

MICROFLUÍDICA COMO PLATAFORMA DE ESTUDIO EN NEUROBIOLOGÍA

MICROFLUIDIC AS A STUDY PLATFORM IN NEUROBIOLOGY

AUTORES: LAURA ROSAS¹, BRUNO A. CISTERNA² & DIEGO REGINENSI^{1,3,4}

¹Programa de Ingeniería Biomédica, Universidad Latina de Panamá, Panamá, República de Panamá. ²Centro de Investigaciones Médicas, Escuela de Medicina, Universidad de Talca, Chile. ³Escuela de Medicina, Universidad de Panamá, Panamá, República de Panamá. ⁴Neurociencias, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP), Ciudad del Saber, Panamá, República de Panamá.

Correos: diego.reginensi@gmail.com

Recibido: 30 de mayo de 2019

Aceptado: 24 de junio de 2019

Resumen

PALABRAS CLAVE:

Microfluídica, biomimética, enfermedades neurodegenerativas, regeneración axonal.

La microfluídica corresponde a la manipulación de fluidos en canales de decenas de micrómetros y que ha emergido como un nuevo campo en la Ingeniería Biomédica. Esta disciplina tiene el potencial de influir en áreas científicas que van desde la síntesis química hasta la neurobiología aplicada. Esta nueva disciplina ha demostrado ser funcional en experimentos de biomimética, estudios patológicos y diversas aplicaciones dentro del área de la biomedicina, lo cual demuestra que a largo plazo la misma podrá ayudar a la comprensión biológica y el desarrollo de nuevas

tecnologías que puedan ser implementadas para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diversas patologías. En esta revisión, se explica la manera en la cual la microfluídica ha sido imprescindible para la comprensión de la fisiología del sistema nervioso, diversas enfermedades neurodegenerativas y la regeneración axonal.



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

KEYWORDS:

Microfluidics, biomimetics, neurodegenerative diseases, axonal regeneration.

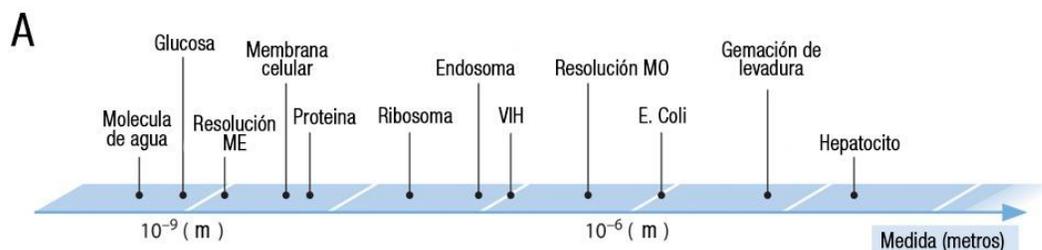
Abstract

Microfluidics, which refers to the manipulation of fluids throughout channels with dimensions within the range of tens of micrometers, has emerged as a new field in Biomedical Engineering. This discipline has the potential to influence scientific areas that go from chemical synthesis to applied neurobiology; however, this field is still at an early development stage. This new discipline has proved to be functional in experiments regarding biomimetic, pathological researches and diverse applications surrounding the biomedical field, which proves that at a long-term it could be of help for biological comprehension and the development of new technologies that can be applied in the diagnosis, prevention and treatment of multiple pathologies. In this article, the way in which microfluidics has been essential for the comprehension and understanding of the nervous system, multiple neurodegenerative diseases and axonal regeneration, will be explained.

Principios generales de la microfluídica

La microfluídica es la ciencia y tecnología que manipula pequeñas cantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-6} l) usando canales con dimensiones del orden de los micrómetros (Whitesides, 2006), lo cual equivale al tamaño de diversos microorganismos como bacterias o incluso las dimensiones de moléculas orgánicas como algunas proteínas (Wong et al., 2013) (*Figura 1A*).

Figura 1 A
Conceptos básicos de microfluídica



Conceptos básicos de microfluídica. (A) Esquema de dimensiones de diversas estructuras moleculares, macromoleculares, subcelulares y celulares

Fuente: Rosas, Cisterna & Reginensi (2019)

Para lograr comprender el funcionamiento de los microfluidos, es necesario comprender previamente cómo funciona la física de éstos, por lo cual previamente a las aplicaciones, se explicarán diversos principios de los mismos, empezando por sus principios físicos. La dinámica de fluidos en los sistemas de microfluidos se describe por la ecuación de Navier-Stokes:

$$\rho \left(\frac{\partial V}{\partial t} + (V \cdot \nabla V) \right) = \nabla P + \rho g + \mu \nabla^2 V$$

donde V la velocidad experimentada por el fluido, ρ es la densidad del fluido, g es la gravedad que actúa sobre el fluido, P la presión del fluido y μ es la viscosidad cinética del fluido (Squires and Quake, 2005). De su forma adimensional se obtiene el número de Reynolds definido:

$$Re = \frac{\rho V L}{\mu}$$

donde V es la velocidad característica del flujo, L es la longitud característica de la geometría, ρ es la densidad del fluido y μ es la viscosidad dinámica del fluido (Zhang et al., 2016). El número de Reynolds (Re) define si un fluido tiene un flujo en régimen laminar o turbulento, es decir, si fluye en una trayectoria uniforme o desordenadamente. En base a ello, $Re < 2300$, generalmente indica un flujo laminar, que es el que tienen los microfluidos, debido al tamaño pequeño de los microcanales. El mismo es una condición en la cual la velocidad de una partícula en una corriente de fluido no es una función aleatoria en el tiempo, de este modo, uniendo dos fluidos no podrían mezclarse fácilmente a través de las turbulencias, por lo que la difusión simple interviene en la mezcla de fluidos (Sharp et al., 2002). A causa de esto, la difusión juega un papel de gran envergadura en los microfluidos. La misma puede ocurrir de manera pasiva, en la cual no participan otros agentes aparte de los fluidos, y se realiza mediante el incremento del contacto de los microfluidos con diversas aperturas, o de manera activa, en la que factores externos influyen en la mezcla del fluido, tales como ondas acústicas, campos magnéticos, cambios de presión o de temperatura, entre otros (Elveflow, 2018).

Un aspecto de suma importancia dentro de los microfluidos es que la relación de superficie de área por volumen es muy alta, por lo que cualquier reacción química en un microfluido se ve muy acelerada. Un ejemplo de esto, es la electroforesis capilar que consiste en una técnica para separar iones con respecto a su movilidad electroforética basado en la aplicación de diferencia de potencial eléctrico (Sekhon, 2011), la cual se vuelve más eficiente en canales microfluídicos ya que se remueve el exceso de calor de manera más rápida. Este aspecto de todos modos tiene sus desventajas al momento de trabajar con flujo electrocinético al transportar fluidos (Manz et al., 1994), ya que la relación de superficie de área por volumen al ser tan alta, permite que las macromoléculas se difundan de manera rápida y se adsorban en la superficie de los canales, reduciendo de esta manera la eficiencia del proceso bombeo (Locascio et al., 1999). También destaca, la tensión superficial que es el resultado de la cohesión entre moléculas líquidas en la interfaz de gas/líquido, la misma es la que permite que los mosquitos sean capaces de flotar en el agua, ya que los objetos pequeños con masas pequeñas no son capaces de ejercer fuerza suficiente para romper esta tensión superficial. En los microfluidos, la tensión superficial hace que las fuerzas capilares sean realmente altas y difíciles de superar, lo cual permite

que se lleven a cabo técnicas de bombeo capilar (Squires and Quake, 2005).

Por último, otro aspecto de gran importancia es la resistencia fluídica, que en los microfluidos está definida por diversas ecuaciones. Empezando por la tasa de flujo, que se calcula mediante la ecuación $Q = \Delta P/R$, donde Q equivale a la tasa de flujo, ΔP es el cambio de presión a través del canal y R es la resistencia del canal. La geometría más común de canales microfluídicos, es la circular. La fórmula de la resistencia fluídica viene dada por:

$$R = \frac{8 \mu L}{\pi r^4}$$

Donde μ es la viscosidad del fluido, L es el largo del canal, y r es el radio del mismo. La resistencia de los canales varía de acuerdo a la forma de los mismos, teniendo diversas fórmulas para canales rectangulares y canales de otras formas geométricas de diferentes radios (Beebe et al., 2002). Este aspecto en particular es de gran ayuda, ya que, al ser usada apropiadamente, la resistencia fluídica puede ser de ayuda para mejorar u optimizar el desempeño de los sistemas de control de fluidos.

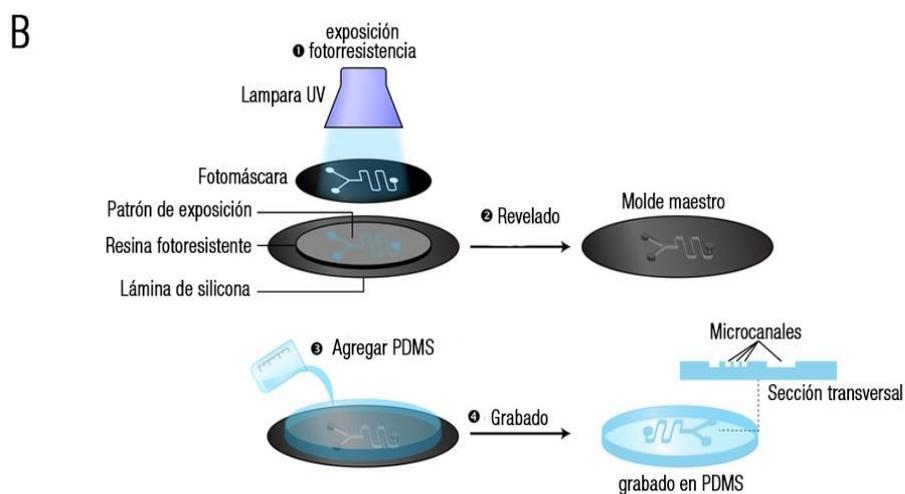
La microfluídica es una herramienta poderosa para crear microambientes específicos (p.e. sistemas compartimentalizados, gradientes de concentración molecular) (Kim et al., 2010). La manipulación, el control preciso y el monitoreo de microambientes celulares usando tecnologías de microfluidos la convierte en una herramienta puntera y de amplio alcance para la investigación biomédica y en concreto en la neurobiología como después explicaremos (Beebe et al., 2002). Además, debido a que el volumen de fluido empleado dentro de estos canales es muy pequeño, la cantidad de reactivos que será empleada también es muy pequeña, lo cual es de mucha utilidad al momento de ahorrar dinero en la compra de reactivos que suelen ser muy caros. Esto también contribuye a la realización de análisis químicos más eficientes ya que como la cantidad de fluido es pequeña, al igual que la cantidad de reactivos, las reacciones químicas se llevarán de manera rápida y segura.

Cabe recalcar, que la microfluídica presenta múltiples ventajas aparte de las previamente mencionadas, las cuales incluyen: transparencia óptica, biocompatibilidad, estabilidad térmica y permeabilidad gaseosa, posibilidad de experimentación en paralelo y mejor biomimesis del ambiente tisular (Wang et al., 2009). El mantenimiento de los dominios neuronales, en particular las funciones axonales, son especialmente cruciales en proyecciones de larga-distancia como las neuronas motoras o neuronas piramidales corticales. Por ello, la correcta comprensión de la dinámica neuronal implica estudiar sus componentes por separado en determinados procesos celulares, de aquí que la aproximación experimental mediante microfluídica sea muy interesante en la neurobiología.

En los última década, se han desarrollado dispositivos de microfluídica para diversas aplicaciones de cultivo celular (Taylor and Jeon, 2011). Estos dispositivos están fabricados de manera precisa y reproducible con características que se encuentran en una escala física

similar a las que se encuentran las células a nivel fisiológico; cabe destacar, que las propiedades fluídicas en la microescala permiten la creación de microentornos precisos, como gradientes de concentración (Lin and Levchenko, 2015; Li Jeon et al., 2002), compartimientos subcelulares fluidicamente aislados (Lin and Levchenko, 2015; Taylor et al., 2005) y sistemas compartimentalizados que imitan el microambiente neuronal (Kim et al., 2014; Taylor and Jeon, 2011). El método más común para fabricar dispositivos de microfluidos para aplicaciones biológicas es mediante la creación de patrones o plantillas a través fotolitografía utilizando la fotoresina epóxica SU-8. El SU-8 se polimeriza cuando se expone a la luz ultravioleta y se puede usar para crear estructuras en el rango de los cientos de micras, que son adecuadas para el cultivo de células. Una vez que se produce la plantilla, se puede usar indefinidamente para replicar, a partir del molde, los dispositivos microfluídicos usando poli (dimetilsiloxano) (PDMS), un polímero biocompatible y ópticamente transparente. Este proceso, llamado litografía suave, es rentable y puede realizarse en cualquier entorno de laboratorio tradicional (Halldorsson et al., 2015; Whitesides et al., 2001) (*Figura 1B*).

Figura 1 B



Conceptos básicos de microfluídica. (B) Esquema del proceso de microfabricación de sistemas compartimentalizados basado en microfluídica.

Fuente: Rosas, Cisterna & Reginensi (2019)

La interconexión entre la ingeniería y diversas metodologías biológicas permiten el diseño de sistemas basados en propiedades microfluídicas para lograr mimetizar el microambiente de los procesos neuronales mediante un control espacio-temporal en el orden de la micro/nanoescala (Millet and Gillette, 2012b; Millet and Gillette, 2012a). El entendimiento del comportamiento fisiológico de las neuronas y cómo trabajan en el sistema nervioso central es crítico para la comprensión de diversas neuropatologías.

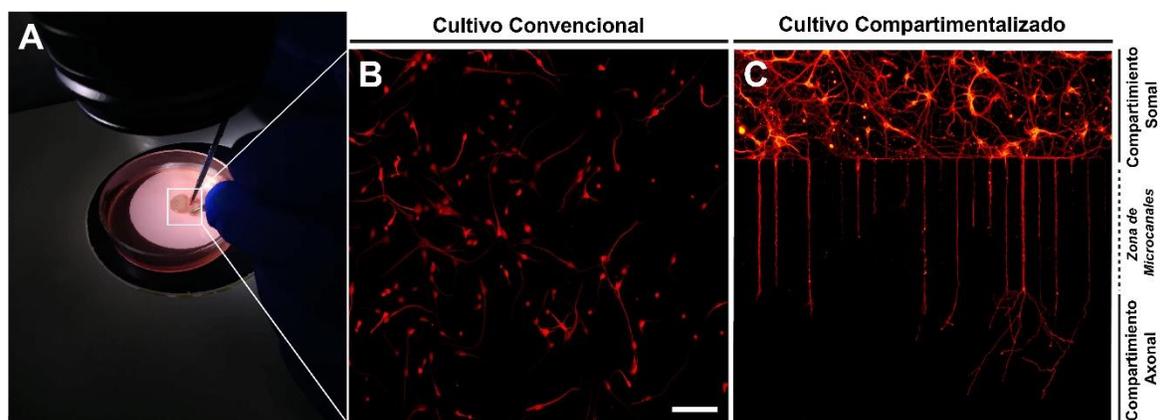
Aplicación de la Microfluídica en la Neurobiología

Las neuronas son células altamente complejas que presentan características electroquímicas y estructurales detalladas que configuran su función. El soma celular, dónde se sitúa el núcleo de la célula, extiende los axones alcanzando diferentes dianas celulares con características químicas y físicas distintas (Millet and Gillette, 2012a). La comprensión de cómo las señales moleculares y físicas modulan la dinámica de las células neuronales es una tarea difícil debido a la dificultad de reproducir in vitro el microentorno neural en qué se desarrollan in vivo. Las neuronas se comunican concretamente a través de las sinapsis. Éstas son aproximaciones plasmáticas muy especializadas con una elevada concentración de complejos proteicos y canales que permiten la comunicación química mediante neurotransmisores (aunque existe también un bajo porcentaje de neurotransmisión eléctrica) (Kandel E.; 2012). La mayoría de las sinapsis son uniones entre neuronas, sin embargo, las motoneuronas son neuronas periféricas especializadas que inervan unidades motoras musculares y presentan una disposición espacial inusual en la que sus estructuras subcelulares están expuestas a microambientes extracelulares muy concretos y diferentes a los de los otros tipos neuronales. Por un lado, el soma de la motoneurona está ubicado centralmente dentro de la médula espinal rodeada por células gliales, mientras que su terminal axonal se encuentra en la periferia en contacto directo con el tejido muscular, formando la unión neuromuscular, una estructura altamente especializada responsable de la transmisión de señales y la contracción muscular (Southam et al., 2013). Esta señalización neuromuscular es una comunicación bidireccional que involucra una señalización electroquímica anterógrada, que produce contracción muscular y una señalización neurotrófica retrógrada de soporte neuronal. Por lo tanto, la supervivencia y la función de las motoneuronas y el tejido muscular inervado son altamente dependientes entre sí (Zahavi et al., 2015; Park et al., 2013). Sin embargo, se desconoce el o los responsables moleculares de dicha dependencia (Cisterna et al., 2014). La interdependencia motoneurona-miofibra esquelética queda en evidencia al suspender el suministro nervios (ya sea por denervación o disfunción de motoneuronas espinales) y observar rápidamente el desarrollo de atrofia muscular (Cisterna et al., 2016; Cea et al., 2013; Southam et al., 2013).

La rápida conducción del impulso nervioso en la comunicación del sistema nervioso se logra mediante el aislamiento de los axones a través de la formación de mielina. Las vainas de mielina son formadas por los oligodendrocitos en el sistema nervioso central (SNC) y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP). En el SNC, los oligodendrocitos extienden sus procesos, se alinean y son capaces de envolver ciertos axones (Baumann and Pham-Dinh, 2001). A pesar de su gran importancia, por mucho tiempo las señales moleculares que regulaban la formación y maduración sináptica, como también la comprensión de las señales moleculares en la mielinización se presentaron como procesos moleculares desconocidos (Chen and Nedivi, 2010; Nave and Salzer, 2006).

Asimismo, los co-cultivos mixtos de neuronas y glías convencionales no son precisos en determinar, de manera óptima, la función glial en el proceso sináptico, como también en la mielinización. Por lo tanto, es como las plataformas de microfluidos permiten la generación de sistemas compartimentalizados y aproximaciones experimentales más concretas, compuestas por diferentes compartimentos tanto para los cuerpos celulares, como también para los axones y las células gliales (Park et al., 2012). Así, los diversos dispositivos compartimentalizados, basados en microfluídica, se encuentran separados por pequeños microcanales que permiten el aislamiento fluídico entre los compartimentos somal y axo-glial. Este enfoque permite organizar el cultivo neuronal de manera de imitar la conectividad *in vivo*, lo que permite estudiar estos procesos de manera más fisiológica (Taylor et al., 2010). Las plataformas compartimentalizadas, basadas en microfluidos, tienen por ventaja que permiten la transfección localizada, el tratamiento diferencial de medicamentos y la adición de moléculas específicas o factores tróficos en la zona neuronal o la zona axo-glial, como también proporcionan un control de la distribución espacial del co-cultivo permitiendo la obtención de imágenes dinámicas de contacto sináptico con alta resolución espacial y temporal (Park et al., 2012; Taylor and Jeon, 2011) (**Figura 2**).

Figura 2



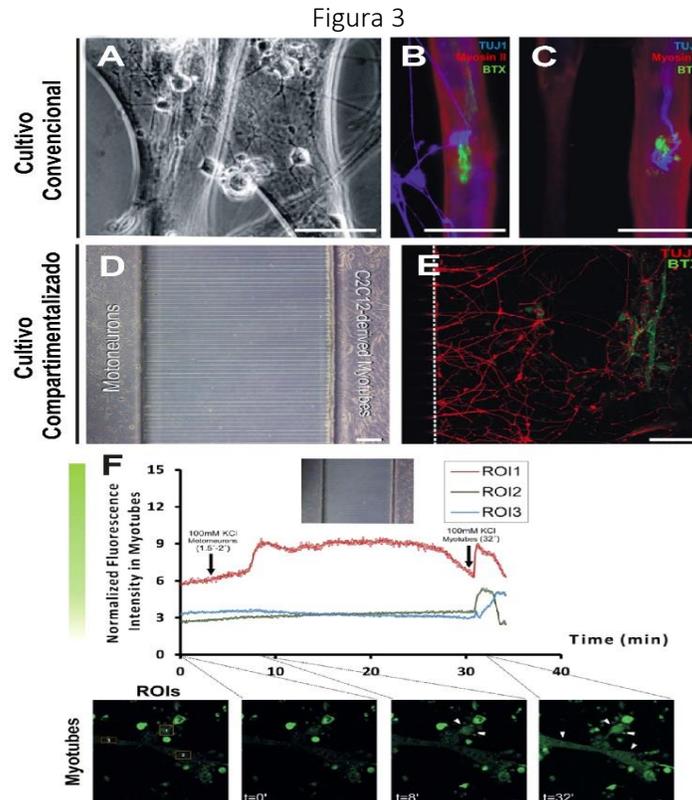
Cultivo compartimentalizado. (A) Disección de cerebro de ratón para estudios de cultivo celular; (B) Cultivo primario convencional de neuronas hipocámpicas obtenidas de cerebro de ratón; (C) Cultivo primario de neuronas hipocámpicas en un sistema compartimentalizado; se observa la separación del soma neuronal con respecto a su prolongada extensión axonal. Barra de escala: B-C= 50 μ m.

Fuente: Rosas, Cisterna & Reginensi (2019)

Durante la última década, varios estudios han aprovechado la tecnología de microfluidos para comprender mejor los mecanismos que subyacen al comportamiento axonal, como el transporte axonal, la síntesis de proteínas locales y la sinaptogénesis (Deglincerti et al., 2015; Coquinco et al., 2014; Cox et al., 2008; Wu et al., 2005). Los dispositivos microfluídicos han sido de suma importancia para comprender el detalle de los mecanismos que subyacen en el tráfico axonal y el crecimiento axonal (Yi et al., 2015). La traducción local en axones, particularmente en conos de crecimiento, ahora es ampliamente aceptada, y esto se debió principalmente al uso de dispositivos

microfluídicos en estudios que utilizan fracciones axonales aisladas. Por ejemplo, Cox y cols. mediante un sistema de microfluídica compartimentalizado describieron la traducción de ARNm axonal en la regulación de la supervivencia neuronal y la transcripción nuclear provocada por la aplicación axonal de la neurotrofina, factor de crecimiento neuronal (NGF). Observaron que esta neurotrofina desencadena la síntesis de proteínas axonales de manera retrógrada siendo necesaria para la supervivencia neuronal (Cox et al., 2008). Siguiendo esta línea Deglincerti y colaboradores aprovechando también la característica inherente de los sistemas compartimentalizados para poder aislar el cuerpo neuronal de los axones, han demostrado que el crecimiento axonal inducido por el NGF en las neuronas se basa en la actividad ubiquitina-proteasoma que es capaz de inducir procesos de ubiquitinación en los conos de crecimiento sugiriendo la síntesis y degradación de proteínas locales axonales (Deglincerti et al., 2015). Otra investigación interesante es la de Coquinco y cols. que desarrolló un dispositivo microfluídico de tres compartimentos para crear un modelo de estudio de la competencia sináptica *in vitro*. En este modelo, los axones se originan a partir de dos compartimentos separados que establecen conectividad con una población neuronal común en un tercer compartimento central. Al inhibir la actividad neuronal en una de las cámaras laterales, los axones en el compartimento central que derivan de las neuronas no tratadas formaron un mayor número de sinapsis en comparación con las derivadas del cultivo neuronal reprimido, demostrando que la disminución de la actividad de una población neuronal puede influir en el crecimiento axonal y la formación de circuitos sinápticos, con respecto a una población neuronal competidora (Coquinco et al., 2014).

En este sentido, utilizando también sistemas de microfluídica se han diseñado diversos modelos para explorar y desentrañar los mecanismos de formación, estabilización y degeneración de la unión neuromuscular (NMJ) (Zahavi et al., 2015; Uzel et al., 2014; Southam et al., 2013; Takeuchi et al., 2011). Takeuchi y cols. propusieron el primer sistema compartimentalizado diseñado para imitar el sistema neuromuscular. Además de los compartimentos individualizados, que separaban las neuronas de los miocitos, su diseño también incluía arreglos de microelectrodos integrados embebidos en el sustrato, que se usaban para estimular localmente las neuronas y registrar la actividad de las neuronas y las células musculares (Takeuchi et al., 2011), mientras que otros estudios demostraron el transporte retrógrado del factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) secretado desde músculo a la neurona (Zahavi et al., 2015). En la misma línea de investigación, Seira y cols. utilizaron sistemas microfluídica para obtener un co-cultivo de motoneurona con miotubos derivados de C2C12 para imitar la formación de la unión neuromuscular; además mediante la integración con la técnica de imagen de calcio (Ca^{2+}) demostraron la funcionalidad NMJ al observar transientes transitorios de Ca^{2+} inducido por KCl (Seria et al., 2015) (Figura 3). De manera complementaria, los sistemas compartimentalizados de microfluídica también se han utilizado con éxito para realizar co-cultivos con neuronas autónomas y cardiomiocitos (Oiwa et al., 2016; Uzel et al., 2014).



Sistema microfluídico compartimentalizado de estudio de formación de unión neuromuscular. (A) Microfotografía de co-cultivo convencional de motoneuronas y miotubos; (B-C) Microscopía de fluorescencia de formación de unión neuromuscular mediante marcaje de motoneuronas (en azul, TUJ⁺), miotubos (en rojo, myosin II) y contacto sináptico (en verde, Alexa-BTX⁺); (D) Imagen de contraste de fases de motoneuronas (izq.) y células C2C12 diferenciadas (der.) separadas por microcanales en un sistema compartimentalizado; (E) microfotografía de fluorescencia de axones de motoneuronas (en rojo, TUJ1⁺) que establecen sinapsis (en verde, Alexa-BTX⁺) con miotubos derivados de la línea C2C12. (F) Estudio de transientes de Ca²⁺ en co-cultivo de motoneuronas y miotubos. Se observa que la estimulación de KCl (100 mM) en el compartimiento somal de las motoneuronas induce transientes de calcio, específicamente, en los miotubos conectados funcionalmente a axones neuronales (indicado por ROI1). Después de adicionar KCl (t=1,5-2,0 [m]) se observa un aumento progresivo del nivel calcio para llegar a la línea basal (t=30 [m]). En el extremo inferior, se representa la intensidad progresiva de los niveles de calcio en distintos tiempos (t=0', t=8' y t=30'). Barra de escala: A-C= 100 μ m; D= 200 μ m y E=100 μ m.

Fuente: Seira et al., Royal Society of Chemistry (RSC) (2015).

La capacidad de las plataformas basadas en microfluidos para aislar espacialmente distintos componentes neuronales ha permitido a los investigadores desarrollar algoritmos computacionales que son adecuados para el procesamiento automático de datos de imágenes axonales (Li et al., 2014). Estos nuevos algoritmos de procesamiento de imágenes fueron elaborados para estudios de comportamiento axonal en sistemas de microfluídica, permitiendo el análisis cuantitativo de la morfología axonal de forma automática y sin sesgos y además aprovechar determinadas características de las

plataformas microfluídicas (p.e, la compartimentación y la transparencia de la cámara). La generación de algoritmos acoplados a sistemas de microfluídica son atractivos para los investigadores, ya que pueden proporcionar cuantificaciones automáticas, robustas y independientes del usuario con respecto al comportamiento de las neuritas en los circuitos neuronales (Li et al., 2014; Frimat et al., 2010).

Por otro lado, la acumulación de daño celular y/o agregados de proteínas anormales es una característica importante de las enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo: la enfermedad de Alzheimer o Parkinson (Calderon-Garciduenas and Duyckaerts, 2017; Kalia and Lang, 2015; Choi et al., 2013). Con esta idea en mente se han creado diversos modelos microfluídicos para estudiar la actividad neuronal en diversas neuropatologías (Zahavi et al., 2015; Gu et al., 2014; Kim et al., 2014; Park et al., 2014; Song et al., 2014).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia en el mundo (Probst et al., 1991). Como principales características fisiopatológicas presenta la acumulación de agregados derivados de la proteína β -amiloide, mayoritariamente en forma de agregados amiloides extracelulares (Hardy, 2017) y de la proteína del citoesqueleto tau, en forma de los ovillos neurofibrilares intracelulares sobretodo en las dendritas (Kametani and Hasegawa, 2018). La generación de proteínas β -amiloide es un ejemplo ampliamente conocido de proteólisis extracelular regulada (Brown et al., 2000). En este proceso, la proteína precursora amiloide (APP) puede ser procesada por dos vías, la amiloidogénica y la no amiloidogénica. Las dos son inherentes del sistema, pero en la EA se desequilibran y se procesa más la APP por la vía amiloidogénica. En este caso la APP es procesada por la β -secretasa, y no por la α -secretasa, y después por la γ -secretasa generando un péptido monomérico de 40-42 aminoácidos (Calderon-Garciduenas and Duyckaerts, 2017). Los monómeros β -amiloides tienden a agregarse y polimerizarse, formando oligómeros, que a su vez, contribuyen a las protofibrillas, y las protofibrillas a las fibrillas. Estas formas terminan agregándose extracelularmente formando las placas amiloides típicas de la enfermedad. Aunque existe un consenso general de que la β -amiloide induce la enfermedad de Alzheimer, existe controversia en torno a la pregunta de qué entidad molecular de la β -amiloide es la más tóxica y desempeña un papel principal en la causa de la enfermedad (Bucciantini et al., 2002; Lambert et al., 1998). Se cree que β -amiloide se internaliza preferentemente en los axones distales y contribuye a la apoptosis, sin embargo, la mayor parte de esta información se ha obtenido retrospectivamente en base a exámenes de cerebros tras autopsia postmortem (Song et al., 2011). Por lo tanto, sigue siendo poco claro si el β -amiloide realmente se propaga a través de conexiones neuroanatómicas y, si es así cómo se transmite. Estas preguntas son significativas porque la comprensión de la progresión patológica de la enfermedad podría ser importante para inhibir el progreso de la EA. Sin embargo, este tema ha sido abordado por pocos estudios, probablemente porque la mayoría del trabajo se ha centrado en los efectos tóxicos del β -amiloide (Song et al., 2014).

Por ejemplo, Choi y cols. para estudiar la neurotoxicidad de factores neurotóxicos crearon

un sistema de microfluidos biomiméticos que genera flujos de presión osmótica, similares a los gradientes del fluido intersticial cerebral, que contenían β -amiloide difusible y evaluaban los efectos de esta proteína en cultivo primarios neuronales. Esta plataforma no solo imita las condiciones fisiológicas del cerebro, sino que también ayuda a comprender el mecanismo de la β -amiloide en el flujo de líquido intersticial cerebral (Choi et al., 2013). Otros estudios, realizados con neuronas corticales en cámaras de microfluidos han observado como los procesos axonales son capaces de internalizar el β -amiloide y transportarlo de forma retrógrada al cuerpo neuronal. Éste se acumula en los axones distróficos y también las mitocondrias y lisosomas del cuerpo neuronal (Song et al., 2014). Esta información es crítica, debido a que si el β -amiloide transportado retrógradamente, a nivel neuronal, quizás se puede transmitir a otras neuronas. Esto abre una pregunta muy importante, ya que este proceso podría ser esencial para la propagación de la enfermedad en las diferentes regiones afectadas (Guo and Lee, 2014; Walker et al., 2013).

El uso de sistemas de microfluídica también se ha utilizado en el estudio de la difusión de los agregados de α -sinucleína típicos de la segunda enfermedad neurodegenerativa en número de pacientes, la enfermedad de Parkinson. Se trata de un desorden progresivo caracterizado por, inicialmente, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra del cerebro, junto con la agregación anormal de proteínas intracelulares tales como la α -sinucleína, formando los cuerpos de Levy (Lees, 2009). Las neuronas de la sustancia nigra principalmente inervan el cuerpo estriado mediante neurotransmisión dopaminérgica que permite controlar la uniformidad, finura y sutileza de los movimientos voluntarios. Por tanto, cuando estas neuronas fallan, aparecen los temblores típicos de los pacientes de Parkinson (Kalia and Lang, 2015).

En este campo encontramos ejemplos del uso de modelos de microfluídica como el trabajo de Freundt y cols. donde observan realizan un estudio demuestra que las fibrillas de α -sinucleína se internalizan, se transportan de manera retrograda, a nivel axonal, para ser liberadas a otras neuronas secundarias. La transferencia de fibrillas de α -sinucleína podría explicar el patrón característico de la diseminación de cuerpos de Lewy entre áreas cerebrales conectadas anatómicamente (Freundt et al., 2012). Lu y cols. utilizan un sistema de microfluídica que incluye un gran compartimento, que permite a estudiar el papel del transporte mitocondrial en la degeneración axonal durante la enfermedad de Parkinson. Con este enfoque, los investigadores pudieron realizar imágenes de células en tiempo-real y analizar el movimiento de las mitocondrias axonales marcadas a lo largo del tiempo, surgiendo como un sistema prometedor para comprender mejor la degeneración axonal (Lu et al., 2012), demostrando una vez más la versatilidad de estos dispositivos de microfluídica.

Como tercer ejemplo concreto del uso de dispositivos de microfluídica en neurobiología encontramos la esclerosis múltiple. Es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central con una variedad de presentaciones y patogénesis. La esclerosis

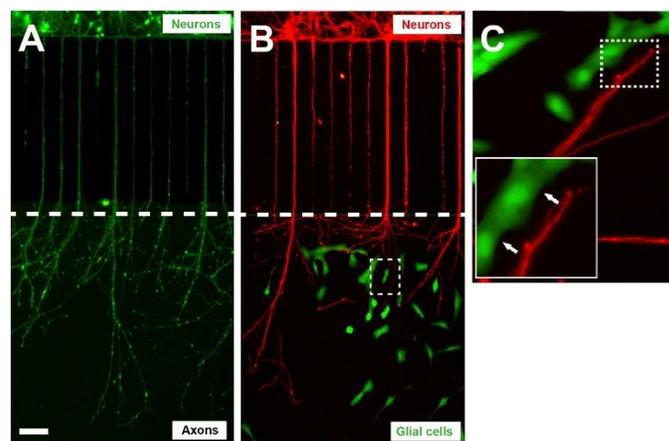
múltiple se ha asociado con el término autoinmunidad, como un sustituto de la patogénesis. La esclerosis múltiple es una enfermedad específica del sistema nervioso que incluye la destrucción de la mielina mediada por el propio sistema inmunitario (Goldenberg, 2012). La comprensión de la etiología de la esclerosis múltiple es compleja y, por ello, es de importancia el entendimiento de los mecanismos que mantienen la integridad de los axones para la búsqueda de tratamientos para la enfermedad (Lemus et al., 2018). Estudios recientes han demostrado los beneficios de usar un microsistema compartimentalizados de neuronas y células gliales para estudiar el proceso de mielinización en diferentes condiciones experimentales in vitro (Li et al., 2012; Park et al., 2012; Yang et al., 2012). Por ejemplo, Park y cols. desarrollaron una plataforma de microfluídica para un co-cultivo de neuronas y oligodendrocitos en compartimientos separados por microcanales que proporcionan el aislamiento físico de los somas neuronales, pero no los axones con un mantenimiento de la conservación de aislamiento fluido. Este estudio observó que el crecimiento axonal es mejorado en presencia del componente glial, como también se observa a los oligodendrocitos alineados a las fibras axonales en un patrón similar al encontrado en los tractos de materia blanca in vivo (Park et al., 2009). En otro estudio, se desarrolló un atractivo sistema de microfluídica compartimentalizado que permite realizar diferentes configuraciones de co-cultivo experimental con hasta seis tratamientos farmacológicos diferentes, en paralelo, en el mismo microdispositivo. Con esta plataforma, se pudieron estudiar simultáneamente la comunicación axón-glía, el desarrollo y la diferenciación de oligodendrocitos, así como las respuestas axonales específicas a diferentes estímulos (Park et al., 2012). Yang y cols. establecieron un protocolo de estimulación eléctrica intermitente capaz de inducir la formación de la vaina de mielina. Este logro podría ser clínicamente relevante ya que se sabe que la estimulación eléctrica funcional promueve la regeneración después de una lesión experimental de la médula espinal (Yang et al., 2012). Finalmente, combinando sistema de microfluídica con células madre surgen nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple y las leucodistrofias que comienzan a ser explorados. En un estudio reciente, se han realizado co-cultivos de neuronas y oligodendrocitos derivados de células madre embrionarias de ratón en un microdispositivo compartimentalizado logrando establecer una nueva e innovadora aproximación, como modelo de formación in vitro de mielina (Kerman et al., 2015).

El daño al SNC de los mamíferos adultos, generalmente, conlleva a déficits neurológicos persistentes con una recuperación funcional limitada. Muchos estudios se han centrado en la prevención de los daños neuronales y la restauración de las conexiones funcionales que se ven comprometidas después de una lesión o daño patológico. En comparación con el SNP, la problema en la regeneración del SNC adulto se atribuye, en gran parte, a dos aspectos básicos: influencias ambientales inhibitorias y capacidades de crecimiento disminuidas de las neuronas adultas del SNC (Fitch and Silver, 2008).

Desde la demostración temprana del crecimiento exitoso de los axones del SNC lesionados en el nervio periférico injertado (David and Aguayo, 1981), se han identificado múltiples factores inhibidores del crecimiento axonal del SNC y que se asocian principalmente a proteínas inhibitorias mielina (como, las proteínas Nogo-A, MAG, OMgp) (Reginensi et al., 2015; Reginensi et al., 2012) y diversas moléculas inhibitorias asociadas a la cicatriz meningo-glial (como los proteoglicanos de sulfato de condroitina, CSPG) (Reginensi et al., 2015; Yiu and He, 2006). Sin embargo, el bloqueo de estas señales inhibitorias extracelulares por sí solo a menudo es insuficiente para que la mayoría de los axones lesionados logren la regeneración a larga distancia (Reginensi et al., 2015), ya que la capacidad regenerativa intrínseca de las neuronas del SNC maduras también es un factor determinante para el recrecimiento de los axones (Sun et al., 2011).

Si bien los modelos animales son indispensables para la comprensión de las lesiones del SNC y las estrategias de regeneración funcional, los modelos *in vitro* se han diseñado para abordar preguntas específicas y únicas debido a su accesibilidad a manipulaciones experimentales y su costo relativamente bajo. Sin embargo, el sistema de cultivo convencional, a menudo, tienen que usar cultivos neuronales a baja densidad celular y solo durante un corto período de tiempo debido a dificultades técnicas para monitorear y cuantificar el crecimiento axonal (Kim et al., 2014). Para desarrollar estrategias regenerativas efectivas del SNC, una evaluación rápida y confiable del crecimiento axonal es fundamental no solo para identificar y seleccionar moléculas candidatas potencialmente interesantes que promuevan la extensión del axón sobre las moléculas inhibitorias, sino que también descartar las moléculas poco eficientes. El surgimiento de la tecnología de microfluidos ofrece muchas ventajas y versatilidades para los estudios de la interacción neurona-glía y la regeneración axonal (**Figura 4**).

Figura 4



Sistema microfluídico compartimentalizado de estudio de interacción neurona-glía. (A) Cultivo compartimentalizado de neuronas (en verde, TUJ⁺); (B-C) Cultivo compartimentalizado de neuronas (en rojo, TUJ⁺) asociado a células gliales (en verde) que son capaces de interactuar con la zona axonal. Barra de escala: A-B= 25 μ m.

Fuente: Reginensi et al., Cellular and Molecular Life Science (CMLS) (2015).

Por ejemplo, Park y cols. presentan un sistema de microchip que es capaz de aislar axones del SNC de cuerpos celulares neuronales para un análisis de crecimiento axonal cuantitativo rápido y fácil. Usando este dispositivo de microfluídica en neuronas corticales, probaron el efecto de varios componentes de la matriz extracelular (p.e colágeno, laminina) y, al utilizar moléculas inhibitorias regenerativas, tales como: CSPG se observa una inhibición del crecimiento de los axones (Park et al., 2014). Luego de 24 horas en contacto con el CSPG, un recrecimiento de los axones lesionados es extremadamente limitado. Sin embargo, se observa restablecimiento del recrecimiento de los axones cuando fueron tratados con condroitinasa ABC (ChABC), una enzima que corta las cadenas laterales del CSPG, por lo que logra reprimir su efecto inhibitorio. Esta enzima pierde su actividad enzimática rápidamente a los 37°C, por lo cual requiere ser inyectada constantemente, razón por la cual no sería factible aplicarla en un ambiente in vivo. En estudios recientes están haciendo pruebas con un ChABC termoestabilizado in vitro para ser utilizado en humanos (Lee et al., 2010). Este modelo de microfluídica fue creado con el propósito de replicar de manera in vitro lesiones neuronales de una forma controlada. Mediante el mismo se pueden controlar las dimensiones de las lesiones inducidas y la distancia de la lesión con respecto al soma, manteniendo las porciones distales y proximales de los axones (Park et al., 2009). Peyrin y cols. desarrollaron un dispositivo microfluídico de tres compartimentos, con un control espacio-temporal de alta precisión, para estudiar la degeneración axonal simultánea y los mecanismos de muerte de los axones del SNC sometidos a axotomía y observaron una rápida degeneración tipo-walleriana en los axones distales cortados, idéntica a la observada en los procesos de axotomía in vivo (Kilinc et al., 2011). Hosmane y cols. fueron capaces de confeccionar una versión circular multiplexada de una plataforma de microfluídica que demostraba un aumento de la acumulación de microglia en la zona de los axones lesionados, como un evento relacionado con el mantenimiento y la progresión de diversas enfermedades crónicas neuroinflamatorias y neurodegenerativas (Hosmane et al., 2010).

En otra instancia, las plataformas microfluídicas se han utilizado como herramientas valiosas para estudiar la regeneración de axones in vivo. Muchos organismos modelo, como *Aplysia Californica*, *Caenorhabditis Elegans*, *Drosophila Melanogaster* y el pez cebra, se han utilizado para estudios de lesión y regeneración de neuronas in vivo (Hosmane et al., 2011; Chokshi et al., 2009; Guo et al., 2008b). *Caenorhabditis elegans*, en particular, proporciona un paradigma interesante para estudiar la lesión y la regeneración del sistema nervioso, ya que su genoma se ha secuenciado completamente y su axotomía in vivo es muy factible. El paso crítico de inmovilizar al gusano y someterlo a una axotomía se ha realizado convencionalmente mediante el uso de pegamento y anestésicos, en donde estos métodos pueden tener efectos tóxicos desconocidos que son difíciles de evaluar o requieren mucho trabajo y son de bajo rendimiento (Chokshi et al., 2009; Guo et al., 2008b). Las plataformas microfluídicas pueden proporcionar una alternativa inteligente a estas técnicas. Así es, como Chokshi y cols. desarrollaron plataformas de microfluidos para inmovilizar gusanos individuales a corto o largo plazo para caracterizar su comportamiento en el sistema microfluídico. La inmovilización se

logra en base a dos enfoques; o bien el CO₂ se utiliza para cambiar el microambiente y el cese del movimiento del gusano a largo plazo, o usa una membrana deformable para restringir mecánicamente el gusano (Chokshi et al., 2009). Estas plataformas permiten estudiar la regeneración axonal e integrar imágenes de alto rendimiento. El potencial de automatización es alto en estas plataformas debido a su pequeño tamaño y escala, lo que permite un elevado y robusto rendimiento en estudios de regeneración axonal (Chokshi et al., 2009; Chung et al., 2008). Guo y cols. desarrollaron una plataforma microfluídica de alto rendimiento para estudios de regeneración en nervios *in vivo* que permite la nanocirugía de los nematodos que se puede utilizar en combinación con técnicas de ablación por láser altamente específicas para lesionarlos una vez que se han inmovilizado constantemente, observándose axotomías diferenciales en función de la frecuencia o la tasa de repetición del láser (Guo et al., 2008b). Este dispositivo microfluídico presenta muchas ventajas al momento de estudiar a *C. Elegans*, tales como: (i) el hecho de que ningún químico aparte de los sustratos interferirá en el crecimiento de los gusanos, (ii) la deflexión adaptiva de la membrana permite la inmovilización de los gusanos de múltiples tamaños, (iii) los gusanos no requieren un tiempo de recuperación luego de las cirugías, (iv) las condiciones experimentales son fáciles de reproducir y finalmente, (v) el diseño del chip es lo suficientemente simple como para ser adaptado para otros organismos, u otros experimentos (Guo et al., 2008a).

Conclusión

El entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan la degeneración y regeneración es una base fundamental para el desarrollo de estrategias protectoras y regenerativas potenciales para el tratamiento de desórdenes y lesiones neurológicas. Los dispositivos basados en microfluidos han surgido como nuevas plataformas *in vitro* para la investigación neurobiológica debido a sus excelentes capacidades de control espacial y temporal, fácil ensamblaje, alta reproducibilidad, capacidad para realizar análisis de imágenes y bioquímicos. Además su potencial de alto rendimiento en procesos fisiológicos relevantes ayudan a responder algunas preguntas fundamentales de la neurobiología moderna, como por ejemplo, cómo los axones en crecimiento convierten señales externas en eventos intracelulares y cómo el microambiente neural es capaz de moldear decisiones en un sistema nervioso lesionado.

La lesión nerviosa es un fenómeno ampliamente observado, pero difícil de estudiar, particularmente *in vivo*. Una comprensión más completa de la neurobiología de la lesión nerviosa y la regeneración neural puede mejorar los resultados de reparación y recuperación funcional basados en células madres, los biomateriales y las intervenciones quirúrgicas. Por lo tanto, los métodos *in vitro* son interesantes para observar con precisión, a nivel microscópico, la lesión nerviosa y desarrollar diferentes estrategias de reparación. Las plataformas microfluídicas utilizadas para estudiar la lesión del SNC ofrecen muchas ventajas sobre los modelos tradicionales *in vitro* o *in vivo*. Los canales microfluídicos desarrollados para crear regiones de aislamiento fluido pueden ser simples y construirse con dispositivos microfluídicos disponibles comercialmente (Taylor

et al., 2005), o pueden ser extremadamente complejos y difíciles de fabricar en la mayoría de los laboratorios biológicos. Los continuos avances en el campo de la microtecnología permite la creación de dispositivos capaces de estudiar la regeneración a escala celular reduccionista, lo que permite la capacidad de desentrañar mecanismos que pueden perderse en el complejo entorno *in vivo*. Sin embargo, cada una de estas plataformas de lesiones tiene varias ventajas y desventajas que deben considerarse cuidadosamente antes de decidir qué plataforma usar para un estudio en particular. Esta capacidad permite que las plataformas microfluídicas imiten fenómenos diversos procesos neurofisiológicos, como: el crecimiento axonal, los procesos sinápticos, la interacción neurona-glía y el daño axonal. La lesión química se puede lograr fácilmente dentro de una plataforma microfluídica, mientras que la lesión física se logra a través de la incorporación de otras tecnologías, como los láseres, las micro-cuchillas y las válvulas de compresión. La lesión química, sin embargo, no captura la respuesta completa de la lesión al trauma físico.

El entorno de la zona lesionada, en el sistema nervioso central, también se puede modelar, a través de modificaciones químicas de la superficie del microdispositivo o la alteración de los flujos de fluidos. Si bien la potencia de los dispositivos microfluídicos se encuentra en sus entornos reduccionistas y altamente controlables, los dispositivos microfluídicos no asemejan perfectamente al entorno *in vivo*, debido a la enorme complejidad de biomimetizar la gran variedad de variables moleculares presentes en el microambiente del daño neuronal. Además, cantidades minúsculas de medios pueden dar lugar a problemas de viabilidad celular debido a la evaporación y la dificultad potencial para mantener las condiciones de cultivo celular, si no se gestionan de forma estricta.

In vivo, la microfluídica permite el rendimiento de la detección de alto rendimiento de compuestos regenerativos en los sistemas modelo de *Drosophila* y *C. Elegans* sin el uso de anestésicos. En resumen, cada una de estas plataformas debe ser acordemente estudiada y analizada para evaluar ventajas y desventajas de las mismas para encontrar la manera de implementar métodos para disminuir las desventajas que estas plataformas presenten. Ejemplo de esto se puede observar principalmente en los dispositivos microfluídicos encargados de la representación de lesiones neuronales, las cuales realmente pueden ser muy variadas y no van a poder ser representadas en su totalidad en un dispositivo microfluídico. Esto representa una desventaja, pero si a futuro se logra implementar soluciones para esto como la creación de un dispositivo microfluídico capaz de representar todas las lesiones presentes, o al menos una gran variedad de ellas, puede representar un gran avance en el estudio de lesiones neuronales.

Debido a esto, se puede asegurar que han sido grandes los avances presenciados en el área, pero aún hay mucho más por descubrir en la misma, principalmente por el hecho de que es un área en temprano desarrollo y tiene un gran campo que cubrir, lo cual es demostrado en las expectativas que tiene el área, principalmente en el área de biomimesis, ya que se habla de dispositivos capaces de replicar de mejor manera el

ambiente tridimensional de la regeneración *in-vivo*, además de lograr la incorporación de avances en otros campos de la biomedicina como la optogenética y el área de los biosensores con el objetivo de extender los hallazgos de estudios celulares y acercarse más al desarrollo de terapias clínicas para mejorar la regeneración neuronal tanto en el Sistema Nervioso Central como en el Sistema Nervioso Periférico.

En conclusión, la microfluídica en el área de la biociencia es un campo que ha contribuido ampliamente para la comprensión de lo que ocurre en el sistema nervioso y ha permitido el desarrollo de técnicas para la regeneración neuronal y comprensión de diversas enfermedades neurodegenerativas que, a largo plazo, lograrán ser implementadas en un ambiente *in-vivo*, contribuyendo de esta manera a la ciencia, la tecnología y al sector de salud.

Agradecimientos

Este artículo de revisión bibliográfica titulado: “Microfluídica, como plataforma de estudio de neurobiología” forma parte del Proyecto de Título de L.R. Este artículo de investigación es apoyado por la Convocatoria de Fomento de Investigación y Desarrollo, SENACYT (FID17, SENACYT) titulado “Terapias Avanzadas para el estudio de Regeneración Axonal” que tiene como investigador principal a D.R.; complementariamente, D.R agradece al Sistema Nacional de Investigadores (SNI), SENACYT por apoyar su desarrollo en la investigación panameña.

Se agradece también al Dr. Andreu Matamoros del grupo Neurobiotecnología Molecular y Celular, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona, España y al Dr. Oscar Seira, investigador postdoctoral, del International Collaboration on Repair Discoveries (ICORD), University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canada por sus críticas constructivas a lo largo de su desarrollo de este artículo científico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baumann, N., and D. Pham-Dinh. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*. 81:871-927.

Beebe, D.J., G.A. Mensing, and G.M. Walker. 2002. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual review of biomedical engineering*. 4:261-286.

Brown, M.S., J. Ye, R.B. Rawson, and J.L. Goldstein. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*. 100:391-398.

Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C.M. Dobson, and M. Stefani. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*. 416:507-511.

Calderon-Garciduenas, A.L., and C. Duyckaerts. 2017. Alzheimer disease. *Handbook of*

clinical neurology. 145:325-337.

- Cea, L.A., B.A. Cisterna, C. Puebla, M. Frank, X.F. Figueroa, C. Cardozo, K. Willecke, R. Latorre, and J.C. Saez. 2013. De novo expression of connexin hemichannels in denervated fast skeletal muscles leads to atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:16229-16234.
- Chen, J.L., and E. Nedivi. 2010. Neuronal structural remodeling: is it all about access? *Current opinion in neurobiology*. 20:557-562.
- Choi, Y.J., S. Chae, J.H. Kim, K.F. Barald, J.Y. Park, and S.H. Lee. 2013. Neurotoxic amyloid beta oligomeric assemblies recreated in microfluidic platform with interstitial level of slow flow. *Scientific reports*. 3:1921.
- Chokshi, T.V., A. Ben-Yakar, and N. Chronis. 2009. CO₂ and compressive immobilization of *C. elegans* on-chip. *Lab on a chip*. 9:151-157.
- Chung, K., M.M. Crane, and H. Lu. 2008. Automated on-chip rapid microscopy, phenotyping and sorting of *C. elegans*. *Nature methods*. 5:637-643.
- Cisterna, B.A., C. Cardozo, and J.C. Saez. 2014. Neuronal involvement in muscular atrophy. *Frontiers in cellular neuroscience*. 8:405.
- Cisterna, B.A., A.A. Vargas, C. Puebla, and J.C. Saez. 2016. Connexin hemichannels explain the ionic imbalance and lead to atrophy in denervated skeletal muscles. *Biochimica et biophysica acta*. 1862:2168-2176.
- Coquinco, A., L. Kojic, W. Wen, Y.T. Wang, N.L. Jeon, A.J. Milnerwood, and M. Cynader. 2014. A microfluidic based in vitro model of synaptic competition. *Molecular and cellular neurosciences*. 60:43-52.
- Cox, L.J., U. Hengst, N.G. Gurskaya, K.A. Lukyanov, and S.R. Jaffrey. 2008. Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nature cell biology*. 10:149-159.
- David, S., and A.J. Aguayo. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science (New York, N.Y.)*.

214:931-933.

Deglincerti, A., Y. Liu, D. Colak, U. Hengst, G. Xu, and S.R. Jaffrey. 2015. Coupled local translation and degradation regulate growth cone collapse. *Nature communications*. 6:6888.

Elveflow. 2018. Microfluidic Mixers: A Short Review.

Fitch, M.T., and J. Silver. 2008. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology*. 209:294-301.

Freundt, E.C., N. Maynard, E.K. Clancy, S. Roy, L. Bousset, Y. Sourigues, M. Covert, R. Melki, K. Kirkegaard, and M. Brahic. 2012. Neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. *Annals of neurology*. 72:517-524.

Frimat, J.P., J. Sisnaïske, S. Subbiah, H. Menne, P. Godoy, P. Lampen, M. Leist, J. Franzke, J.G. Hengstler, C. van Thriel, and J. West. 2010. The network formation assay: a spatially standardized neurite outgrowth analytical display for neurotoxicity screening. *Lab on a chip*. 10:701-709.

Goldenberg, M.M. 2012. Multiple sclerosis review. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. 37:175-184.

Gu, L., B. Black, S. Ordonez, A. Mondal, A. Jain, and S. Mohanty. 2014. Microfluidic control of axonal guidance. *Scientific reports*. 4:6457.

Guo, J.L., and V.M. Lee. 2014. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nature medicine*. 20:130-138.

Guo, S.X., F. Bourgeois, T. Chokshi, N.J. Durr, M.A. Hilliard, N. Chronis, and A. Ben-Yakar. 2008a. Femtosecond laser nanoaxotomy lab-on-a-chip for in vivo nerve regeneration studies. *Nature methods*. 5:531-533.

Guo, S.X., F. Bourgeois, T. Chokshi, N.J. Durr, M.A. Hilliard, N. Chronis, and A. Ben-Yakar. 2008b. Femtosecond laser nanoaxotomy lab-on-a-chip for in vivo nerve regeneration studies. *Nature methods*. 5:531-533.

Halldorsson, S., E. Lucumi, R. Gomez-Sjoberg, and R.M.T. Fleming. 2015. Advantages and

challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors & bioelectronics*. 63:218-231.

Hardy, J. 2017. The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the "amyloid cascade hypothesis". *The FEBS journal*. 284:1040-1044.

Hosmane, S., A. Fournier, R. Wright, L. Rajbhandari, R. Siddique, I.H. Yang, K.T. Ramesh, A. Venkatesan, and N. Thakor. 2011. Valve-based microfluidic compression platform: single axon injury and regrowth. *Lab on a chip*. 11:3888-3895.

Hosmane, S., I.H. Yang, A. Ruffin, N. Thakor, and A. Venkatesan. 2010. Circular compartmentalized microfluidic platform: Study of axon-glia interactions. *Lab on a chip*. 10:741-747.

Kalia, L.V., and A.E. Lang. 2015. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*. 386:896-912.

Kametani, F., and M. Hasegawa. 2018. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*. 12:25.

Kerman, B.E., H.J. Kim, K. Padmanabhan, A. Mei, S. Georges, M.S. Joens, J.A. Fitzpatrick, R. Jappelli, K.J. Chandross, P. August, and F.H. Gage. 2015. In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*. 142:2213-2225.

Kilinc, D., J.M. Peyrin, V. Soubeyre, S. Magnifico, L. Saias, J.L. Viovy, and B. Brugg. 2011. Wallerian-like degeneration of central neurons after synchronized and geometrically registered mass axotomy in a three-compartmental microfluidic chip. *Neurotoxicity research*. 19:149-161.

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

Kim, S., J. Park, A. Han, and J. Li. 2014. Microfluidic systems for axonal growth and regeneration research. *Neural regeneration research*. 9:1703-1705.

Lambert, M.P., A.K. Barlow, B.A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T.E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K.L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C.E. Finch, G.A. Krafft, and W.L. Klein. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central

- nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:6448-6453.
- Lee, H., R.J. McKeon, and R.V. Bellamkonda. 2010. Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:3340-3345.
- Lees, A.J. 2009. The Parkinson chimera. *Neurology*. 72:S2-11.
- Lemus, H.N., A.E. Warrington, and M. Rodriguez. 2018. Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurologic clinics*. 36:1-11.
- Li Jeon, N., H. Baskaran, S.K. Dertinger, G.M. Whitesides, L. Van de Water, and M. Toner. 2002. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature biotechnology*. 20:826-830.
- Li, L., L. Ren, W. Liu, J.C. Wang, Y. Wang, Q. Tu, J. Xu, R. Liu, Y. Zhang, M.S. Yuan, T. Li, and J. Wang. 2012. Spatiotemporally controlled and multifactor involved assay of neuronal compartment regeneration after chemical injury in an integrated microfluidics. *Analytical chemistry*. 84:6444-6453.
- Li, Y., M. Yang, Z. Huang, X. Chen, M.T. Maloney, L. Zhu, J. Liu, Y. Yang, S. Du, X. Jiang, and J.Y. Wu. 2014. AxonQuant: A Microfluidic Chamber Culture-Coupled Algorithm That Allows High-Throughput Quantification of Axonal Damage. *Neuro-Signals*. 22:14-29.
- Lin, B., and A. Levchenko. 2015. Spatial manipulation with microfluidics. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 3:39.
- Locascio, L.E., C.E. Perso, and C.S. Lee. 1999. Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate. *Journal of chromatography. A*. 857:275-284.
- Lu, X., J.S. Kim-Han, K.L. O'Malley, and S.E. Sakiyama-Elbert. 2012. A microdevice platform for visualizing mitochondrial transport in aligned dopaminergic axons. *Journal of neuroscience methods*. 209:35-39.

- Manz, A., C.S. Effenhauser, N. Burggraf, D.J. Harrison, K. Seiler, and K. Fluri. 1994. Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 4:257-265.
- Millet, L.J., and M.U. Gillette. 2012a. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends in neurosciences*. 35:752-761.
- Millet, L.J., and M.U. Gillette. 2012b. Over a century of neuron culture: from the hanging drop to microfluidic devices. *The Yale journal of biology and medicine*. 85:501-521.
- Nave, K.A., and J.L. Salzer. 2006. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Current opinion in neurobiology*. 16:492-500.
- Oiwa, K., K. Shimba, T. Numata, A. Takeuchi, K. Kotani, and Y. Jimbo. 2016. A device for co-culturing autonomic neurons and cardiomyocytes using micro-fabrication techniques. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 8:341-348.
- Park, H.S., S. Liu, J. McDonald, N. Thakor, and I.H. Yang. 2013. Neuromuscular junction in a microfluidic device. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*. 2013:2833-2835.
- Park, J., S. Kim, S.I. Park, Y. Choe, J. Li, and A. Han. 2014. A microchip for quantitative analysis of CNS axon growth under localized biomolecular treatments. *Journal of neuroscience methods*. 221:166-174.
- Park, J., H. Koito, J. Li, and A. Han. 2009. Microfluidic compartmentalized co-culture platform for CNS axon myelination research. *Biomedical microdevices*. 11:1145-1153.
- Park, J., H. Koito, J. Li, and A. Han. 2012. Multi-compartment neuron-glia co-culture platform for localized CNS axon-glia interaction study. *Lab on a chip*. 12:3296-3304.
- Probst, A., D. Langui, and J. Ulrich. 1991. Alzheimer's disease: a description of the structural lesions. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 1:229-239.
- Reginensi, D., P. Carulla, S. Nocentini, O. Seira, X. Serra-Picamal, A. Torres-Espin, A. Matamoros-Angles, R. Gavin, M.T. Moreno-Flores, F. Wandosell, J. Samitier, X. Trepac,

- X. Navarro, and J.A. del Rio. 2015. Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 72:2719-2737.
- Reginensi, D., S. Nocentini, S. Garcia, P. Carulla, M.T. Moreno-Flores, F. Wandosell, X. Trepas, A. Bribian, and J.A. del Rio. 2012. Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 69:1689-1703.
- Sekhon, B. 2011. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. 2-36 pp.
- Sharp, K., R. Adrian, J. Molho, and J. Santiago. 2002. Liquid Flows in Microchannels. pp. 6-1-38.
- Song, H.L., S. Shim, D.H. Kim, S.H. Won, S. Joo, S. Kim, N.L. Jeon, and S.Y. Yoon. 2014. beta-Amyloid is transmitted via neuronal connections along axonal membranes. *Annals of neurology*. 75:88-97.
- Song, M.S., G.B. Baker, K.G. Todd, and S. Kar. 2011. Inhibition of beta-amyloid1-42 internalization attenuates neuronal death by stabilizing the endosomal-lysosomal system in rat cortical cultured neurons. *Neuroscience*. 178:181-188.
- Southam, K.A., A.E. King, C.A. Blizzard, G.H. McCormack, and T.C. Dickson. 2013. Microfluidic primary culture model of the lower motor neuron-neuromuscular junction circuit. *Journal of neuroscience methods*. 218:164-169.
- Squires, T.M., and S.R. Quake. 2005. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*. 77:977-1026.
- Sun, F., K.K. Park, S. Belin, D. Wang, T. Lu, G. Chen, K. Zhang, C. Yeung, G. Feng, B.A. Yankner, and Z. He. 2011. Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature*. 480:372-375.
- Takeuchi, A., S. Nakafutami, H. Tani, M. Mori, Y. Takayama, H. Moriguchi, K. Kotani, K. Miwa, J.K. Lee, M. Noshiro, and Y. Jimbo. 2011. Device for co-culture of sympathetic neurons and cardiomyocytes using microfabrication. *Lab on a chip*. 11:2268-2275.

- Taylor, A.M., M. Blurton-Jones, S.W. Rhee, D.H. Cribbs, C.W. Cotman, and N.L. Jeon. 2005. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nature methods*. 2:599-605.
- Taylor, A.M., D.C. Dieterich, H.T. Ito, S.A. Kim, and E.M. Schuman. 2010. Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron*. 66:57-68.
- Taylor, A.M., and N.L. Jeon. 2011. Microfluidic and compartmentalized platforms for neurobiological research. *Critical reviews in biomedical engineering*. 39:185-200.
- Uzel, S.G., A. Pavesi, and R.D. Kamm. 2014. Microfabrication and microfluidics for muscle tissue models. *Progress in biophysics and molecular biology*. 115:279-293.
- Walker, L.C., M.I. Diamond, K.E. Duff, and B.T. Hyman. 2013. Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases. *JAMA neurology*. 70:304-310.
- Wang, Y., W.Y. Lin, K. Liu, R.J. Lin, M. Selke, H.C. Kolb, N. Zhang, X.Z. Zhao, M.E. Phelps, C.K. Shen, K.F. Faull, and H.R. Tseng. 2009. An integrated microfluidic device for large-scale in situ click chemistry screening. *Lab on a chip*. 9:2281-2285.
- Whitesides, G.M. 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 442:368-373.
- Whitesides, G.M., E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D.E. Ingber. 2001. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual review of biomedical engineering*. 3:335-373.
- Wong, I.Y., S.N. Bhatia, and M. Toner. 2013. Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine. *Genes & development*. 27:2397-2408.
- Wu, K.Y., U. Hengst, L.J. Cox, E.Z. Macosko, A. Jeromin, E.R. Urquhart, and S.R. Jaffrey. 2005. Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature*. 436:1020-1024.
- Yang, I.H., D. Gary, M. Malone, S. Dria, T. Houdayer, V. Belegu, J.W. McDonald, and N. Thakor. 2012. Axon myelination and electrical stimulation in a microfluidic, compartmentalized cell culture platform. *Neuromolecular medicine*. 14:112-118.

- Yi, Y., J. Park, J. Lim, C.J. Lee, and S.H. Lee. 2015. Central Nervous System and its Disease Models on a Chip. *Trends in biotechnology*. 33:762-776.
- Yiu, G., and Z. He. 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature reviews. Neuroscience*. 7:617-627.
- Zahavi, E.E., A. Ionescu, S. Gluska, T. Gradus, K. Ben-Yaakov, and E. Perlson. 2015. A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system reveals spatial aspects of GDNF functions. *Journal of cell science*. 128:1241-1252.
- Zhang, J., S. Yan, D. Yuan, G. Alici, N.T. Nguyen, M. Ebrahimi Warkiani, and W. Li. 2016. Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review. *Lab on a chip*. 16:10-34.