuentran las de tipo 1 y 2 en invertebrados, 3-7 en vertebrados y la familia V codificada por virus⁽⁴⁵⁾. Aunque su papel en la guía y regulación de las proyecciones neuronales es la más característica, las semaforinas están implicadas también en otros eventos celulares como la migración y dirección de las interneuronas provenientes del telencéfalo en zonas de la corteza y el estriado^(46, 47), la apoptosis en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG)⁽⁴⁸⁾, la formación de espinas y dendritas en neuronas corticales⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾, y la transmisión sináptica en neuronas del hipocampo^(52, 53). Las semaforinas pueden ser secretadas o estar ancladas a la membrana celular, y actúan a través del receptor transmembranal denominado plexina, o en el caso de las semaforinas de clase 3 que son secretadas, a través del heterodímero formado por las proteínas transmembranales plexina-neuropilina⁽⁵⁴⁾.

Las efrinas son proteínas quimiotrópicas ancladas a la membrana celular y se han dividido en dos subclases de acuerdo a su homología, las efrinas de tipo A ancladas a la membrana a través de glucosilfosfatidilinositol (GPI), y las efrinas de clase B ancladas a través de un dominio transmembranal⁽⁵⁵⁾. Las efrinas actúan a través de receptores transmembranales con actividad de cinasas de tirosina denominados EphA y EphB⁽⁵⁶⁾. El complejo receptor-ligando transduce señales en ambas direcciones, es decir tanto en la célula que tiene el receptor como en la que expresa el ligando, por lo que se dice que las efrinas actúan de manera bidireccional^(57, 58). Al igual que para otras proteínas quimiotrópicas las efrinas están altamente conservadas en la evolución, encontrándose en organismos multicelulares simples como *C. elegans*, hasta vertebrados. En el caso de los mamíferos se han descrito al menos 8 tipos de efrinas y 13 tipos diferentes de sus receptores⁽⁵⁷⁾. El papel de las efrinas durante el desarrollo embrionario es muy extenso ya que no solo están involucradas en la guía axonal o en la arborización y extensión de dendritas; sino también en la segmentación, la migración de las células de la cresta neural y la angiogénesis; además de que se encuentran distribuidas en una gran cantidad de tejidos⁽⁵⁹⁻⁶²⁾. Originalmente se describió su efecto repelente durante la proyección de las neuronas ganglionares de la retina hacia el tectum óptico. El

patrón estereotipado de esta proyección está dirigido por un gradiente antero-posterior de efrina A2 y por la alta expresión de la efrina A5 en la parte posterior del mismo; así como por la expresión diferencial de los receptores a efrinas en las neuronas ganglionares de la retina⁽⁵⁵⁾. También se han reportado efectos atrayentes de efrinas en neuronas motoras⁽⁶³⁾, y durante la formación del sistema vomeronasal, implicado en la detección de feromonas, en donde la atracción de las neuronas del órgano vomeronasal hacia el bulbo olfatorio está mediado por efrina A-5⁽⁶⁴⁾, entre otros muchos ejemplos.

Fasciculación

Dentro de los mecanismos que guían la proyección axonal es importante destacar el papel que tienen las interacciones entre axones, conocida como fasciculación, y que es mediada a través de proteínas denominadas genéricamente como proteínas de adhesión. De particular importancia son las proteínas de adhesión pertenecientes a la super familia de las inmunoglobulinas (IgCAMs, siglas provenientes de su nombre en inglés Immunoglobulin cell adhesion molecules). Las IgCAMs participan tanto en la fasciculación como en la desfasciculación que evita la interacción y la formación de haces de fibras nerviosas o fascículos⁽⁶⁵⁾. La interacción entre proteínas de adhesión puede ser homofílica, es decir entre proteínas del mismo tipo que se encuentren en células o axones diferentes; o heterofílica entre diferentes tipos de proteínas de adhesión u otras proteínas transmembranales. Además de mediar la interacción entre axones, algunas proteínas de adhesión participan como co-receptores a moléculas quimiotrópicas y factores de crecimiento, modulando los efectos de crecimiento, atracción o repulsión que ejercen en los axones. Tal es el caso de L1 y TAG-1 que interactúan con el co-receptor a semaforinas, neuropilina 1, modulando su efecto repelente en neuronas corticales y sensoriales respectivamente^(66, 67); o de la proteína de adhesión de la familia L1 denominada NrCAM, que interactúa con el co-receptor neuropilina 2 modulando el efecto de repulsión o atracción de la semaforina 3B y 3F⁽⁶⁸⁾. Factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), que al interactuar con NrCAM potencia su efecto en el crecimiento y proyección de neuronas hipocampales⁽⁶⁹⁾ son algunos otros ejemplos.

La importancia de las proteínas de adhesión y sus efectos en la fasciculación se evidencia ante las diversidad de alteraciones en las proyecciones axonales que se presentan en animales experimentales knockout, a los cuales se les ha suprimido la expresión de alguna de estas proteínas⁽⁷⁰⁻⁷³⁾, o en enfermedades y síndromes presentes en humanos que están ligados a mutaciones en proteínas de adhesión tales como esquizofrenia^(26, 74), retardo mental⁽²⁵⁾, o el síndrome de CRASH caracterizado

por presentar hidrocefalia, retardo mental, hipoplasia entre otras alteraciones⁽⁷⁵⁾. En algunos casos como en el de la proteína de adhesión NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), la adhesión es regulada por modificaciones posttraduccionales como la adición de ácido polisialico, que forma un impedimento estérico y evita las interacciones homofílicas y heterofílicas de las NCAMs, impidiendo la interacción entre axones. Esta modificación posttraduccional es también finamente regulada durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario, por lo que en estadios muy tempranos está ausente, aumenta durante etapas posteriores del desarrollo y desaparece en etapas posnatales, manteniéndose sólo en sitios donde se lleva a cabo neurogénesis o en sitios con gran plasticidad neuronal⁽⁷⁶⁾.

La fasciculación es particularmente relevante para la interacción con tractos o fascículos que sirve como guía para otros axones que tienden a elongarse siguiendo las rutas previamente trazadas por axones "pioneros". Los axones "pioneros" son aquellos que proyectan sin la presencia de otros axones con los que puedan interactuar, y funcionan como "andamios" al influir en las rutas que posteriormente seguirán las demás neuritas^(77, 78). Los tractos pioneros se encuentran altamente conservados durante la evolución por lo que en diferentes organismos como el pez cebra, Xenopus, o el ratón, los tractos longitudinales descendentes como el de la comisura post-óptica (TPOC), el FLM y el tracto descendente mesencefálico del nervio trigémino (MesV), son los primeros en proyectar sus axones⁽⁷⁹⁾.

Matriz extracelular

La matriz extracelular (ME) está compuesta por glicoproteínas y proteoglicanos que forman un sustrato semisólido y proporciona no solo soporte a las células sino también información mecánica y química. La ME influye en la adhesión, motilidad y guía de las neuronas y sus proyecciones⁽⁸⁰⁾. Entre las glicoproteínas de ME que tiene mayor influencia en la proyección y guía de las neuronas se encuentran la laminina y la tenascina. La laminina es una glicoproteína compuesta por tres subunidades denominadas α , β y γ , cada una con diversas isoformas que se combinan entre sí para formar estructuras cruciformes⁽⁸¹⁾. Existen 15 isoformas de laminina con diversas funciones en la regulación de la adhesión, motilidad y diferenciación celular. En el caso de las neuronas sensoriales por ejemplo, las lamininas 1 y 10 promueven el crecimiento axonal incluso en ausencia de factores tróficos⁽⁸²⁾. Por otra parte las lamininas también pueden modular el efecto de proteínas quimiotrópicas, se ha mostrado que la presencia de laminina-1 puede convertir el efecto de atracción ejercido por netrina en un efecto repelente para las células ganglionares de la retina⁽⁸³⁾.

La tenascina comprende a una familia de glicoproteínas muy relacionada con el desarrollo del sistema nervioso, se expresa

tempranamente en el neuroepitelio y posteriormente en la glía y las células mesenquimales⁽⁸⁴⁾, y se re-expresa tras una lesión en el sistema nervioso central y periférico⁽⁸⁵⁾. Al igual que otros componentes de ME, la tenascina tiene diversos dominios que ejercen funciones diferenciales sobre las neuronas; por ejemplo, dominios semejantes al factor de crecimiento epidermal (EGF-like regions) tienen un efecto antiadhesivo, mientras que dominios de fibronectina tipo III (FN-III) promueven la adhesión y crecimiento axonal⁽⁸⁶⁾. La expresión de diferentes isoformas de tenascina tipo C, son expresados en el desarrollo embrionario durante la etapa de proyección axonal, de manera que la variante de mayor tamaño estimula la proyección axonal, no así la versión pequeña de la proteína^(87, 88). Además se ha observado que la pequeña secuencia de aminoácidos VFDFNFVLK (Val-Phe-Asp-Asn-Phe-Val-Leu-Lys), que se encuentra en los dominios de fibronectina tipo III de la variante de mayor tamaño, es suficiente para estimular el crecimiento *in vitro* de neuronas de cerebro⁽⁸⁶⁾. Todos los componentes de ME mencionados actúan a través de los receptores heterodiméricos formados por subunidades α y β de integrinas⁽⁸⁹⁾. La activación de integrinas y el reclutamiento posterior de numerosas proteínas forma sitios de adhesión a la ME que se encuentran anclados al citoesqueleto, modulando los diferentes efectos de crecimiento, proliferación, adhesión y orientación de los conos de crecimiento^(18, 90).

Por otra parte, la unión de proteínas secretadas a la ME permite la formación de gradientes de concentración que guían y polarizan la proyección de las neuritas. Experimentos *in vitro* mostraron que al formar gradientes de concentración de BDNF o netrina se puede modular el efecto atrayente o repelente sobre neuronas de hipocampo; así en zonas donde la concentración de BDNF es menor, su efecto es atrayente, y conforme aumenta la concentración las neuronas son repelidas por el factor⁽⁹¹⁾. Por otra parte algunos componentes de la ME funcionan como co-factores para la unión y efecto de factores de crecimiento, tal es el caso del heparán sulfato que modula la acción del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)⁽⁹²⁾. La ME es también un sustrato activamente remodelado por efecto de enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas de matriz que pueden liberar factores de crecimiento o moléculas quimiotrópicas unidas a ella, o dejar expuestos sitios específicos de interacción con los axones⁽⁹³⁾. La ausencia de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) por ejemplo, ocasiona defectos en la proyección y proliferación de las células granulares del cerebro⁽⁹⁴⁾.

Los proteoglicanos de condroitin sulfato (PGCS) son también componentes de la matriz extracelular ampliamente estudiados dada su relevancia en la inhibición de la proyección axonal, particularmente en procesos de regeneración donde se ha demostrado que su expresión está aumentada considerablemente tras una lesión, formando parte del

ambiente inhibitorio que impide la regeneración⁽⁹⁵⁾. Los PGCS son expresados principalmente por astrocitos que forman parte de la cicatriz glial que se forma tras una lesión, y que impiden el crecimiento de los axones no solamente a través del efecto inhibitorio de los proteoglicanos; sino también de otras moléculas que son capaces de unirse a este componente de ME como las glicoproteínas asociadas a mielina (MAG), las glicoproteínas de mielina en oligodendrocitos (OMgp), o la proteína NOGO entre otras⁽⁹⁶⁾.

Propiedades Físicas de la Matriz Extracelular

Las propiedades físicas de la ME, como la rigidez y la topografía, son un aspecto muy interesante y que recientemente ha tomado relevancia como parte de los factores que regulan la proyección axonal. Anteriormente se había observado que la orientación tanto de axones como de componentes de ME determinan la orientación de la proyección neuronal. Se demostró que axones de neuronas de ganglios de la raíz dorsal proyectan siguiendo la orientación de fibras de colágeno alineadas paralelamente⁽⁹⁷⁾, más recientemente se mostró que los axones de ganglios de la raíz dorsal migran paralelamente sobre astrocitos que previamente han sido alineados utilizando campos eléctricos⁽⁹⁸⁾. Este fenómeno tiene representación *in vivo* en la migración neuronal durante el desarrollo embrionario, donde las neuronas migran siguiendo la glía radial⁽⁹⁹⁾, o sobre axones previamente establecidos en trayectorias longitudinales a lo largo del tubo neural⁽¹⁰⁰⁾. El desarrollo de sustratos a escalas nanométricas ha permitido revelar que el nivel topográfico del sustrato es relevante para la proyección axonal, de manera que surcos de profundidad de 345 nm o más tienen efecto en el crecimiento orientado de células de las meninges, esto además influye en la organización del citoesqueleto y la formación de adhesiones, las cuales también aparecen orientadas paralelamente al surco⁽¹⁰¹⁾. En el caso de las neuronas hipocampales, se ha mostrado que orificios de 300 nm tiene un fuerte efecto inductor de la formación de proyecciones en comparación con surcos u orificios de 2 μm ⁽¹⁰²⁾. Más aún al exponer neuronas hipocampales a sustratos con proteínas como laminina o NGF, o a un sustrato con microsurcos, las neuronas mostraron una preferencia de alrededor del 70% por el sustrato con microtopografía, que a uno con señales químicas⁽¹⁰³⁾, destacando la importancia de las propiedades topográficas para la estimulación de proyección axonal.

La rigidez del sustrato es otra propiedad de la matriz extracelular que parece tener efectos importantes en la proyección axonal. Se entiende como rigidez la capacidad de un sustrato de soportar un esfuerzo sin adquirir deformación. El cerebro es uno de los tejidos más suaves del cuerpo (0.1-10 kPa)^(104, 105), en comparación con el músculo (100 kPa)^(106, 107), o el

hueso (10^6 kPa) ⁽¹⁰⁶⁾. Se ha reportado que los axones de neuronas de ganglios de la raíz dorsal incrementan su longitud en sustratos suaves ^(108, 109), un efecto similar se ha observado en neuronas hipocampales ⁽¹¹⁰⁾; además, la ramificación de las neuronas parece ser estimulada en sustratos suaves en comparación con sustratos rígidos ⁽¹⁰⁸⁾. Finalmente la rigidez del sustrato parece tener efectos en la diferenciación y sobrevivencia neuronal. Los sustratos más rígidos estimulan la sobrevivencia de la glía, mientras que sustratos blandos inducen la presencia de neuronas corticales ⁽¹¹¹⁾, e incluso la rigidez del sustrato tiene un importante papel en procesos de diferenciación de células mesenquimales hacia fenotipos neuronales ⁽¹⁰⁷⁾. Lo anterior hace patente que las propiedades físicas de la matriz extracelular son un aspecto más que habrá que estudiar y tomar en cuenta sobretodo y con especial relevancia en el desarrollo de biomateriales que puedan ser usados como andamios para el crecimiento de neuronas y para la reparación de lesiones en el sistema nervioso.

Proyección axonal y neuroregeneración

La recuperación funcional del tejido dañado tras una lesión en el sistema nervioso, conlleva la reparación de los circuitos neuronales a través de la regeneración axonal y del restablecimiento de las conexiones específicas; sin embargo la capacidad de regeneración del sistema nervioso es limitada. En general se sabe que el sistema nervioso periférico (SNP) tiene una mayor capacidad de regeneración en comparación con el sistema nervioso central (SNC). Al parecer esto se debe al ambiente en el cual unos u otros axones tienen que crecer y regenerarse, a la diferencia en los procesos inflamatorios, así como a las propiedades intrínsecas de las neuronas ⁽¹¹²⁾. Los axones seccionados en el SNP tienden a crecer distancias mayores que los del SNC, y al parecer la presencia de células de Schwann alineadas longitudinalmente y que forman estructuras conocidas como bandas de Büngner facilitan y promueven el crecimiento axonal ⁽¹¹³⁾. Los estudio de implantes de nervios periféricos a manera de "puentes" mostraron que promueven el crecimiento de axones de neuronas del SNC ⁽¹¹⁴⁾. A diferencia del SNP, en el SNC existe la formación de una cicatriz glial que consiste en astrocitos, microglía y fibroblastos que forman no solo una barrera física que impide el crecimiento axonal, sino que también contiene factores inhibidores del crecimiento como las MAG o proteínas quimiotrópicas inhibidoras. En el caso del tejido embrionario los astrocitos aparecen de manera tardía y no intervienen en procesos de regeneración en esta etapa ⁽¹¹⁵⁾. Un ejemplo interesante es la semaforina 3A que como se mencionó anteriormente, está implicada en la formación de diversos tractos en el desarrollo embrionario y en general su expresión disminuyen en el cerebro adulto; sin embargo tras una lesión se re-expresa. Se ha observado que en lesiones de la

médula espinal, los fibroblastos de las meninges invaden el sitio de la herida formando parte de la cicatriz y secretan semaforinas y componentes de matriz extracelular como PGCS, a los cuales se asocian las semaforinas ^(116, 117). De manera interesante la inhibición de la señalización de la semaforina 3A por el compuesto SM-216289 derivado de un hongo, ha mostrado promover la regeneración anatómica y funcional en lesiones de la medula espinal en ratas ⁽¹¹⁸⁾.

Cabe señalar que las semaforinas tiene también un papel importante en el mantenimiento de las sinapsis y los fenómenos de plasticidad neuronal, se plantea que no solo tiene un efecto negativo en la regeneración, sino que podrían dirigir y promover la inervación correcta de los axones en regeneración ⁽¹¹⁹⁾, o incluso de neuronas implantadas en terapias de sustitución celular ⁽¹²⁰⁾. Por otra parte, la interacción de las proteínas quimiotrópicas con los componentes de matriz extracelular pueden modular los procesos de regeneración. Se ha observado que al interferir con la interacción entre semaforina 3A y los PGCS se pierde el efecto repelente de la proteína quimiotrópica ⁽¹¹⁶⁾. Los PGCS tiene además un papel importante en la adhesión de las células de Schwann tras una lesión en la médula espinal, las cuales a su vez expresan moléculas de adhesión celular como L1 y NCAM que pueden funcionar como sustratos permisivos para el crecimiento axonal ⁽¹²¹⁾.

Desarrollo de Biomateriales

El conocimiento de los factores que favorecen el crecimiento axonal está siendo aplicado para diseñar biomateriales que mimeticen los sustratos permisivos y permitan la regeneración. Un ejemplo interesante es el uso de biomateriales como andamios. Se han diseñado materiales poliméricos "funcionalizados", ya sea utilizando moléculas de adhesión tales como L1, NCAM o TAG1, o proteínas de ME como laminina o tenascina, o incluso péptidos que corresponden a los sitios activos de estos componentes de matriz extracelular, que proveen un sustrato permisivo para la adhesión y el crecimiento axonal ⁽¹²²⁻¹²⁵⁾ (Fig. 3). Actualmente, la ingeniería de tejidos desarrolla biomateriales que imitan las bandas de Büngner que permiten el crecimiento alineado de las células de Schwann y favorecen la proyección de axones. A este respecto se han usado por ejemplo nanofibras alineadas que permiten la orientación longitudinal de las células de Schwann, y que estimula la expresión de mielina ⁽¹²⁶⁾, por otra parte microsurcos o microporos que permiten la alineación de las células de Schwann favorecen el crecimiento de axones de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal ⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾.

Una de las estrategias que se aplican en la regeneración de lesiones en el sistema nervioso periférico es el uso de implantes de fibras nerviosas autólogas; sin embargo estos procedimientos tiene inconvenientes como perdida de función del sitio donador,

posible desarrollo de neuromas, y escases de material para implantar; por lo que se han desarrollando canales de diversos biomateriales que tiene mayor disponibilidad y favorecen el crecimiento de los axones, impidiendo la formación de cicatrices gliales, y liberando factores de crecimiento implicados en la estimulación del crecimiento axonal⁽¹³⁰⁾. Estas estrategias han sido particularmente probadas en lesiones de la médula espinal e incluso existen algunos productos ya aprobados por la FDA para el tratamiento de lesiones en nervios periféricos⁽¹³¹⁾. Por otra parte el uso de biomateriales con características topográficas nanométricas, y sustrato con rigidez controlada parecen ser una alternativa viable para estimular el crecimiento axonal⁽¹⁹⁾. Las técnicas de microlitografía utilizada en la elaboración de microcircuitos en la industria electrónica han sido adaptada para la generación de micro y nano- patrones en materiales poliméricos biocompatibles⁽¹³¹⁾, que permiten el crecimiento y alineación de las neuronas y sus proyecciones. Finalmente, se están utilizando también biomateriales que permiten simular gradientes tanto químicos como mecánicos que emulan los gradientes presentes durante el desarrollo embrionario y que son determinantes para la proyección y guía axonal⁽¹³²⁾.

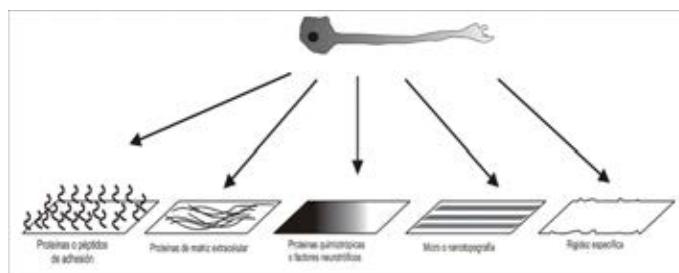


figura 3. esquema que representa algunas de las diferentes estrategias para promover la proyección de neuritas utilizando biomateriales funcionalizados, o con topografía o rigidez específica.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La comprensión de los elementos que determinan la capacidad de elongación e inervación neuronal durante el desarrollo embrionario, cuando las redes neuronales se encuentran en formación, ofrece información sumamente importante para promover la neuroregeneración en etapas posteriores. Numerosas estrategias se han encaminado a mimetizar o reproducir un ambiente extracelular propicio semejante al que se observa cuando la proyección neuronal es favorecida. Entre las estrategias se encuentra el diseño de biomateriales con propiedades químicas y físicas semejantes a las de la ME, mostrando que es posible inducir, estimular, y guiar la proyección neuronal, utilizando estos sustratos como "puentes" que eluden las señales y sustratos inhibidores. Aunque a la fecha los resultados son prometedores, muchas de estas estrategias se

encuentran en fase experimental y será necesario mantener la relación multidisciplinaria entre la neurobiología del desarrollo, el campo de los biomateriales y la neurología clínica, para llevar los resultados experimentales a su aplicación final en los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Yamada KM, Wessells NK. Axon elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. *Exp Cell Res* 1971; 66:346-52.
- Ramón y Cajal S. Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. *Gaceta Sanitaria de Barcelona* 1890; 41:3-9.
- Suter DM, Forscher P. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* 2000; 44:97-113.
- Goldberg DJ, Burmeister DW. Stages in axon formation: observations of growth of Aplysia axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol* 1986; 103:1921-31.
- Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:a001818.
- Wen Z, Zheng JQ. Directional guidance of nerve growth cones. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16:52-8.
- Dent EW, Tang F, Kalil K. Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist* 2003; 9:343-53.
- Fan J, Mansfield SG, Redmond T, Gordon-Weeks PR, Raper JA. The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol* 1993; 121:867-78.
- Zhou FQ, Cohan CS. Growth cone collapse through coincident loss of actin bundles and leading edge actin without actin depolymerization. *J Cell Biol* 2001; 153:1071-84.
- Drees F, Gertler FB. Ena/VASP: proteins at the tip of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18:53-9.
- Pantalone D, Carlier MF. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 1993; 75:1007-14.
- Wills Z, Marr L, Zinn K, Goodman CS, Van Vactor D. Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 1999; 22:291-9.
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 1997; 136:1307-22.
- Moriyama K, Yahara I. Two activities of cofilin, severing and accelerating directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations around the actin-binding helix. *EMBO J* 1999; 18:6752-61.
- Yin HL, Stossel TP. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 1979; 281:583-6.
- Lin CH, Forscher P. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 1995; 14:763-71.
- Long KE, Lemmon V. Dynamic regulation of cell adhesion molecules during axon outgrowth. *J Neurobiol* 2000; 44:230-45.
- Robles E, Gomez TM. Focal adhesion kinase signaling at sites of integrin-mediated adhesion controls axon pathfinding. *Nat Neurosci* 2006; 9:1274-83.
- Moore SW, Sheetz MP. Biophysics of substrate interactions: influence on neural motility, differentiation and repair. *Dev Neurobiol* 2011; 71:1090-101.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; 274:1123-33.

21. Ahsan M, Riley KL, Schubert FR. Molecular mechanisms in the formation of the medial longitudinal fascicle. *J Anat* 2007; 211:177-87.
22. Anitha A, Nakamura K, Yamada K, Suda S, Thanseem I, Tsujii M, et al. Genetic analyses of roundabout (ROBO) axon guidance receptors in autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B:1019-27.
23. Atz ME, Rollins B, Vawter MP. NCAM1 association study of bipolar disorder and schizophrenia: polymorphisms and alternatively spliced isoforms lead to similarities and differences. *Psychiatr Genet* 2007; 17:55-67.
24. Benitez-Burraco A. Neurobiology and neurogenetics of dyslexia. *Neurologia* 2010; 25:563-81.
25. Kenrick S, Watkins A, De Angelis E. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 2000; 9:879-86.
26. Vawter MP. Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 2000; 405:385-95.
27. Lumsden AG, Davies AM. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 1983; 306:786-8.
28. Rochlin MW, Farbman AI. Trigeminal ganglion axons are repelled by their presumptive targets. *J Neurosci* 1998; 18:6840-52.
29. Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 1990; 4:61-85.
30. Chan SS, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, et al. UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 1996; 87:187-95.
31. Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, et al. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 1999; 96:795-806.
32. Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, Sakano S. Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 62:175-86.
33. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996; 87:175-85.
34. Serafini T, Kennedy TE, Gallo MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994; 78:409-24.
35. Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE. Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 2007; 621:17-31.
36. Dickson BJ, Gilestro GF. Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22:651-75.
37. Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 1999; 96:785-94.
38. Reeber SL, Kaprielian Z. Leaving the midline: how Robo receptors regulate the guidance of post-crossing spinal commissural axons. *Cell Adh Migr* 2009; 3:300-4.
39. Stein E, Tessier-Lavigne M. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 2001; 291:1928-38.
40. Chen Z, Gore BB, Long H, Ma L, Tessier-Lavigne M. Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* 2008; 58:325-32.
41. Mambetisaeva ET, Andrews W, Camurri L, Annan A, Sundaresan V. Robo family of proteins exhibit differential expression in mouse spinal cord and Robo-Slit interaction is required for midline crossing in vertebrate spinal cord. *Dev Dyn* 2005; 233:41-51.
42. Sabatier C, Plump AS, Le M, Brose K, Tamada A, Murakami F, et al. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 2004; 117:157-69.
43. Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75:217-27.
44. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY. The sema domain. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14:669-78.
45. Semaphorin nomenclature committee. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell* 1999; 97:551-2.
46. He Z, Wang KC, Koprivica V, Ming G, Song HJ. Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Science's STKE* 2002; 2002:re1.
47. Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 2001; 293:872-5.
48. Ben-Zvi A, Yagil Z, Hagalili Y, Klein H, Lerman O, Behar O. Semaphorin 3A and neurotrophins: a balance between apoptosis and survival signaling in embryonic DRG neurons. *J Neurochem* 2006; 96:585-97.
49. Fenstermaker V, Chen Y, Ghosh A, Yuste R. Regulation of dendritic length and branching by semaphorin 3A. *J Neurobiol* 2004; 58:403-12.
50. Morita A, Yamashita N, Sasaki Y, Uchida Y, Nakajima O, Nakamura F, et al. Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J Neurosci* 2006; 26:2971-80.
51. Polleux F, Morrow T, Ghosh A. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 2000; 404:567-73.
52. Bouzioukh F, Daoudal G, Falk J, Debanne D, Rougon G, Castellani V. Semaphorin3A regulates synaptic function of differentiated hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2006; 23:2247-54.
53. Sahay A, Kim CH, Sepkuty JP, Cho E, Huganir RL, Ginty DD, et al. Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2005; 25:3613-20.
54. Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23:263-92.
55. O'Leary DD, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9:65-73.
56. Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, et al. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 1996; 17:9-19.
57. Davy A, Soriano P. Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Dev Dyn* 2005; 232:1-10.
58. Holland SJ, Gale NW, Mbamalu G, Yancopoulos GD, Henkemeyer M, Pawson T. Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* 1996; 383:722-5.
59. Hindges R, McLaughlin T, Genoud N, Henkemeyer M, O'Leary DD. EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* 2002; 35:475-87.
60. Holder N, Klein R. Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development* 1999; 126:2033-44.
61. Holmberg J, Clarke DL, Frisen J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 2000; 408:203-6.
62. Wilkinson DG. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2:155-64.
63. Eberhart J, Barr J, O'Connell S, Flagg A, Swartz ME, Cramer KS, et al. Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons. *J Neurosci* 2004; 24:1070-8.
64. Knoll B, Zarbalis K, Wurst W, Drescher U. A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development* 2001; 28:895-906.

65. Maness PF, Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 2007; 10:19-26.
66. Castellani V, De Angelis E, Kenrick S, Rougon G. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J* 2002; 21:6348-57.
67. Law CO, Kirby RJ, Aghamohammadzadeh S, Furley AJ. The neural adhesion molecule TAG-1 modulates responses of sensory axons to diffusible guidance signals. *Development* 2008; 135:2361-71.
68. Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, et al. Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 2005; 48:63-75.
69. Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003; 113:867-79.
70. Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillory RW, Soriano P, Furley AJ. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 1998; 8:26-33.
71. Demyanenko GP, Siesser PF, Wright AG, Brennaman LH, Bartsch U, Schachner M, et al. L1 and CHL1 Cooperate in Thalamocortical Axon Targeting. *Cereb Cortex* 2011; 21:401-12.
72. Nakamura Y, Lee S, Haddox CL, Weaver EJ, Lemmon VP. Role of the cytoplasmic domain of the L1 cell adhesion molecule in brain development. *J Comp Neurol* 2010; 518:1113-32.
73. Williams SE, Grumet M, Colman DR, Henkemeyer M, Mason CA, Sakurai T. A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron* 2006; 50:535-47.
74. Kurumaji A, Nomoto H, Okano T, Toru M. An association study between polymorphism of L1CAM gene and schizophrenia in a Japanese sample. *Am J Med Genet* 2001; 105:99-104.
75. Zhang L. CRASH syndrome: does it teach us about neurotrophic functions of cell adhesion molecules? *Neuroscientist* 2010; 16:470-4.
76. Bonfanti L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* 2006; 80:129-64.
77. Easter SS, Jr., Burrill J, Marcus RC, Ross LS, Taylor JS, Wilson SW. Initial tract formation in the vertebrate brain. *Prog Brain Res* 1994; 102:79-93.
78. Goodman CS, Shatz CJ. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 1993; 72 Suppl:77-98.
79. Chedotal A, Richards LJ. Wiring the brain: the biology of neuronal guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:a001917.
80. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009; 326:1216-9.
81. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, et al. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* 1994; 14:209-11.
82. Plantman S, Patarroyo M, Fried K, Domogatskaya A, Tryggvason K, Hammarberg H, et al. Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro. *Mol Cell Neurosci* 2008; 39:50-62.
83. Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 1999; 401:69-73.
84. Sanes JR. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci* 1989; 12:491-516.
85. Sanes JR, Schachner M, Covault J. Expression of several adhesive macromolecules (N-CAM, L1, J1, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan) in embryonic, adult, and denervated adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 1986; 102:420-31.
86. Meiners S, Nur-e-Kamal MS, Mercado ML. Identification of a neurite outgrowth-promoting motif within the alternatively spliced region of human tenascin-C. *J Neurosci* 2001; 21:7215-25.
87. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 2000; 218:235-59.
88. Mercado ML, Nur-e-Kamal A, Liu HY, Gross SR, Movahed R, Meiners S. Neurite outgrowth by the alternatively spliced region of human tenascin-C is mediated by neuronal alpha₇beta₁ integrin. *J Neurosci* 2004; 24:238-47.
89. Jones LS. Integrins: possible functions in the adult CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19:68-72.
90. Gomez TM, Roche FK, Letourneau PC. Chick sensory neuronal growth cones distinguish fibronectin from laminin by making substratum contacts that resemble focal contacts. *J Neurobiol* 1996; 29:18-34.
91. Mai J, Fok L, Gao H, Zhang X, Poo MM. Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J Neurosci* 2009; 29:7450-8.
92. Mohammadi M, Olsen SK, Goetz R. A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15:506-16.
93. Wojcik-Staszek L, Gregor A, Zalewska T. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins. *Acta Neurobiol Exp* 2011; 71:103-12.
94. Vaillant C, Meissirel C, Mutin M, Belin MF, Lund LR, Thomasset N. MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24:395-408.
95. Properzi F, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:335-6.
96. Xie F, Zheng B. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol* 2008; 209:302-12.
97. Ebendal T. The relative roles of contact inhibition and contact guidance in orientation of axons extending on aligned collagen fibrils in vitro. *Exp Cell Res* 1976; 98:159-69.
98. Alexander JK, Fuss B, Colello RJ. Electric field-induced astrocyte alignment directs neurite outgrowth. *Neuron Glia Biol* 2006; 2:93-103.
99. Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 1972; 145:61-83.
100. Hynes RO, Patel R, Miller RH. Migration of neuroblasts along preexisting axonal tracts during prenatal cerebellar development. *J Neurosci* 1986; 6:867-76.
101. Manwaring ME, Walsh JF, Treasco PA. Contact guidance induced organization of extracellular matrix. *Biomaterials* 2004; 25:3631-8.
102. Fozdar DY, Lee YJ, Schmidt CE, Chen S. Selective axonal growth of embryonic hippocampal neurons according to topographic features of various sizes and shapes. *Int J Nanomedicine* 2011; 6:45-57.
103. Gomez N, Chen S, Schmidt CE. Polarization of hippocampal neurons with competitive surface stimuli: contact guidance cues are preferred over chemical ligands. *J R Soc Interface* 2007; 4:223-33.
104. Elkin BS, Morrison B, 3rd. Region-specific tolerance criteria for the living brain. *Stapp Car Crash J* 2007; 51:127-38.
105. Gefen A, Gefen N, Zhu Q, Raghupathi R, Margulies SS. Age-dependent changes in material properties of the brain and braincase of the rat. *J Neurotrauma* 2003; 20:1163-77.
106. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 2005; 310:1139-43.
107. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126:677-89.
108. Flanagan LA, Ju YE, Marg B, Osterfield M, Janmey PA. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 2002; 13:2411-5.
109. Willits RK, Skornia SL. Effect of collagen gel stiffness on neurite extension. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004; 15:1521-31.
110. Kostic A, Sap J, Sheetz MP. RPTPalpha is required for rigidity-dependent inhibition of extension and differentiation of hippocampal neurons. *J Cell Sci* 2007; 120:3895-904.
111. Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janmey PA. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophys J* 2006;

- 90:3012-8.
112. Giger RJ, Hollis ER, 2nd, Tuszyński MH. Guidance molecules in axon regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:a001867.
 113. Aguayo AJ, Bray GM, Perkins SC. Axon-Schwann cell relationships in neuropathies of mutant mice. *Ann N Y Acad Sci* 1979; 317:512-31.
 114. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1981; 214:931-3.
 115. Ueno M, Katayama K, Yamauchi H, Yasoshima A, Nakayama H, Doi K. Repair process of fetal brain after 5-azacytidine-induced damage. *Eur J Neurosci* 2006; 24:2758-68.
 116. Pasterkamp RJ, Verhaagen J. Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361:1499-511.
 117. Tannemaat MR, Korecka J, Ehler EM, Mason MR, van Duinen SG, Boer GJ, et al. Human neuroma contains increased levels of semaphorin 3A, which surrounds nerve fibers and reduces neurite extension in vitro. *J Neurosci* 2007; 27:14260-4.
 118. Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, et al. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 2006; 12:1380-9.
 119. Ziembka KS, Chaudhry N, Rabchevsky AG, Jin Y, Smith GM. Targeting axon growth from neuronal transplants along preformed guidance pathways in the adult CNS. *J Neurosci* 2008; 28:340-8.
 120. Tamariz E, Diaz-Martinez NE, Diaz NF, Garcia-Pena CM, Velasco I, Varela-Echavarria A. Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to semaphorins 3A and 3C. *J Neurosci Res* 2010; 88:971-80.
 121. Jones LL, Sajed D, Tuszyński MH. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci* 2003; 23:9276-88.
 122. Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G. Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue Eng* 2003; 9:209-18.
 123. Rao SS, Winter JO. Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Front Neuroeng* 2009; 2:6.
 124. Straley KS, Foo CW, Heilshorn SC. Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. *J Neurotrauma* 2010; 27:1-19.
 125. Suzuki M, Itoh S, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, et al. Tendon chitosan tubes covalently coupled with synthesized laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *J Neurosci Res* 2003; 72:646-59.
 126. Chew SY, Mi R, Hoke A, Leong KW. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. *Biomaterials* 2008; 29:653-61.
 127. Bozkurt A, Deumens R, Beckmann C, Olde Damink L, Schugner F, Heschel I, et al. In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels. *Biomaterials* 2009; 30:169-79.
 128. Hu W, Gu J, Deng A, Gu X. Polyglycolic acid filaments guide Schwann cell migration in vitro and in vivo. *Biotechnol Lett* 2008; 30:1937-42.
 129. Lietz M, Dresemann L, Hoss M, Oberhoffner S, Schlosshauer B. Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials* 2006; 27:1425-36.
 130. Biazer E, Khorasani M T, Montazeri N, Pourshamsian K, Daliri M, Rezaei M, et al. Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction. *Int J Nanomedicine* 2010; 5:839-52.
 131. Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 60:137-57.
 132. Singh M, Berkland C, Detamore MS. Strategies and applications for incorporating physical and chemical signal gradients in tissue engineering. *Tissue Eng Part B* 2008; 14:341-66.