



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



Centre for Biomaterials
and Tissue Engineering
Universitat
Politécnica de València

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO PARA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE CÉLULAS NEURALES *IN VITRO*



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso Académico: 2019-2020

IRENE GARCÍA JIMÉNEZ

COTUTORES: Cristina Martínez Ramos.

Manuel Monleón Pradas.

TUTOR ACADÉMICO: Ester Giraldo Reboloso.

Curso Académico: 2019-2020

Valencia, Julio 2020

Título	Desarrollo de un dispositivo para estimulación eléctrica de células neurales <i>in vitro</i>
Autora	Irene García Jiménez
Co-Tutores	Dra. Cristina Martínez Ramos Dr. Manuel Monleón Pradas
Tutora académica	Dra. Ester Giraldo Reboloso
Localidad y fecha	Valencia, Julio de 2020

Resumen

La problemática asociada a las patologías del sistema nervioso viene del limitado potencial de regeneración de los tejidos nerviosos, y especialmente del SNC. Las lesiones en estos tejidos suponen un importante problema de salud pública pues su incidencia y prevalencia son muy elevadas, dado que el tejido no se recupera y la lesión es de por vida. Esto supone un coste económico elevado para el sistema sanitario y una baja autoestima por parte del paciente lesionado. En este contexto y para solventar este tipo de lesiones, ha surgido y cobra cada vez más importancia, la ingeniería tisular. Para el sistema nervioso, una aproximación consiste en combinar neuronas y células de soporte en un biomaterial electroconductor que permita la estimulación eléctrica, ya que este estímulo físico es necesario para el correcto desarrollo, funcionamiento y reparación del sistema nervioso.

El presente Trabajo de Fin de Grado se enmarca en este campo de estudio: la regeneración axonal empleando corrientes eléctricas constantes para favorecer la producción de señales de regeneración nerviosa como la secreción de proteínas por parte de las células de soporte y guiar la extensión de las neuritas. Para ello, se ha desarrollado y obtenido un dispositivo para el cultivo celular *in vitro* que permite la integración de fibras guía de Ácido poli-L-láctico (PLA) recubiertas con biomateriales electroconductores como polipirrol (PPy) y oro que pueden acoplarse a un generador de corriente eléctrica. En estas fibras se cultivan células de soporte como células de Schwann (SCs) y neuronas procedentes del ganglio de la raíz dorsal (DRG). Este enfoque, a diferencia de emplear estimulación *in vivo*, está basada en promover la regeneración nerviosa tras una lesión mediante el trasplante de tractos axonales obtenidos *in vitro* empleando ingeniería tisular.

Palabras clave: Ácido poli-L-láctico, Polipirrol, Oro, Ganglio de la raíz dorsal, Células de Schwann, Estimulación eléctrica.

Title	Development of a device for <i>in vitro</i> electrical stimulation of neural cells
Author	Irene García Jiménez
Co-Tutors	Dra. Cristina Martínez Ramos Dr. Manuel Monleón Pradas
Academic Tutor	Dra. Ester Giraldo Reboloso
Place and date	Valencia, July 2020

Abstract

Several issues associated to nervous system pathologies come from the limited potential for regeneration of nervous tissues, especially the CNS. Injuries to these tissues portray a major public health problem since their incidence and prevalence are very high, given that the tissue does not recover and the injury can affect the whole lifespan of the patient. This entails a high economic cost for the sanitary system and a low self-esteem for the injured person. In this context and to solve this type of injury, tissue engineering has emerged and is becoming increasingly important. For the nervous system, one approach is to combine neurons and supporting cells in an electroconductive biomaterial that allows electrical stimulation, since this physical stimulus is necessary for the proper development, function, and repair of the nervous system.

The present End-of-Degree Project is enclosed within this field of study: axonal regeneration using constant electric currents to enhance the production of nerve regeneration signals such as secretion of proteins by supporting cells and guide neurite extension. To this end, a device for *in vitro* cell culture has been developed and obtained which allows the integration of guidance fibers of poly-L-lactic acid (PLA) coated with electroconductive biomaterials such as polypyrrole (PPy) and gold that can be coupled to an electric current generator. Supporting cells such as Schwann cells (SCs) and dorsal root ganglion neurons (DRG) are grown on these fibers. This approach, unlike utilizing stimulation *in vivo*, is based on promoting nerve regeneration after injury by transplanting axonal tracts obtained *in vitro* using tissue engineering.

Key words: Poly-L-lactic acid, Polypyrrole, Gold, Dorsal root ganglion, Schwann cells, Electrical stimulation.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis tutores, Cristina y Manolo por guiarme y aconsejarme en todo momento. También a Nando por enseñarme día a día a trabajar en el laboratorio y tener una paciencia formidable. A Jorge Más por responder a aquel correo inicial que me llevó a realizar este proyecto con ellos y a todo el equipo del CBIT que ha hecho de mi breve estancia una grata experiencia tanto dentro como fuera del laboratorio.

Y por supuesto, gracias a mi familia, que conoce toda la incertidumbre vivida estos últimos meses y me han apoyado incondicionalmente.

ABREVIATURAS

BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
DAPI	4',6-Diamino-2-Fenolindol
DC	Corriente continua
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ES	Estimulación eléctrica
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
FESEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales
NGF	Factor de crecimiento nervioso
PBS	Tampón fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PFA	Paraformaldehído
PLA	Ácido poli-L-láctico
P/S	Penicilina/Estreptomina
PPy	Polipirrol
PTS	<i>Sodium p-toluenesulfonate</i>
SCs	Células de Schwann
SCGS	Suplemento de crecimiento para células de Schwann
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
T/E	Tripsina/EDTA

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción sistema nervioso y daño neural	1
1.1.1. Organización del sistema nervioso	1
1.1.2. Componentes celulares del sistema nervioso	1
1.1.3. Diferencias en la regeneración en el SNP y SNC	2
1.1.4. Aplicación en lesión medular	3
1.2. Terapia celular	4
1.2.1. Terapia celular con células de Schwann	4
1.2.2. Terapia celular con neuronas	6
1.3. Ingeniería tisular para el sistema nervioso	7
1.3.1. Uso del ácido poli-L-láctico	8
1.3.2. Disposición en fibrillas alineadas	9
1.4. Polímeros conductores	9
1.4.1. Recubrimiento con PPy	10
1.4.2. Empleo de oro	10
1.5. Estimulación eléctrica	11
1.5.1. Estimulación <i>in vivo</i>	12
1.5.2. Estimulación <i>in vitro</i>	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Diseño experimental	16
3.2. Obtención de los biomateriales	16
3.2.1. Fibras de PLA	16
3.2.2. Recubrimiento con PPy	17
3.2.3. Fibras de oro	19
3.2.4. Bandas de oro	19
3.3. Fabricación dispositivo estimulación eléctrica	19
3.4 Medida de la conductividad y resistencia	20
3.5. Esterilización, sanitización y acondicionamiento del dispositivo	20
3.6. Ensayo <i>in vitro</i> del cultivo con estimulación eléctrica	21
3.6.1. Cultivo celular de SCs	21

3.6.2. Extracción y cultivo de DRG de pollo	21
3.6.3. Siembra celular en el dispositivo y estimulación eléctrica.....	22
3.7. Caracterización celular <i>in vitro</i>. Técnicas inmunocitoquímicas	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. Caracterización macroscópica	25
4.2. Caracterización eléctrica	26
4.3. Ensayo celular	27
5. CONCLUSIONES.....	33
6. TRABAJO FUTURO.....	34
7. BIBLIOGRAFÍA.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células gliales de soporte neuronal en el SNC (a) y SNP (b) (OpenStax-CNX, 2016).....	2
Figura 2. Regeneración en el SNP (Schmidt & Leach, 2003)	2
Figura 3. Intento de regeneración en el SNC (Schmidt & Leach, 2003).....	3
Figura 4. Fenotipo de reparación de las SCs en respuesta a una lesión nerviosa (El Seblani et al., 2020).	6
Figura 5. Propiedades deseadas en un material de guía para regeneración nerviosa	8
Figura 6. Estructura química del monómero (izquierda) empleado para sintetizar ácido poli-L-láctico (derecha) (Nair & Laurencin, 2007)	9
Figura 7. Esquema de una neurona cultivada sobre fibras de PLA recubiertas con PPy bajo estimulación eléctrica (A). Las fibras alineadas recubiertas permiten guiar el crecimiento del axón (B) (Balint et al., 2014; Vijayavenkataraman, 2020).....	9
Figura 8. Estructura del PPy donde se observan los grupos cargados que favorecen la biocompatibilidad (Brett Runge et al., 2010).....	10
Figura 9. Ilustración esquemática de la alineación de SCs cultivadas en materiales electroconductores y sometidas a corriente eléctrica: (a) alineación de SCs, (b) redistribución de receptores de membrana celular, y (c) vista seccionada de filopodios (las flechas rojas muestran la dirección de movimiento de los receptores de adhesión)(Ya Li et al., 2020).....	13
Figura 10. Fibras de PCL en el cristalizador antes de fundir (A) y bandas lisas de PCL tras fundir (B). Esquema del montaje tipo sándwich para obtener las fibras de PLA (C). Fibras de PLA individuales tras cortar la PCL (D)	17
Figura 11. Polimerización química de PPy empleando cloruro férrico como oxidante. (Mao & Zhang, 2018)	18
Figura 12. Imágenes de morfología superficial obtenidas mediante FESEM de las fibras de PLA (A y B) y de PPy (C y D).....	18
Figura 13. Imagen del generador de corriente eléctrica.....	22
Figura 14. Visualización del montaje de los dispositivos para el cultivo celular. Recubrimiento con oro (A); Recubrimiento con PPy (B) o bandas de oro (C).....	25
Figura 15. Imágenes obtenidas con microscopio de fluorescencia de las SCs sembradas sobre las bandas de oro en ausencia de ES. Se observan las células en verde (S100 β) y en los núcleos en azul (DAPI).....	28
Figura 16. Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (β III tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observó la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre las bandas de oro con las SCs. Las figuras A.1 y B.1 reflejan el detalle a 6.3 aumentos de las figuras A y B respectivamente. Se trata del grupo control.....	29
Figura 17. Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (β III tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observa la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre la banda de oro con las SCs a distintas intensidades de corriente.....	29
Figura 18. Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (β III tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observa la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre las fibras de PLA recubiertas de PPy con las SCs	30

Figura 19. *Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (βIII tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observa la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre el sistema combinado con las SCs..... 31*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos del ensayo. Para la ES se fijan la corriente con el generador a 50 mA y 100 mA y se llevan a cabo 4 series de estimulación, 2 series para las SCs y 2 series para las SCs junto con el DRG. Cada serie de estimulación comprende 24 horas (20 hrs sin estímulo y 4 horas con el estímulo eléctrico de la corriente indicada).	23
Tabla 2. Anticuerpos conjugados utilizados en las técnicas inmunocitoquímicas	24
Tabla 3. Medida de la resistencia de las fibras de PLA en el dispositivo recubiertas con distintos espesores de oro después del recubrimiento (R0), tras 4 días (R4) y tras 3 lavados con etanol al 70 %.....	26
Tabla 4. Medidas de resistencia de los materiales electroconductores.....	27
Tabla 5. Medidas de conductividad (S/m) de los materiales electroconductores estudiados	27

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1</i>	20
<i>Ecuación 2</i>	20

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción sistema nervioso y daño neural

1.1.1. Organización del sistema nervioso

Convencionalmente, los neurocientíficos y los neurólogos han dividido anatómicamente el sistema nervioso de los vertebrados en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC, que incluye el encéfalo y la médula espinal, constituye los circuitos de procesamiento que transforman, gestionan, interpretan y almacenan la información y conducen y proporcionan estímulos al SNP. El SNP consiste en los nervios craneales que surgen del cerebro, los nervios espinales que surgen de la médula espinal y los cuerpos celulares de los nervios sensitivos (ganglios de la raíz dorsal). Los nervios periféricos inervan el tejido muscular, transmitiendo información sensorial y excitatoria hacia y desde la columna vertebral para, por un lado, transducir los estímulos físicos externos y, por otro lado, generar los movimientos y secretar las sustancias necesarias a dichos estímulos (Ramon y Cajal, 1928; David & Aguayo, 1985; Purves, 2004).

1.1.2. Componentes celulares del sistema nervioso

El sistema nervioso está compuesto por dos grupos celulares diferenciados: neuronas y neuroglia. Las neuronas son los elementos estructurales y funcionales básicos del sistema nervioso y constan de un cuerpo celular (soma) y sus extensiones (axones y dendritas). Clústeres de somas de nervios sensitivos, conocidos como ganglios, se encuentran a las afueras de la columna vertebral. Las neuronas son células excitables eléctricamente que transmiten señales por todo el cuerpo. Emplean componentes eléctricos y químicos en la transmisión de información y están conectadas a otras neuronas mediante las sinapsis. La variedad de interacciones entre las neuronas permite la transmisión de impulsos para realizar diversas funciones dentro del cuerpo. Las dendritas transmiten señales eléctricas al soma de la neurona y el axón conduce los impulsos (Schmidt & Leach, 2003).

Las células gliales, o neuroglia, son células de soporte que ayudan funcionalmente a las neuronas (Figura 1) e incluyen las células de Schwann (SCs) en el SNP y los astrocitos y oligodendrocitos en el SNC. Las células gliales abundan más que las neuronas y tienen cierta capacidad de división celular a diferencia de las neuronas, que no pueden sufrir mitosis. No obstante, pueden regenerar una porción cortada y extender bajo ciertas condiciones (Purves, 2004).

Cuando ocurre una lesión nerviosa, a partir de las 48-96 horas se produce una degeneración tisular caracterizada por la actividad proteasa y la invasión de células mielomonocíticas que destruyen la mielina e inician mecanismos autolíticos que llevan a la degeneración de los extremos distales del axón. Esto se conoce como Degeneración Walleriana y se da tanto en el SNC como en el SNP (Stoll et al., 2002).

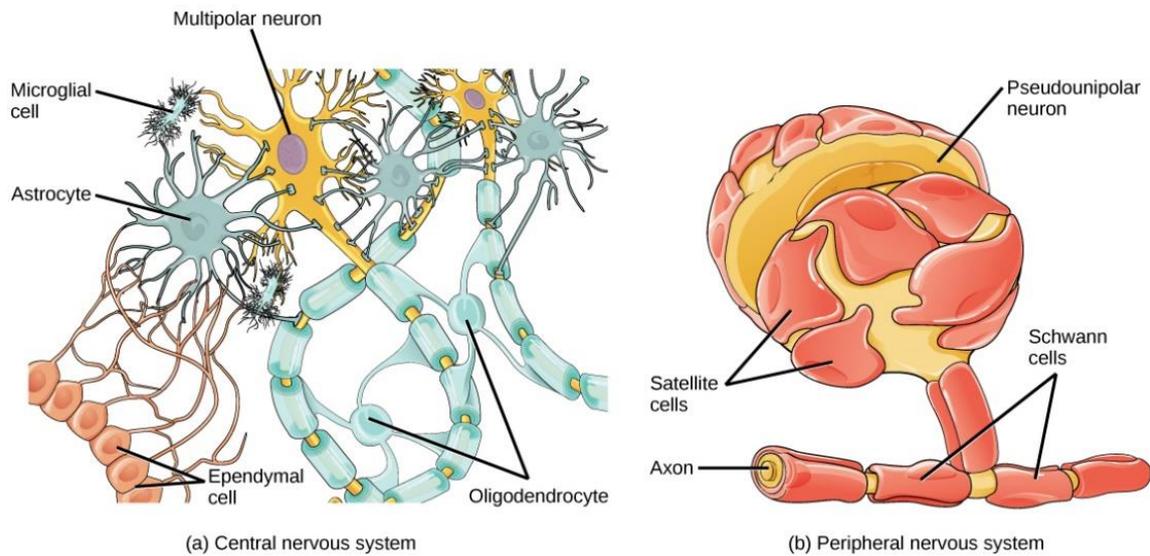


Figura 1. Células gliales de soporte neuronal en el SNC (a) y SNP (b) (OpenStax-CNX, 2016).

1.1.3. Diferencias en la regeneración en el SNP y SNC

Regeneración en el SNP

En el SNP, durante la degeneración Walleriana, el segmento distal del axón degenera y las células de soporte ayudan a la regeneración neuronal (Figura 2). Las SCs pasan por varios cambios fenotípicos en este momento y comienzan a retirar los restos de mielina y desechos axonales y promueven la producción de citoquinas como el TNF- α para reclutar macrófagos en el sitio de la lesión. Entonces, ambas células fagocíticas, macrófagos y SCs actúan conjuntamente para eliminar la mielina y los restos axonales (Purves, 2004; Houschyar et al., 2016). Además de limpiar estos restos, producen citocinas como la interleucina-6 y otros factores neurotróficos, que estimulan la supervivencia neuronal, organizan una vía de regeneración para guiar el crecimiento axonal y promueven el crecimiento del axón (Dubový et al., 2014).

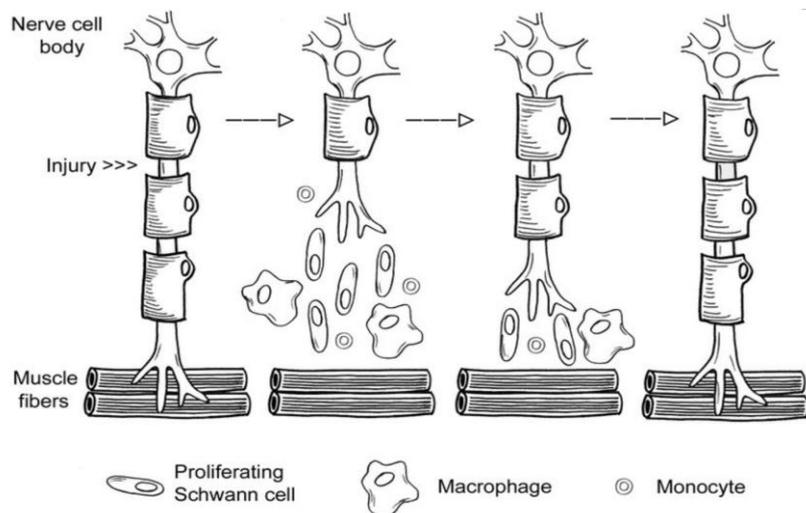


Figura 2. Regeneración en el SNP (Schmidt & Leach, 2003).

Regeneración en el SNC

La neuroinflamación del sitio lesionado se da de igual manera en el SNP y el SNC, pero solo en el SNC viene acompañada de una rápida formación de cicatrices gliales (Figura 3). Los componentes de la matriz extracelular derivados de los astrocitos en el sitio de la lesión, como la tensina y los proteoglicanos, inhiben el crecimiento (McKeon et al., 1991; Canning et al., 1996). En el SNC, las pocas neuronas que sobreviven a la lesión intentan regenerar el tejido, pero se encuentran con esta cicatriz glial impenetrable compuesta por mielina y restos celulares, así como astrocitos, oligodendrocitos y microglía que dificultan el proceso de regeneración. Los fibroblastos, monocitos y macrófagos también pueden estar presentes en la cicatriz glial. Como resultado, las neuronas no pueden alcanzar su objetivo sináptico (Houschyar et al., 2016).

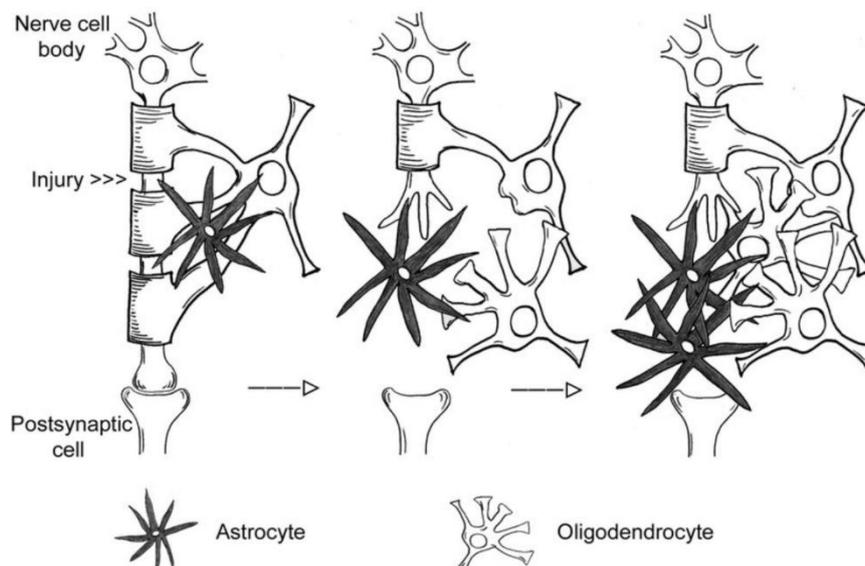


Figura 3. Intento de regeneración en el SNC (Schmidt & Leach, 2003).

1.1.4. Aplicación en lesión medular

Los axones lesionados en el SNP pueden regenerarse con éxito cuando se asocian con las SCs y otros componentes nerviosos periféricos. Por el contrario, La incapacidad de los axones para crecer en tejidos dañados del SNC ha generado una necesidad de investigar en el campo de la regeneración. Esta imposibilidad para la extensión axonal es una consecuencia de lesiones en el cerebro y la médula espinal de mamíferos adultos. La lesión medular supone un gran problema de salud en la sociedad por la gran discapacidad que conlleva y su repercusión en el lesionado. La Organización Mundial de la Salud define lesión medular como “los daños sufridos en la médula espinal a consecuencia de un traumatismo o de una degeneración”. En España se producen entre 800 y 1000 nuevas lesiones medulares al año y se estima que hay más de 30.000 personas con esta lesión. De ellas el 70-80% está causada por traumatismos, principalmente accidentes de tráfico (45%) (Huete García & Díaz Velázquez, 2012).

Una lesión en la médula espinal resulta en la interrupción de la conducción del impulso lo que produce cambios temporales o permanentes en las funciones normales de la médula. Aunque la regeneración axonal es limitada, puede darse una cierta plasticidad espontánea y regeneración axonal que ayudan a mejorar las habilidades sensoriales y motoras (Weidner et al.,

2001; Rosenzweig et al., 2010). Sin embargo, la recuperación espontánea después de una lesión de la médula espinal puede durar varios años y el grado de recuperación es muy limitado. Por lo tanto, es de gran prioridad el desarrollo de nuevos enfoques que puedan acelerar la ganancia de la función motora para los pacientes con médula espinal dañada dado que no existen tratamientos totalmente restauradores.

1.2. Terapia celular

La terapia celular ha sido utilizada ampliamente en los últimos años para el abordaje de las lesiones nerviosas y numerosos tipos de células han sido evaluados con el fin de promover el crecimiento axonal y así, conseguir la regeneración y recuperación funcional en la médula espinal. Se han llevado a cabo trasplantes de células madre neurales y células madre embrionarias dentro de la zona lesionada (McDonald et al., 1999; Cao, 2002), así como trasplante de células madre mesenquimales (Ding et al., 2014), o células ependimarias (Gómez-Villafuertes et al., 2015). Incluso se ha probado terapia celular con oligodendrocitos (Sun et al., 2013) con el fin de favorecer la remielinización o terapia con células gliales de la vaina olfativa (Chou et al., 2014) ya que juegan un papel importante en la regeneración de las neuronas olfativas al guiar el crecimiento del axón desde el sistema nervioso periférico hacia el SNC. Recientemente se probó terapia celular con células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) que pueden ser reprogramadas para diferenciarse en células del SNC y reemplazar el tejido lesionado en la médula espinal (Vismara et al., 2017). No obstante, todos ellos sin conseguir resultados funcionales completamente satisfactorios.

A pesar de esto, se ha demostrado anatómicamente que la extensión axonal por parte de las neuronas del SNC puede ocurrir con éxito tras la inserción de segmentos nerviosos periféricos. Esto se ha demostrado en regiones del cerebro y médula espinal de ratas adultas (David & Aguayo, 1985). Es decir, es posible promover el crecimiento axonal de neuronas dañadas cuando estas se encuentran en un ambiente adecuado proporcionado por injertos provenientes del SNP. Bajo estas condiciones experimentales, las respuestas axonales a la lesión por parte de las neuronas del SNC se asemejan a las respuestas de las fibras nerviosas del SNP las cuales son bien capaces de regenerarse tras una lesión. Esto demuestra que el tipo de ambiente que rodea al axón es determinante en su respuesta regenerativa. Francisco Tello, diseñó una serie de experimentos en 1911 en los cuales empleaba segmentos de nervio implantados en córtex de conejo. Estos implantes provenientes del SNP podían promover la regeneración en el SNC al liberar sustancias neurotróficas provenientes de las células del SNP (Tello, 1911). Esta interacción entre el SNC y SNP con fines regenerativos también ha sido ampliamente descrita por Chi y Dahl, los cuales consiguieron injertar un nervio ciático autólogo en el SNC de ratas (Chi & Dahl, 1983).

1.2.1. Terapia celular con células de Schwann

En cuanto a terapias celulares que no incluyan células madre, la más prometedora de todas es la terapia con SCs. Estas células apoyan a los axones dentro del SNP y generan la vaina de mielina, la cual aísla el segmento del axón y aumenta la velocidad de conducción, lo cual es particularmente importante para aquellos axones con longitudes de hasta un metro. Se pueden aislar fácilmente de las fibras nerviosas periféricas y expandirse para uso terapéutico, lo que ha

despertado gran interés para el tratamiento de lesión medular. Las SCs producen factores de crecimiento, componentes extracelulares y moléculas de adhesión después de una lesión. Más importante aún, las SCs exógenas también pueden remielinizar los axones desmielinizados del SNC y mejorar la conducción (Schmidt & Leach, 2003; El Seblani et al., 2020).

Como se ha comentado anteriormente, la degeneración Walleriana se produce en el segmento distal de la lesión donde las SCs con fenotipo fagocítico cumplen su función eliminando los restos celulares. En el segmento proximal ocurre una formación de conos de crecimiento cuando las SCs proliferan y forman bandas a lo largo de restos de colágeno residuales. Estos conos son el componente clave que permite a los nervios periféricos regenerarse tras una lesión (Figura 4). Inicialmente son amielínicos, y posteriormente tras la mitosis y cambios morfológicos de las SCs se genera la cubierta miélica (El Seblani et al., 2020).

Las SCs secretan progresivamente distintos factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), el factor de crecimiento cerebral (BDNF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) o el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) necesarios para la extensión de los conos de crecimiento (Ebadi et al., 1997). Estos funcionan como estructuras activas exploradoras que detectan señales guía procedentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, el fibrinógeno junto con la fibronectina crea una matriz de fibrina que actúa como sustrato para la migración celular. También la laminina unida a proteoglicanos o colágeno, forma una estructura tridimensional para acelerar el proceso (David et al., 1995). Estos conos de crecimiento son los que originaran la denominada banda de Büngner o banda de regeneración axonal.

Las SCs secretan **factores neurotróficos** como el factor de crecimiento nervioso (NGF), que promueve la regeneración neuronal y remodelación axonal. También secretan factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), factores neurotróficos ciliares (CNTF) y derivados de células gliales (GDNF), que aumentan la regeneración axonal y remielinización (El Seblani et al., 2020). La expresión de Neuregulina tipo III en los axones es esencial para la supervivencia y la maduración de los precursores de células de Schwann, y el grado de mielinización depende de la cantidad de Neuregulina en la superficie del axón (Badner et al., 2017).

Las SCs también secretan **citoquinas** para reclutar macrófagos y neutrófilos. Por ejemplo, las LIF e IL-6, actúan directamente sobre las neuronas para promover su supervivencia (Lindborg et al., 2017). Posteriormente, los macrófagos reclutados actúan manteniendo la fuente de citocinas, ya que los macrófagos locales son polarizados por las SCs hacia el fenotipo M2 el cual promueve el crecimiento axonal mediante la liberación de mediadores antiinflamatorios esenciales como IL10, arginasa 1, quitinasa 3 / YM1 y receptor de manosa C tipo 1 / CD206 (El Seblani et al., 2020).

Las SCs también liberan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y otros **factores para promover la vascularización** (Barrette et al., 2008). Junto con los macrófagos, las SCs eliminan la mielina que inhibe la regeneración de nuevos axones. Además, las SCs podrían mejorar la recuperación después de la lesión ya que producen **moléculas de adhesión celular** (N-cadherina e integrinas) y proteínas de matriz extracelular (colágenos y laminina).

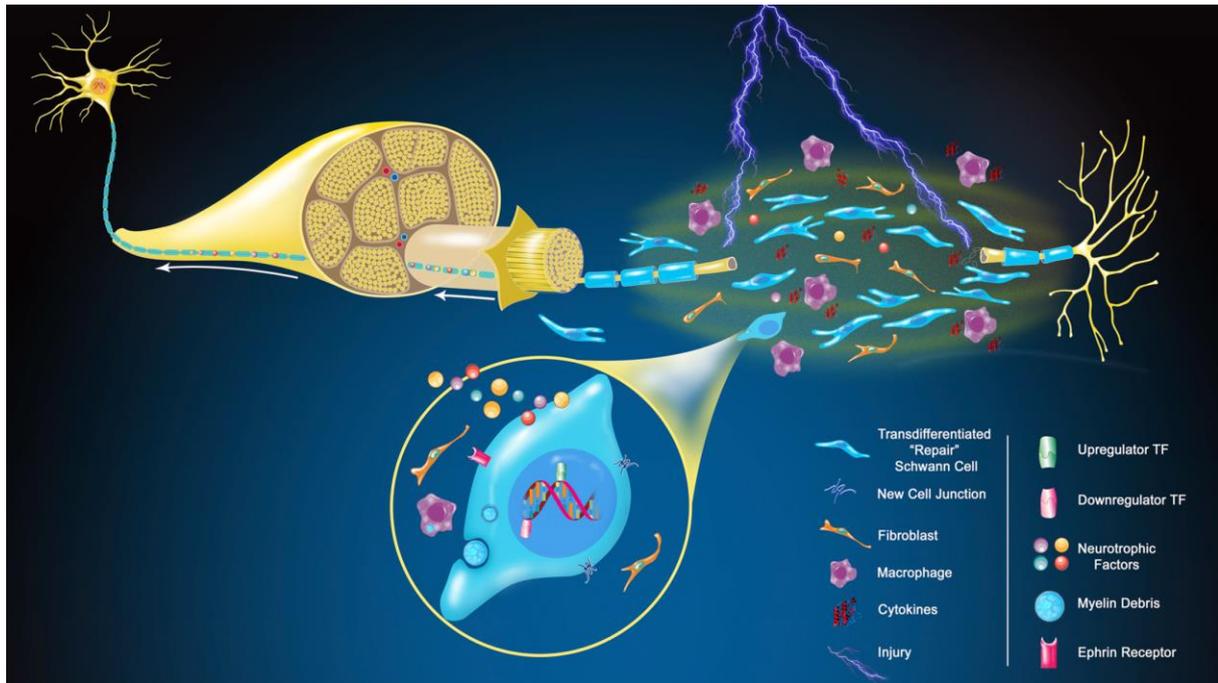


Figura 4. Fenotipo de reparación de las SCs en respuesta a una lesión nerviosa (El Seblani et al., 2020).

Tras una lesión, los axones en extensión deben navegar a través de la zona dañada y restaurar las conexiones para recuperar la funcionalidad. Sin embargo, como hemos visto este proceso es complicado debido a la inhibición por parte de la mielina, la cicatriz glial y la muerte neuronal. La importancia de las SCs reside en que al trabajar conjuntamente con los macrófagos y los monocitos proliferantes eliminan los restos de mielina, liberan neurotrofinas y conducen axones hacia sus objetivos sinápticos, lo que resulta en una función neuronal restaurada. Sin embargo, en el SNC, aunque los astrocitos proliferan de manera similar a la de las SCs en el SNP, se convierten en "astrocitos reactivos" produciendo cicatrices gliales que inhiben la regeneración.

1.2.2. Terapia celular con neuronas

En este trabajo se han empleado como fuente neuronal, neuronas procedentes del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de pollo. El DRG contiene la mayoría de las neuronas sensitivas del cuerpo. Estas neuronas transmiten la información desde la periferia al sistema nervioso central (cerebro y médula espinal). Hasta hace poco, se creía que los cuerpos celulares DRG simplemente actuaban como "ayudantes" de almacenamiento en procesos periféricos como la nocicepción y las sensaciones de temperatura. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos somas no son participantes pasivos sino más bien activos en el proceso de señalización; detectan moléculas específicas y producen moléculas necesarias para regular el proceso (Krames, 2014; Schünke, 2017). Las neuronas procedentes del DRG representan un excelente modelo para estudiar la regeneración axonal, ya que sus axones periféricos se regeneran eficientemente, pero sus proyecciones centrales tienen capacidades regenerativas pobres (Lopez-Verrilli et al., 2013). Además, los DRG son fáciles de diseccionar de embriones y animales adultos, y de ellos se puede aislar una gran cantidad de somas neuronales con poblaciones bien caracterizadas. Además, las neuronas de DRG se pueden cocultivar con SCs. Estas particularidades permiten

analizar los mecanismos de señalización entre neuronas y SCs en condiciones fisiológicas y patológicas.

No obstante, sin un soporte, es imposible la regeneración completa, lo que ha llevado a desarrollar nuevas estrategias como el uso combinado con biomateriales para generar un entorno favorable al crecimiento o para impedir el ataque de ciertos factores, como la microglía.

1.3. Ingeniería tisular para el sistema nervioso

El avance en ingeniería tisular en los últimos años ha hecho posible la combinación de células y biomateriales, los cuales aportan un soporte físico para las células. Para la adhesión de las células nerviosas, la migración y la posterior regeneración de tejidos, los materiales de soporte (*scaffolds*) se han aplicado ampliamente en la ingeniería de tejidos. Algunas de las propiedades más importantes que un material biocompatible debe presentar, se resumen en los siguientes puntos (Nair & Laurencin, 2007):

- El material no debe provocar una respuesta inflamatoria o tóxica sostenida tras la implantación en el organismo.
- El material debe tener una vida útil aceptable.
- El tiempo de degradación del material debe coincidir con el proceso de curación o regeneración.
- El material debe tener propiedades mecánicas apropiadas para la aplicación indicada y la variación en las propiedades mecánicas con la degradación debe ser compatible con el proceso de curación o regeneración.
- Los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben poder metabolizarse y eliminarse del cuerpo.
- El material debe tener la permeabilidad y procesabilidad adecuadas para la aplicación prevista.

Debido a la particularidad de la regeneración nerviosa, el *scaffold* de reparación debe poseer propiedades tales como una buena biocompatibilidad (Kim & Mooney, 1998), una estructura alineada para guiar el crecimiento axonal y buena conductividad eléctrica para la estimulación del crecimiento del axón (Yu et al., 2013). Además debe presentar adecuadas propiedades mecánicas y biodegradabilidad para evitar un nuevo procedimiento quirúrgico y una posible inflamación aséptica (Figura 5) (Heath & Rutkowski, 1998).

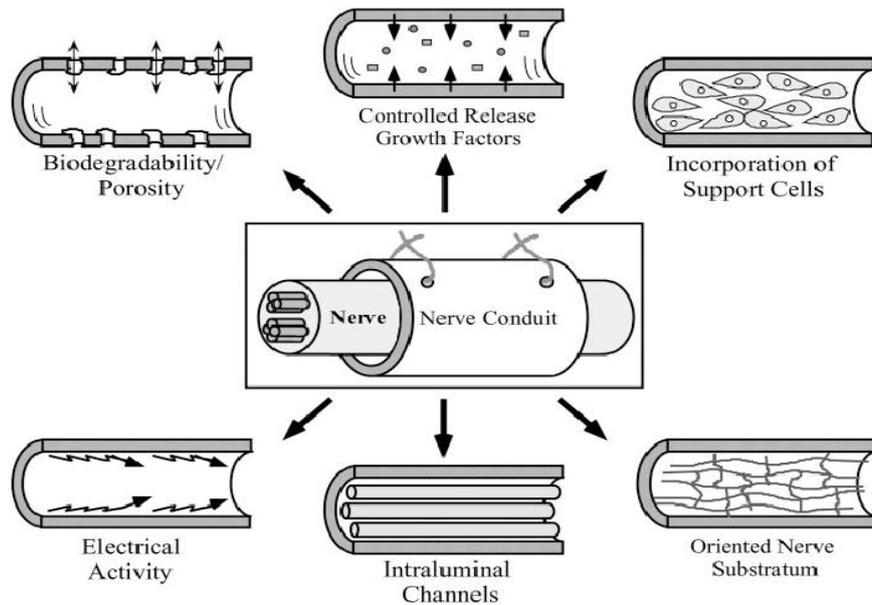


Figura 5. Propiedades deseadas en un material de guía para regeneración nerviosa (Schmidt & Leach, 2003).

1.3.1. Uso del ácido poli-L-láctico

El ácido poli-L-láctico (PLA) es un polímero sintético biocompatible, biodegradable y bioabsorbible en un medio como el cuerpo humano y se usa ampliamente en ingeniería de tejidos ya que se degrada con seguridad a lo largo de la misma vía metabólica que el ácido láctico (Fitzgerald et al., 2018). El PLA permite formar fibras muy resistentes y está aprobado por la FDA desde 1971 para el desarrollo de suturas mejoradas bajo la marca registrada DEXON. Debido a la gran resistencia de las fibras de PLA, se ha investigado como *scaffold* para el reemplazo de ligamentos o de fibras no degradables, como Dacron (Lu et al., 2005). Actualmente se encuentran en investigación unos dispositivo basados en fibras de PLA que actúan como vasos sanguíneos a largo plazo (Zilberman et al., 2005). La FDA también aprobó una forma inyectable de PLA (Sculptras) para restaurar o corregir la pérdida de grasa facial o la lipoatrofia en personas con el virus de inmunodeficiencia humana (Nair & Laurencin, 2007).

Por tanto, el material empleado en el presente trabajo es el PLA que como material presenta los mejores resultados para la formación de conductos aplicados en regeneración nerviosa utilizados ampliamente en modelo de nervio ciático de rata (Evans et al., 2000; Xu et al., 2019). En estos estudios se confirma que los conductos de PLA son *scaffolds* completamente viables para el reemplazo a largo plazo de la lesión nerviosa ya que las células madre neuronales pueden crecer a lo largo de la fibra de PLA en dirección alineada.

El PLA es un polímero cristalino (37% de cristalinidad) cuyo porcentaje depende del peso molecular y los parámetros de procesamiento del polímero. Comienza a fundir a partir de 160°C de temperatura. El PLA es un polímero de degradación lenta que tiene buena resistencia a la tracción y un alto módulo (aproximadamente 4.8 Gpa) (Nair & Laurencin, 2007).

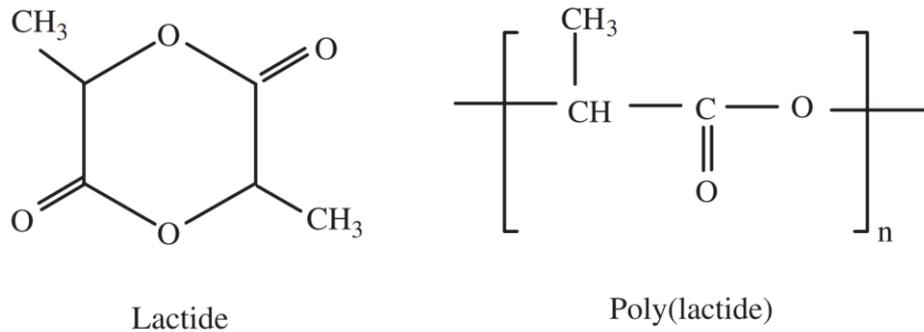


Figura 6. Estructura química del monómero (izquierda) empleado para sintetizar ácido poli-L-láctico (derecha) (Nair & Laurencin, 2007).

1.3.2. Disposición en fibrillas alineadas

En el estudio llevado a cabo por F. Yang et al. se describe la eficacia de *scaffolds* compuestos por microfibras alineadas de PLA y su aplicación en ingeniería tisular neural. Además, se compara su rendimiento con membranas de fibras de PLA con una distribución aleatoria. En base a los resultados experimentales, se demuestra (Figura 7) que estas microfibras alineadas apoyan altamente el cultivo de células madre neurales y mejoraron el crecimiento de neuritas debido a que sirven de guía para el crecimiento del axón (Yang et al., 2005). Sin embargo, no poseían conductividad eléctrica y no podían estimular eléctricamente el crecimiento del axón. Es aquí donde reside la importancia de aplicar polímeros conductores en la reparación nerviosa.

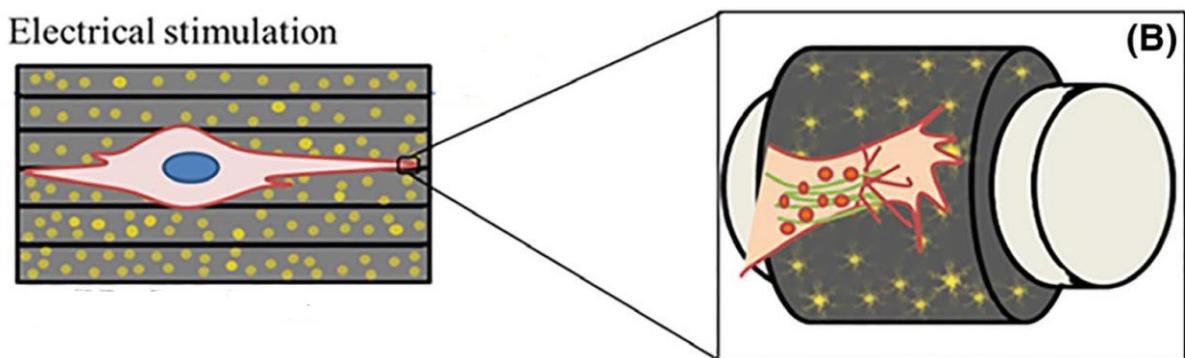


Figura 7. Esquema de una neurona cultivada sobre fibras de PLA recubiertas con PPy bajo estimulación eléctrica (A). Las fibras alineadas recubiertas permiten guiar el crecimiento del axón (B) (Balint et al., 2014; Vijayavenkataraman, 2020).

1.4. Polímeros conductores

Previamente se han listado las propiedades más importantes que un material aplicado en ingeniería de tejidos debe presentar. Una estrategia para incrementar la regeneración en el caso de tejido neural consiste en incluir materiales electroconductores a los polímeros base ya que la estimulación eléctrica ha demostrado ser efectiva para mejorar el crecimiento de axones y neuritas. No obstante, su uso es limitado ya que la mayoría de los polímeros conductores no son biodegradables.

Uno de los materiales candidatos es el poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), que presenta propiedades físicas estables, tanto eléctricas como térmicas y se suele emplear en biosensores y electrodos para regeneración nerviosa (Luo et al., 2008). Otro polímero conductor ampliamente investigado para su aplicación biológica es la polianilina (PANI), por su estabilidad química y capacidad de soportar temperaturas elevadas. Sin embargo, presenta una baja procesabilidad y flexibilidad y algunos estudios explican que puede causar inflamación crónica una vez implantado (Humpolicek et al., 2012). Por otra parte, los nanotubos de carbono (CNTs) son estructuras cilíndricas compuestas por láminas de grafeno con diámetros que suponen señales topográficas atractivas para las neuronas. No obstante, Hussain, Kabir y Sood (2009), demostraron que los CNTs son citotóxicos para las células cuando están suspendidos en el medio de cultivo.

De entre todos ellos, el material más estudiado y utilizado, es el polipirrol (PPy), reflejado en la cantidad de publicaciones sobre sus propiedades y aplicaciones (Balint et al., 2014; Vijayavenkataraman, 2020).

1.4.1. Recubrimiento con PPy

El PPy es un polímero intrínsecamente conductor de uso común, utilizado ampliamente, con buena biocompatibilidad y ha sido investigado para su aplicación en reparación y regeneración nerviosa (Williams & Doherty, 1994; Yu et al., 2013; Xu et al., 2019). Al recubrir con PPy la superficie de las fibras de PLA, estas se vuelven eléctricamente conductoras, mientras que se siguen manteniendo mecánicamente flexibles. En el estudio de George et al. prepararon un tubo de PPy para ser colocado en el nervio ciático de ratas y así promover la regeneración axonal durante 8 semanas. Sin embargo, este conducto no pudo guiar la regeneración ya que un único material es incapaz de cumplir todos los requerimientos para la reparación nerviosa y por tanto son necesarios materiales compuestos como PLA-PPY (George et al., 2009).

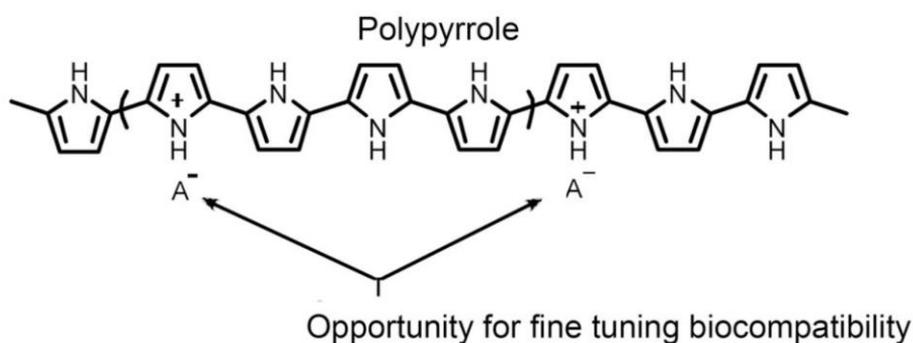


Figura 8. Estructura del PPy donde se observan los grupos cargados que favorecen la biocompatibilidad (Brett Runge et al., 2010).

1.4.2. Empleo de oro

El oro se ha empleado comúnmente en forma de nanopartículas para su aplicación en la biomedicina. Estas nanopartículas son muy versátiles puesto que se pueden conjugar con otros materiales o moléculas. Por ejemplo, están siendo ampliamente estudiadas para diagnóstico y terapia en cáncer, pues su acumulación como contraste en el sitio del tumor permite su

detección, y su conjugación con fármacos, una liberación controlada de dichas sustancias en el organismo (Alex & Tiwari, 2015).

Por el contrario, el oro común es considerado químicamente inerte y sus superficies muestran baja capacidad de quimisorción. Esto hace que el oro exhiba baja reactividad química y poca actividad catalítica. Se empleaba en odontología antiguamente por sus propiedades químicas como son, la resistencia a los ataques de los ácidos, la estabilidad ante la corrosión y la oxidación y su condición de mineral inerte. Por tanto, clínicamente, el oro presenta biocompatibilidad al entrar en contacto con los fluidos y tejidos corporales, características adecuadas para evitar reacciones inmunogénicas (Alex & Tiwari, 2015). Además, al ser un metal presenta una excelente conductividad y ha sido empleado en electrodos para estimulación eléctrica de células y en sustratos sobre los cuales sembrar células para su estimulación directa.

Por ejemplo, en un estudio se emplearon nervios ciáticos de rana los cuales se colocaron en una matriz compuesta por microelectrodos de oro planos. Estos se estimularon eléctricamente con el fin de estudiar la modulación de las concentraciones de iones Ca^{+2} dependientes de corriente eléctrica en el músculo (Ibrahim et al., 2012). En otro estudio realizado por Heida et al., con el propósito de estudiar el efecto de la estimulación eléctrica en neuronas P12, se recubrió la superficie de una placa de vidrio con oro y con titanio para mejorar la adherencia del oro. Esta es una superficie electroconductora en contacto con electrodos de oro, los cuales generan un circuito eléctrico para la estimulación celular. No obstante, debido al poco espesor de la capa de oro, no se consiguió obtener una conductividad mayor a la del medio de cultivo y presentó el problema de calentamiento por efecto Joule. (Heida, 2003). Se puede apreciar por falta de literatura que los estudios en relación al oro como material electroconductor para la promover la regeneración nerviosa son muy limitados y requieren de investigación futura puesto que es un material muy interesante para dicha aplicación.

1.5. Estimulación eléctrica

Como se ha mencionado anteriormente, existe una notable problemática sanitaria derivada de las lesiones del sistema nervioso. Para paliar y mejorar esto, surge la estimulación celular, la cual se ha demostrado ampliamente como técnica efectiva para promover la reparación nerviosa al facilitar la alineación celular y la secreción de proteínas. Los materiales conductores pueden ser estimulados eléctricamente facilitando la regeneración axonal (Schmidt & Leach, 2003).

La estimulación eléctrica exógena (ES) consiste en inducir potenciales de acción (PAs) artificialmente mediante la inducción de cargas eléctricas en la célula. Se trata de un método físico que puede ser empleado tanto *in vivo* como *in vitro*. La ES ha demostrado que incrementa la proliferación y diferenciación de células madre neurales en neuronas (Yamada et al., 2006) y guía la migración celular (Park et al., 2011). Esto ocurre debido a los cambios biofísicos que se desencadenan en la superficie celular al alterarse la distribución de la carga, lo que afecta a las funciones de las proteínas de la membrana, como la actividad enzimática, los complejos receptores de membrana y los canales de transporte de iones (Xu et al., 2019). Dadas las

características eléctricas intrínsecas de las neuronas, los biomateriales electroactivos son útiles para la ES.

1.5.1. Estimulación *in vivo*

La ES *in vivo* mediante el uso de electrodos ha sido ampliamente utilizada obteniendo muy buenos resultados. La ES por breves periodos de tiempo, ha demostrado ser efectiva para acelerar el crecimiento del axón a través del sitio de la lesión, tanto en estudios en animales como en humanos. Numerosos estudios realizan la estimulación *in vivo* para regeneración de nervio ciático, como la llevada a cabo en 2018 donde desarrollaron un sistema electrónico inalámbrico bioabsorbible para llevar a cabo ES *in vivo* y promover la neuroregeneración sin fármacos. Con este dispositivo, se realizaron múltiples sesiones de ES directamente sobre el tejido nervioso lesionado, consiguiendo mejorar y acelerar la recuperación funcional (Koo et al., 2018). Sin embargo, en los últimos años ha aumentado el número de estudios que proponen la ES *in vitro* previa al trasplante para favorecer la extensión axonal.

1.5.2. Estimulación *in vitro*

Los campos eléctricos para estimulación celular se generan a partir de fuentes de energía externas y se pueden clasificar como corrientes continuas (DC), alternas (AC) y pulsatorias (PC). La corriente continua se refiere a la corriente cuya magnitud y dirección no cambian con el tiempo, mientras que la corriente alterna se refiere a la corriente cuya magnitud y dirección cambian periódicamente. La corriente pulsatoria es un flujo de corriente unidireccional o bidireccional por una breve duración. El método para inducir corrientes eléctricas más empleado en regeneración neural es mediante campos eléctricos constantes de corriente continua (DC) ya que juegan un papel importante en el desarrollo del SNC al guiar el crecimiento axonal y la inducción de la migración celular direccional (Yongchao Li et al., 2014).

Los experimentos *in vitro* realizados por Lionel Jaffe y Moo-ming Poo establecieron la relación entre los campos eléctricos aplicados extracelularmente y la regeneración de neuronas (Jaffe & Poo, 1979). Se demostró que las fibras nerviosas en crecimiento responden inmediatamente al gradiente de voltaje y tienden a orientarse paralelas a lo largo del eje de este gradiente. Otro fenómeno importante observado fue que el crecimiento de las fibras nerviosas también era direccional dentro del campo eléctrico, por tanto, la posición de los electrodos determina la dirección del crecimiento neuronal y las neuritas tienden a crecer tres veces más rápido hacia el electrodo catódico en un campo de DC entre 70 y 140 mV/mm (Hamid & Hayek, 2008).

Comúnmente, el método empleado para la ES *in vitro* consiste en aplicar a las células o tejidos biológicos corrientes eléctricas a través de electrodos. Es decir, se establece un campo eléctrico a partir de una celda electrolítica. No obstante, existen otras formas de inducir una corriente, como hacerla pasar a través de una superficie conductora, y así estimular las células nerviosas. Este tipo de estimulación es localizada, y por tanto es posible dar forma al sustrato y controlarla para guiar el crecimiento axonal. En otros estudios, se emplean *scaffolds* de PPy. En estos casos, se depositan las SCs dentro de un soporte conductor con el fin de promover una mayor regeneración neuronal. De esta forma se aumenta notablemente la proliferación y promueve la secreción de factores de crecimiento nervioso concretamente, funciones como la adhesión

celular, la migración celular, la secreción de proteínas y la replicación ADN se regulan modificando el voltaje y la densidad de corriente (Nguyen et al., 2013). Esto respalda la hipótesis de que la participación de SCs en el sitio de la lesión es un factor limitante de la velocidad en la reparación del SNP. *In vivo*, tanto las neuronas como las células de soporte están expuestas a una corriente endógena natural creada por el epitelio durante el desarrollo y tras una lesión. De aquí reside la importancia de no solo estimular las células neuronales sino también las células de soporte ya que son estas las que apoyan el crecimiento de los axones.

En la Figura 9 se muestra el efecto de la ES en las SCs cuando se encuentran sobre un material electroconductor biocompatible. El alineamiento con el campo eléctrico se explica porque al ser polarizada la membrana celular, las proteínas de membrana incluyendo receptores de adhesión, son redistribuidas y se mueven hacia el cátodo. Esto ocurre porque al ser estas membranas conductoras, el campo eléctrico impacta con los grupos químicos cargados negativamente en la membrana celular que son componentes clave de bombas, proteínas de transporte y proteínas reguladoras de las actividades celulares. Estas señales también son transmitidas a las integrinas de las adhesiones focales regulando el alineamiento celular (Ya Li et al., 2020).

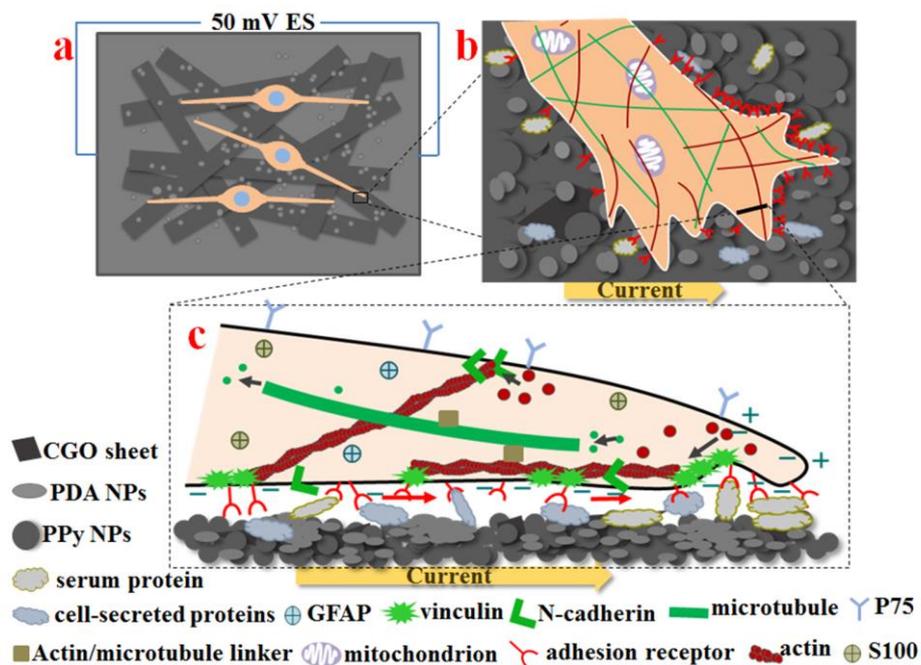


Figura 9. Ilustración esquemática de la alineación de SCs cultivadas en materiales electroconductores y sometidas a corriente eléctrica: (a) alineación de SCs, (b) redistribución de receptores de membrana celular, y (c) vista seccionada de filopodios (las flechas rojas muestran la dirección de movimiento de los receptores de adhesión) (Ya Li et al., 2020).

Sin embargo, existe un menor número de estudios donde la ES se realice *in vitro* en comparación a estudios *in vivo*. La estrategia del presente estudio está basada en promover el crecimiento axonal mediante una aproximación diferente que consiste en el trasplante de tractos axonales obtenidos mediante ingeniería tisular *in vitro*. No obstante, a la hora de determinar los parámetros de estimulación, pocos artículos proporcionan la corriente eléctrica. Suelen indicar el campo eléctrico, pero no la resistencia y por tanto no se puede conocer la corriente. Resulta difícil unificar la información contenida en la bibliografía para extraer los parámetros óptimos

de estimulación teniendo en cuenta que los dispositivos de estimulación son diferentes en cada estudio dado que se emplean distintos materiales y configuraciones.

2. OBJETIVOS

Con lo dicho anteriormente, en el presente Trabajo de Fin de Grado se pretende conseguir un sistema conductor donde se puedan combinar diferentes materiales electroconductores (oro y PPy) para la ES de SCs y neuronas de DRG de pollo en cocultivo *in vitro* y así favorecer la extensión de tractos axonales para ser posteriormente implantados *in vivo*.

Objetivos específicos:

- Obtener materiales conductores que permitan guiar el crecimiento axonal. Se trata de microfibras cilíndricas de PLA recubiertas con PPy y bandas de oro.
- Caracterizar eléctricamente los materiales empleados para guiar la regeneración nerviosa.
- Obtener un dispositivo que permite la estimulación de celdas de cultivo compuestas por células eléctricamente excitables, concretamente neuronas de DRG.
- Evaluar la adhesión y la viabilidad celular *in vitro* sobre los materiales electroconductores.
- Realización de un ensayo biológico *in vitro* para estudiar el comportamiento celular ante distintas condiciones de estimulación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

La propuesta del presente trabajo consiste en un concepto nuevo de dispositivo para ES de células del sistema nervioso (SCs y neuronas de DRG) en el cual la corriente eléctrica continua pasa a través de las fibras conductoras, en las cuales se siembran las células. Estas fibras conductoras, además de mejorar la adhesión, guían el crecimiento del axón al aportar direccionalidad y evitan que la corriente pase a través del medio, sino a través del material, evitando los problemas asociados. Dos de estas fibras se incluyen en una placa de 8 pocillos permitiendo obtener hasta 8 réplicas del mismo experimento. Además, este dispositivo permite su desmontaje sin romper o perturbar las fibras y por consiguiente otorga más facilidad a la hora de su fijación para el posterior proceso de toma de imágenes mediante microscopía.

3.2. Obtención de los biomateriales

3.2.1. Fibras de PLA

Para la realización de este trabajo se desarrollaron fibras conductoras formadas por microfibras de PLA dispuestas paralelamente que son fijadas en el dispositivo. En primer lugar, necesitamos un material que mantenga las fibras unidas y dispuestas paralelamente y que permita la unión a los contactos (pinzas) del generador de corriente. Esto se consigue con tiras de policaprolactona (PCL).

Para ello empleamos fibras de PCL de un milímetro de diámetro que se fundieron a 120°C durante 10 minutos en la estufa mediante cristalizadores de vidrio con el fin de estirarlas y conseguir una tira lisa (Figura 10 A y B). Con estas tiras lisas dispuestas en modo sándwich con las fibras de PLA entre ellas, se consigue tras fundirlo de nuevo, que queden compactas y retenidas en los bordes de PCL. (Figura 10 C). Es necesario recalcar esta disposición tipo sándwich, las tiras lisas se ponen tanto arriba como abajo de las fibras de PLA, tras el proceso de calentamiento (120°, 10 min) se introducen en el congelador para endurecer más rápidamente. Si únicamente se emplea una tira lisa de PCL, las fibras no quedan unidas ni compactas y por tanto no se pueden emplear para recubrir con materiales conductores.

En cuanto al PLA, se trata de microfibrillas de 10 µm que son suministradas por la empresa AITEX. Se disponen 600 microfibrillas de PLA de 10 µm paralelamente y se cortan a una longitud de 9 cm para asegurar que la fibra iguala la longitud del dispositivo. Mediante cristalizadores de vidrio, como se ha explicado previamente poniendo tanto arriba como abajo PCL se consigue mantener la linealidad de las fibras.

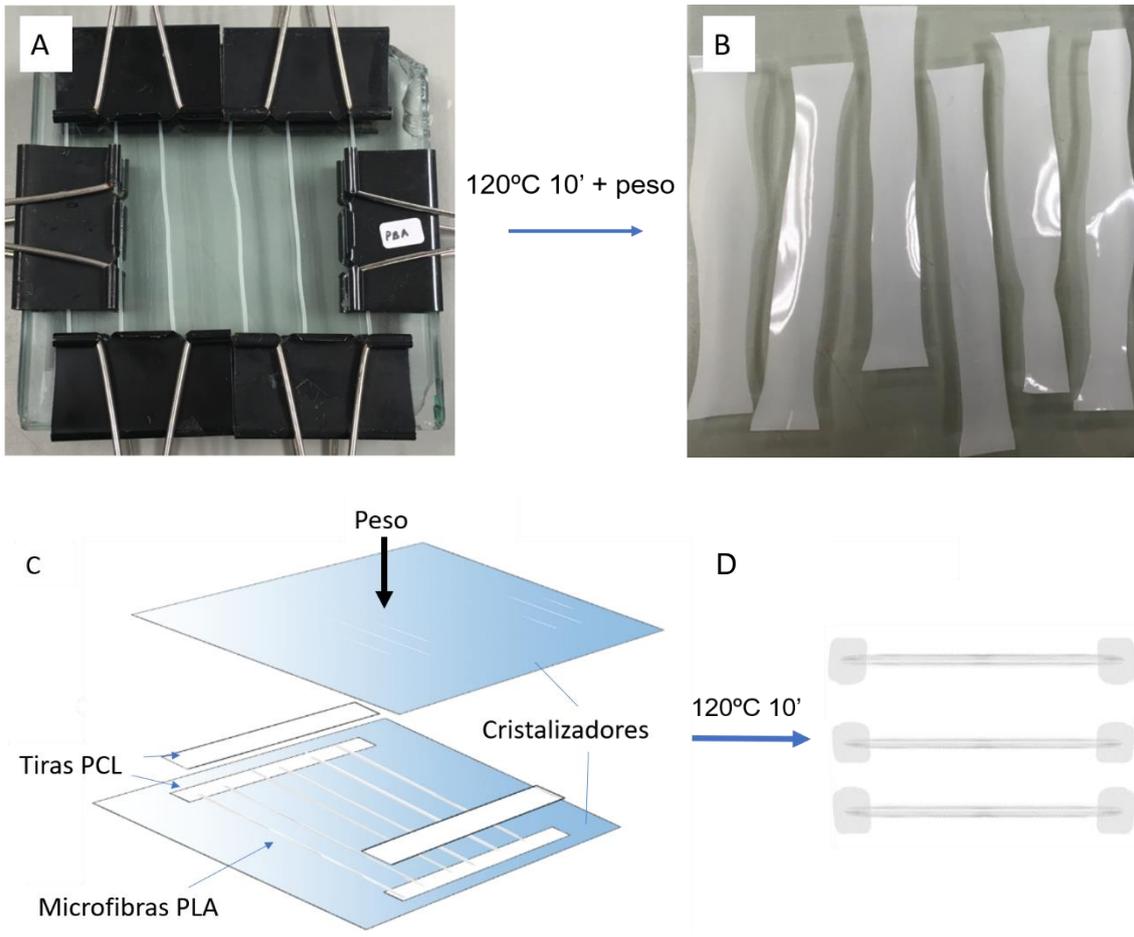


Figura 10. *Fibras de PCL en el cristizador antes de fundir (A) y bandas lisas de PCL tras fundir (B). Esquema del montaje tipo sándwich para obtener las fibras de PLA (C). Fibras de PLA individuales tras cortar la PCL (D).*

3.2.2. Recubrimiento con PPy

Para la obtención de las fibras de PLA recubiertas con PPy se empleó el Pirrol como monómero, el cual es vulnerable a la oxidación y se puede polimerizar químicamente en diferentes solventes acuosos y no acuosos gracias a su bajo potencial de oxidación (<0.8 V). Se optó por una polimerización química (Figura 11) dado que se trata de un proceso simple, con bajo costo, alta eficiencia y mayor rendimiento en comparación a otros métodos (Mao & Zhang, 2018).

1. **Lavado y preparación de las fibras.** Para la obtención de las fibras de PLA recubiertas con PPy, primeramente, se lavan con etanol al 70 % (ET00021000, Scharlab) durante 10 minutos y a continuación se lavan con agua desionizada durante otros 10 min. Seguidamente, es necesario asegurar que cada sustrato se mantenga estirado e individualmente para evitar que las microfibrillas que los conforman se entrelacen y pierdan la disposición paralela que nos interesa para guiar el crecimiento del axón. Para ello empleamos tubos huecos de polietileno de 16 mm de diámetro y 7 cm de largo dentro de los cuales incluimos cada sustrato y estos se fijan con cinta. Estos tubos son simplemente el soporte que permite mantener las microfibrillas estiradas. A continuación, estos tubos se introducen en falcon de 50 mL donde tendrá lugar la polimerización.

- Añadir la solución con el monómero.** Previamente se prepara para cada sustrato a recubrir 24 mL de disolución que incluye electrolito de soporte sodio p-toluensulfonato 14mM (PTS; 152536, Sigma-Aldrich) en agua destilada y monómero Pirrol 14 mM (Py; 131709 Aldrich). Esta disolución se añade a los falcons de 50 mL y se deja incubar durante 1 hora a 4°C con vaivén.
- Añadir la solución con el dopante.** Se prepara para cada fibra una solución de 24 mL que incluye cloruro férrico 38 mM (FeCl₃;701122, Aldrich) en agua destilada. Esta disolución se añade a los falcon y se deja incubar en vaivén durante 48 horas a 4°C. El FeCl₃ es la especie oxidante elegida para sintetizar PPy. La reacción estequiométrica general entre Py y FeCl₃ se resume en la figura 10. En este caso, el polímero es dopado espontáneamente por aniones Cl⁻ durante la polimerización. El PPy no siempre forma una propagación lineal durante la polimerización ya que la temperatura de reacción tiene un gran impacto tanto en la cinética de polimerización como en las reacciones secundarias (Mao & Zhang, 2018).
- Lavado y secado.** Se realizan 3 lavados de 1 minuto en agitación con agua desionizada y 2 lavados de 1 minuto con etanol puro en agitación y por último se secan al vacío a 40°C durante 2 días.

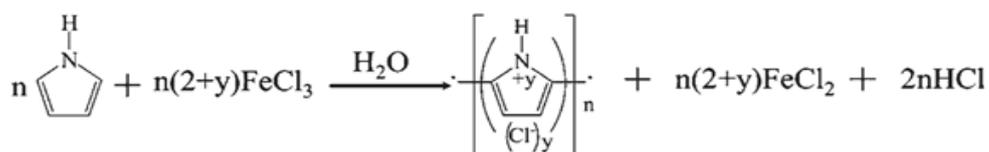


Figura 11. Polimerización química de PPy empleando cloruro férrico como oxidante (Mao & Zhang, 2018).

En estudios previos se probaron diferentes concentraciones eligiendo finalmente aquella que presentaba un recubrimiento homogéneo de PPy en las fibras (Figura 12 C y D). Se probó una disolución la mitad de concentrada a la indicada pero no había una continuidad entre las partículas de PPy y el recubrimiento no era homogéneo. Por otro lado, concentraciones mayores a la indicada generan muchos agregados que incluso disminuyen la adhesión celular.

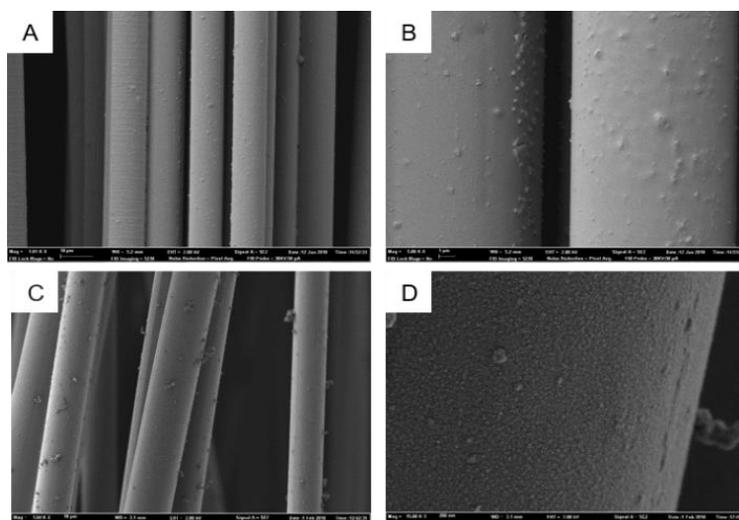


Figura 12. Imágenes de morfología superficial obtenidas mediante FESEM de las fibras de PLA (A y B) y de PPy (C y D).

3.2.3. Fibras de oro

Se emplearon los mismos carriles de 600 microfibras de PLA de 10 μm de diámetro, pero en vez de recubrirlas con PPy, se efectuó un recubrimiento con oro denominado "sputtering" de oro en vacío. Se llevaron al Servicio de Microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia y se probaron dos espesores diferentes en función del tiempo. El proceso de recubrimiento deposita 4.7 $\text{\AA}/\text{s}$ de oro y se realizó durante 120 y 240 segundos. Posteriormente se midió su conductividad y se comparó con la de las fibras recubiertas con PPy.

3.2.4. Bandas de oro

Se obtuvieron bandas de oro a partir de hilo de oro macizo (73100; Electron Microscopy Sciences), se escogió un grosor de 200 μm de diámetro el cual se pasó por la extrusora (Haake Rheomex CTW100) 3 veces para conseguir una fina banda con el fin de mejorar la siembra de las células en comparación a un hilo cilíndrico.

3.3. Fabricación dispositivo estimulación eléctrica

Para la obtención del dispositivo de estimulación, se requieren ciertas características para que el ensayo biológico pueda desarrollarse. Necesitamos que sea estanco, que mantenga las fibras tensas y que posteriormente permita tomar las fotografías sin necesidad de mover el montaje.

1. **Base del dispositivo.** Se escogió el *slide* Millicell EZ estéril de 8 pocillos (PEZGS0816, Millipore) como placa base sobre la cual desarrollar el dispositivo de ES. Este dispositivo consiste en una placa rectangular lisa sobre la cual se puede insertar otra pieza móvil y una vez unidas ambas partes constituyen una placa multipocillo de 8 compartimentos separados, pudiendo realizar hasta 8 repeticiones del mismo experimento. El dispositivo cuenta además con una tapa superior para asegurar la esterilidad durante los ensayos celulares.
2. **Adición de fibras electroconductoras.** La capacidad de ensamblaje del *slide* Millicell, permite introducir dos fibras dispuestas paralelamente entre ambas piezas que conforman dicho dispositivo, de forma que cuando ambas se ensamblan, la fibra queda retenida de forma estirada y fija en modo sándwich. Cada fibra recorre un total de cuatro pocillos y sobresale por ambos extremos dejando libres las membranas de PCL recubiertas para el contacto con las pinzas del dispositivo generador de corriente eléctrica.
3. **Sellado del dispositivo.** Para obtener un sistema estanco que no presente fugas de medio de cultivo y pueda apoyar el crecimiento celular se empleó URGO Grietas Filmogel®. Se trata de un apósito líquido que en contacto con el aire solidifica con rapidez y forma un film sellante, hidrofóbico y no tóxico para las células. Una vez se han incluido las fibras electroconductoras y se han ensamblado ambas partes del dispositivo reteniendo la fibra en modo sándwich, se aplica doble capa de Filmogel en todas las juntas para evitar fugas de medio de cultivo. Hay que poner especial atención en aquellas zonas donde sobresalen las fibras dado que presentan mayor probabilidad de

fuga y el sellado con Filmogel debe hacerse más cuidadosamente. Tras 1 hora para asegurar la completa solidificación y formación del film sellante, se añade suficiente medio no estéril a cada uno de los 8 pocillos y se deja durante 24 horas para asegurar que el dispositivo es 100% estanco. Si tras 24 horas el medio ha fugado, se lavará y secará el dispositivo y se añadirá nuevamente otra capa de Filmogel en aquellas zonas que hayan presentado fugas.

3.4 Medida de la conductividad y resistencia

Para llevar a cabo la caracterización eléctrica de los biomateriales, se midió superficialmente la corriente eléctrica circulante al aplicar un voltaje conocido mediante una fuente de alimentación PPS (Programmable Power Supply). Los valores fueron obtenidos empleando un multímetro, lo que permitió calcular la resistencia eléctrica aparente de la superficie de los materiales (R) según la ley de Ohm.

$$V = R \cdot I \quad \text{Ecuación 1.}$$

donde V es el potencial eléctrico en voltios, I es la corriente en amperios y R es la resistencia en ohms. La conductividad aparente en el plano (σ_{DC}) de los materiales podría obtenerse mediante la ecuación:

$$\sigma = \frac{l}{R \cdot S} \quad \text{Ecuación 2.}$$

donde l es la distancia entre los contactos a temperatura ambiente, R es la resistencia eléctrica y S es la sección transversal del material. De esta forma se permite normalizar la resistencia eléctrica.

3.5. Esterilización, sanitización y acondicionamiento del dispositivo

1. **Esterilización del dispositivo.** Una vez se incluyen las fibras y se sella el dispositivo, es necesario su correcta y completa esterilización. Para evitar daños a cualquier material, se realiza una primera esterilización por radiación ultravioleta (UV) en cabina de flujo laminar durante 10 minutos por cada lado del dispositivo. A continuación, se realizan 3 lavados con etanol al 70 % (ET00021000, Scharlab) añadiendo 700 μ L por pocillo para asegurar que todas las fibras se esterilizan correctamente, también en cabina de flujo laminar. Por último, se lavan todos los pocillos con agua desionizada autoclavada realizando 3 lavados de 10 minutos.
2. **Preacondicionamiento del dispositivo.** Adición a cada uno de los pocillos 700 μ L de tampón bloqueo compuesto por medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto nivel de glucosa (4.5 g/L) (DMEM; 21331020, Fisher), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; 10270-106/A3381E, Fisher) y un 1% de penicilina/estreptomina (P/S; 15140122, Fisher). Introducción del dispositivo en incubador a 37°C durante 24 horas en atmósfera húmeda con un contenido del 5% de CO₂.

3.6. Ensayo *in vitro* del cultivo con estimulación eléctrica

3.6.1. Cultivo celular de SCs

En el ensayo se han empleado SCs de rata (rSCs; P10301, Innoprot). Primeramente, se descongelaron y expandieron en frascos de cultivo celular hasta conseguir una densidad celular suficiente para el ensayo. Estos frascos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; 10010015, Thermo Scientific) y se tripsinizaron para revertir las uniones entre células y entre las células y la matriz mediante una solución tripsina/EDTA (T/E; 25200-072, Invitrogen) en el incubador a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se empleó un volumen doble al de T/E de tampón bloqueo para inhibir la tripsinización.

El medio de cultivo conteniendo las células en suspensión es recolectado y centrifugado a 1080 rpm 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y el pellet con las células se resuspende en medio de cultivo para células de Schwann suplementado al 5% con FBS y al 1 % con P/S y suplemento de crecimiento para células de Schwann (SCGS) (P60123, Innoprot).

3.6.2. Extracción y cultivo de DRG de pollo

Todos los huevos de pollo embrionados empleados para la realización del presente trabajo fueron proporcionados por la granja *Pico de oro* (Villareal, Castellón). Se han empleado embriones de 9 días, ya que permiten un mejor manejo a la hora de la extracción por su tamaño y mantienen un estado de desarrollo no muy avanzado adecuado para el posterior ensayo *in vitro* (Powell et al., 2014). Los embriones se mantienen en la estufa a 37°C hasta el momento de la extracción. Todos los instrumentos tales como tijeras, bisturíes y pinzas necesarios han sido previamente esterilizados en el autoclave. El procedimiento detallado a continuación ha sido extraído del protocolo desarrollado por Powell et al. (2014) para el aislamiento y cultivo de neuronas sensoriales disociadas de embriones de pollo.

Para la extracción de los DRG se ha empleado PBS estéril y medio de cultivo de DRG de pollo, que contiene Ham's Nutrient Mixture F12 (HAM F12; 21331-020, Invitrogen), HEPES 1M al 1% (H-9136, Sigma,) L-Glutamina 200 mM al 1% (03-020-1B, Sigma,), Penicilina/Estreptomina(P/S; 15140122, Fisher) al 1% y suplemento N2 al 1%. Ambas soluciones precalentadas en un baño de agua a 37°C. Primeramente, se coloca el huevo seleccionado en la campana de flujo laminar y, en adelante, todas las acciones citadas serán se realizarán en condiciones asépticas.

Se rompe el huevo y se vierte el contenido en una placa de Petri de plástico. Con pinzas estándar se transfiere el embrión a otra placa de Petri y se decapita pellizcando el cuello con unas pinzas finas. El cuerpo se transfiere a otra placa Petri limpia y mediante una pipeta Pasteur se agrega PBS para mantener el tejido húmedo. Se posiciona el embrión en su lado dorsal con la ayuda de pinzas y la placa Petri con el tejido embrionario se coloca bajo una lupa de disección.

Con unas pinzas finas se realiza una incisión vertical en la línea media desde la cola hasta el cuello pellizcando la dermis en desarrollo para exponer el corazón, los pulmones y los demás órganos internos. Con el uso de 2 juegos de pinzas finas, por un lado, se agarra simultáneamente

el cuello y otro tejido inmediatamente superior al corazón para eviscerar al animal. A continuación, se extraen los órganos cardiovasculares, respiratorios o digestivos restantes para exponer las costillas, la columna vertebral y los DRG en desarrollo. El DRG se recolecta a ambos lados de la columna vertebral lumbar, inferior a las costillas. Para ello se agarra el nervio en desarrollo que llega desde el DRG hacia la periferia y se tira de él. El DRG extraído se deposita en una nueva placa Petri que contiene medio de cultivo de DRG de pollo. En este momento se observan los DRG extraídos bajo la lupa y se retira cualquier exceso de tejido, como las raíces dorsales o ventrales que pueden haberse adherido a los DRG.

3.6.3. Siembra celular en el dispositivo y estimulación eléctrica

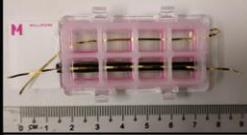
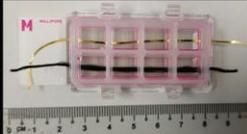
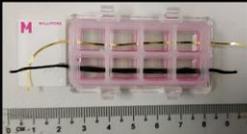
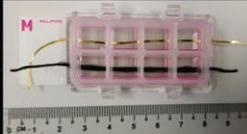
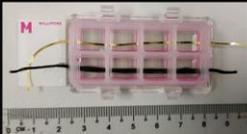
Se emplearon las rSCs en fase 4 cultivadas acorde al punto 3.6.1. Se aplican 3 Gotas de 50.000 células en cada pocillo del dispositivo para alcanzar una densidad celular total de 150.000 células/pocillo. De esta forma se consigue una distribución uniforme. Para asegurar una correcta adhesión celular, es necesario que el pocillo esté libre de medio de cultivo y las células se dejan 15 minutos para que se adhieran a la fibra y no al fondo del pocillo. A continuación, se añaden 600 μ L de medio de DRG de pollo por pocillo. Las células se dejan durante 20 horas para que se adhieran completamente antes de comenzar con la estimulación. Se realizan 2 ciclos de ES. Cada uno de ellos consiste en 4 horas de estimulación seguidas de 20 horas sin estimular. La corriente se fija con el generador (DC POWER SUPPLY HY 3003D-3, LENDHER) (Figura 13) a 50 mA o 100 mA, dependiendo del grupo. Los distintos grupos se explican en la Tabla 1.



Figura 13. Imagen del generador de corriente eléctrica.

Tras los ciclos de estimulación se procede a la extracción de los DRG de pollo acorde al punto 3.6.2. y una vez sembrados se dejan 60 minutos para asegurar su adhesión a los materiales conductores. Se siembra un DRG por pocillo y tras 20 horas se comienzan con los 2 ciclos de estimulación (4 horas estimulado / 20 horas no estimulado) con la corriente fijada. Es necesario tener en cuenta que en el sistema combinado a 50 mA se produjo la rotura de la banda de oro tras el primer ciclo de estimulación por lo que resultó imposible estimular los DRG.

Tabla 1. Grupos del ensayo. Para la ES se fijan la corriente con el generador a 50 mA y 100 mA y se llevan a cabo 4 series de estimulación, 2 series para las SCs y 2 series para las SCs junto con el DRG. Cada serie de estimulación comprende 24 horas (20 hrs sin estímulo y 4 horas con el estímulo eléctrico de la corriente indicada).

0 mA		50 mA		100 mA	
Bandas oro		Banda oro		Banda oro	
		Sistema combinado		Sistema combinado	
		Banda oro		Banda oro	
		PPy		PPy	

3.7. Caracterización celular *in vitro*. Técnicas inmunocitoquímicas

Tras el cocultivo de las SCs y DRG con ES, se procedió a la fijación de las células a los biomateriales, de esta forma se preserva la ultraestructura biológica de las células y su interacción con los biomateriales empleados. La fijación permite realizar las tinciones inmunocitoquímicas para posteriormente observar las células mediante microscopía de fluorescencia.

Primeramente, se eliminó el medio de los pocillos del dispositivo y estos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; P60305, Innoprot). Para la fijación se empleó paraformaldehído al 4% (PFA; 47608, Sigma-Aldrich) en tampón fosfato, PB 0,1M (dilución 1:1 de PB 0,2M/agua destilada), durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 2 lavados con PB 0.1 M de 5 minutos, de esta forma se eliminan los posibles restos de PFA.

Posteriormente se añade solución de bloqueo con el fin de bloquear las uniones inespecíficas y permeabilizar la membrana celular. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora en cámara húmeda con la solución bloqueo que contiene PB 0.1 M, NGS al 10 % y Tween 20 al 0.1% (P1379, Sigma-Aldrich). A continuación, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos conjugados (tabla 2) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

A continuación, se quita el anticuerpo y se realizan 2 lavados con PB 0.1 M. Se procede a la tinción con 4',6-Diamino-2-Fenolindol (DAPI; D9564, Sigma-Aldrich) a una dilución 1/1000 en tampón de bloqueo durante 15 minutos en cámara húmeda a T ambiente. Finalmente se quita el DAPI y se realizan 2 lavados con PB 0.1 M. Se añade medio de montaje para proceder a su visualización en microscopio de fluorescencia y su fotografiado en lupa de fluorescencia.

Tabla 2. Anticuerpos conjugados utilizados en las técnicas inmunocitoquímicas.

Anticuerpo	Casa comercial	Número catálogo	Concentración	Marcador
S100B Polyclonal Antibody, ALEXA FLUOR® 488 Conjugated	Bioss antibodies	bs-2015R-A488	1/400	Proteína homodimérica encontrada en células derivadas de la cresta neural.
S100B Polyclonal Antibody, ALEXA FLUOR® 647 Conjugated	Bioss antibodies	bs-2015R-A647	1/400	Proteína homodimérica encontrada en células derivadas de la cresta neural.
Beta tubulin Monoclonal Antibody, ALEXA FLUOR® 488 Conjugated	Bioss antibodies	bsm-33034M-A488	1/150	Tubulina β de clase III específica para neuronas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización macroscópica

Siguiendo el procedimiento mencionado en el punto 3.2 se obtuvieron las bandas de oro y las fibras de PLA recubiertas con PPy y con oro respectivamente, haciéndolas así electroconductoras para la ES de las células. En la figura 14 se observan las fibras obtenidas a escala macroscópica y su disposición en el dispositivo para el cultivo celular.

Como se puede apreciar en la figura 14 A y C en el caso de las fibras recubiertas con oro y PPy las bandas de PCL de los extremos permitieron, por un lado, mantener las fibras alineadas y por otro, asegurar un buen contacto con las pinzas del generador de corriente eléctrica. La ausencia de estas estructuras más anchas en el caso de la banda de oro, provocó que este se rompiera antes de comenzar con el segundo ciclo de estimulación en algunos grupos.

El dispositivo desarrollado, permitió además realizar 8 repeticiones empleando 1 o 2 condiciones de estimulación diferentes. Por lo tanto, si se desea, se puede reducir el número de repeticiones de cada experimento y realizar 2 experimentos diferentes por cada *slide* Milicell. Esto resulta interesante si lo que se busca es hacer un cribado rápido inicial de condiciones de estimulación. Además, el sellado con Filmogel evitó eficientemente las fugas de medio de cultivo.

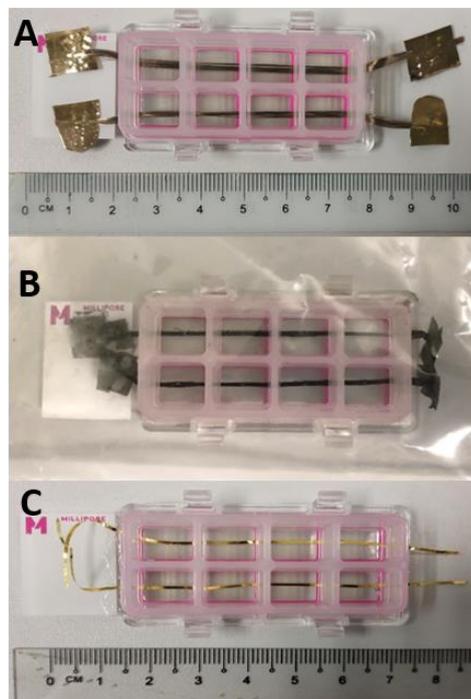


Figura 14. Visualización del montaje de los dispositivos para el cultivo celular. Recubrimiento con oro (A); Recubrimiento con PPy (B) o bandas de oro (C).

4.2. Caracterización eléctrica

Una vez obtenidos los distintos materiales, se realizó una medición de la resistencia. Para las fibras recubiertas con oro, dado que es la primera vez que se empleaba dicho procedimiento de sputtering, se llevó a cabo un ensayo previo para determinar que el recubrimiento no se desprendía al incluir la fibra en el dispositivo, con el paso del tiempo (4 días) o con el procedimiento de esterilización.

Las diferencias en los valores de resistencia entre los recubrimientos a 120 y 240 segundos se muestran en la tabla 3. En el caso del recubrimiento a 120 segundos, unas fibras presentan mayores resistencias que otras, lo que se refleja en una gran variabilidad en los valores medios y una desmesurada desviación estándar. Esto se debe a que el recubrimiento es insuficiente y no es uniforme por todo el perímetro de la fibra de PLA, principal problema derivado de realizar el procedimiento de sputtering pues el oro es depositado superficialmente y no es tan estable como una polimerización química (PPy).

En cuanto al recubrimiento con 240 segundos, los valores de resistencia se mantienen con el tiempo y tras el procedimiento de esterilización. Las medidas son más reproducibles que a 120 segundos dado que el recubrimiento es uniforme y las partículas de oro no se desprenden, esta uniformidad no se consigue a 120 segundos.

Para su comparación con la resistencia del medio de cultivo, se calcula la resistencia por unidad de longitud. Con el recubrimiento a 120 segundos la resistencia que ofrece la fibra, 1400 Ω/cm es mucho más alta que la del medio de cultivo, 28.24 Ω/cm , por tanto, se descarta este grupo. Con el recubrimiento a 240 segundos la resistencia es menor, 115 Ω/cm se encuentra dentro del orden de magnitud del medio de cultivo.

Tabla 3. Medida de la resistencia de las fibras de PLA en el dispositivo recubiertas con distintos espesores de oro después del recubrimiento (R_0), tras 4 días (R_4) y tras 3 lavados con etanol al 70 %.

Tiempo Recubrimiento (s)	R_0 (Ω)	R_4 (Ω)	R_4 tras esterilizar (Ω)	Resistencia por unidad de longitud Ω/cm
120	18750 \pm 22980	8250 \pm 9546	9800 \pm 11596	1400 \pm 1647
240	860 \pm 905	875 \pm 884	810 \pm 834	115.7 \pm 119.1

La tabla 4 recoge los valores de resistencia de los materiales ensayados y el cálculo de la resistencia por unidad de longitud con la finalidad de poder comparar diferentes estructuras y tratamientos. Se observa que la banda de oro supuso el material más interesante para estudiar los efectos de la ES dado que presentaba una resistencia muy baja, 0.04 Ω/cm , lo que permite el paso de corriente eléctrica sin generar problemas de pH en el medio, dado que la mayor parte de la corriente pasa por la banda de oro y no por el medio. Se descartan los recubrimientos con oro dado que no se han obtenido recubrimientos reproducibles y el método de sputtering no es el mejor para hacer este tipo de fibras electroconductoras.

Tabla 4. Medidas de resistencia de los materiales electroconductores.

	Recubrimiento oro 120	Recubrimiento oro 240	Bandas oro	Polipirrol
R(Ω)	9800 \pm 11596	810 \pm 834	0,34 \pm 0,03	7400 \pm 400
R por unidad de longitud (Ω /cm)	1400 \pm 1657	115.7 \pm 119.1	0.048 \pm 0.005	3700 \pm 200

Los valores de conductividad se calcularon empleando la Ecuación 2 a partir de las medidas de resistencia y se reflejan en la tabla 5. Las fibras recubiertas de oro a 120 segundos se descartaron por la limitada reproducibilidad del recubrimiento (Tabla 3) y por su baja conductividad, $5,05 \cdot 10^2$ S/m; al igual que las recubiertas a 240 segundos, $3,91 \cdot 10^3$ S/m, en comparación a la elevada conductividad que presentan las bandas de oro $3,25 \cdot 10^6$ S/m. Estas, por tanto, se incluyeron en el ensayo celular de ES.

Por otro lado, El PPy no presentó una conductividad especialmente atractiva si la comparamos con la del resto de materiales o con la conductividad del medio de cultivo (1,95 S/m). No obstante, se incluyó en el ensayo celular para comparar ambos materiales puesto que el PPy es un material ampliamente utilizado en regeneración neural con ES y muy bien caracterizado para este tipo de aplicaciones.

Tabla 5. Medidas de conductividad (S/m) de los materiales electroconductores.

	Recubrimiento oro 120	Recubrimiento oro 240	Bandas oro	Polipirrol
Conductividad (S/m)	$5,05 \cdot 10^2 \pm 5,98 \cdot 10^2$	$3,91 \cdot 10^3 \pm 4,02 \cdot 10^3$	$3,25 \cdot 10^6 \pm 3,27 \cdot 10^6$	$5,78 \cdot 10^1 \pm 4,29$

Finalmente, una vez caracterizados eléctricamente los materiales, los ensayos descritos en el próximo apartado tienen como objetivo realizar un cribado inicial con distintas condiciones de estimulación y distintas disposiciones de los materiales con el fin de demostrar que son capaces de estimular las células mediante el paso de corriente eléctrica a través de ellos. En los dispositivos se incluyeron las bandas de oro por sus buenas propiedades eléctricas relacionadas con su baja resistencia y elevada conductividad y el PPy, dado que es un material ampliamente utilizado en nuestro laboratorio y en estudios de ES.

4.3. Ensayo celular

Ensayo celular en bandas de oro

Con el fin de comprobar la viabilidad de las SCs sobre las bandas de oro y la posible citotoxicidad de dicho material, se realizó un estudio previo a la ES en el cual se sembraron únicamente SCs. En la figura 15, se observa que el oro no resultó citotóxico y permitió una buena adhesión de las células, las cuales recubren la superficie de la banda de forma uniforme. Resulta ventajoso sembrar las SCs y estimularlas previamente a la siembra de los DRG debido a que liberan factores de crecimiento que promueven la extensión axonal y mejoran la adhesión del DRG. (Koppes et al., 2013; Jessen et al., 2015).

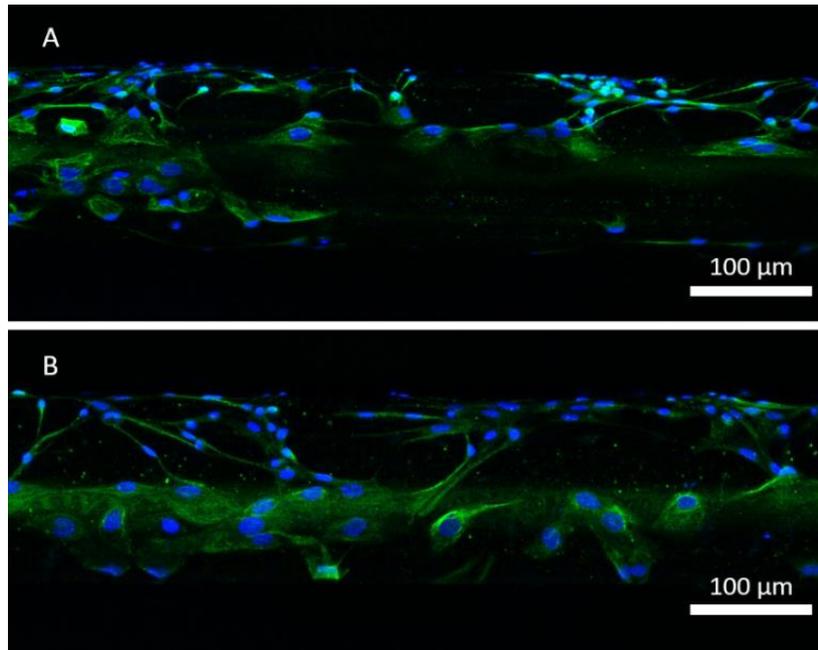


Figura 15. Imágenes obtenidas con microscopio de fluorescencia de las SCs sembradas sobre las bandas de oro en ausencia de ES. Se observan las células en verde (S100β) y en los núcleos en azul (DAPI).

Una vez comprobada la viabilidad y adhesión celular de las SCs, se procedió al cocultivo con los DRG y se evaluó la viabilidad y adhesión de los mismos. En la Figura 16 se observa que los DRG presentaron una adhesión muy pobre y solo el 25% de ellos consiguió adherirse y extender axonalmente. (Figuras 16 A y B). De hecho, el oro permite una buena extensión y las proyecciones neuronales se mantienen sobre el material y no migran hacia el fondo del pocillo. Las bandas de oro suponen un material muy interesante para la estimulación de células neuronales, derivado de su baja resistencia y elevada conductividad eléctrica. Sin embargo, esta disposición en forma de bandas resulta en una estructura en 2 dimensiones (2D), mucho menos atractiva para su aplicación en ingeniería tisular que un modelo en 3 dimensiones (3D). Emplear un material 2D impidió la adhesión de los DRG, por tanto sería interesante modificar la superficie del oro añadiendo recubrimientos con proteínas de matriz extracelular (David et al., 1995) o desarrollar un modelo 3D de microfibrillas de oro para facilitar la adhesión.

Las SCs no se observan en la figura 16 dado que la lupa de fluorescencia no presenta filtro rojo, pero tras su observación en el microscopio de fluorescencia, se determinó que las SCs en el control no estimulado están vivas y son viables, aunque la autofluorescencia del oro en el rojo impedía su correcta visualización. No obstante en el momento de sembrar los DRG sobre la banda de oro, fue necesario dejar los pocillos vacíos durante unos 60 minutos para que se adhiriesen y eso pudo tener un efecto negativo sobre ambos grupos celulares.

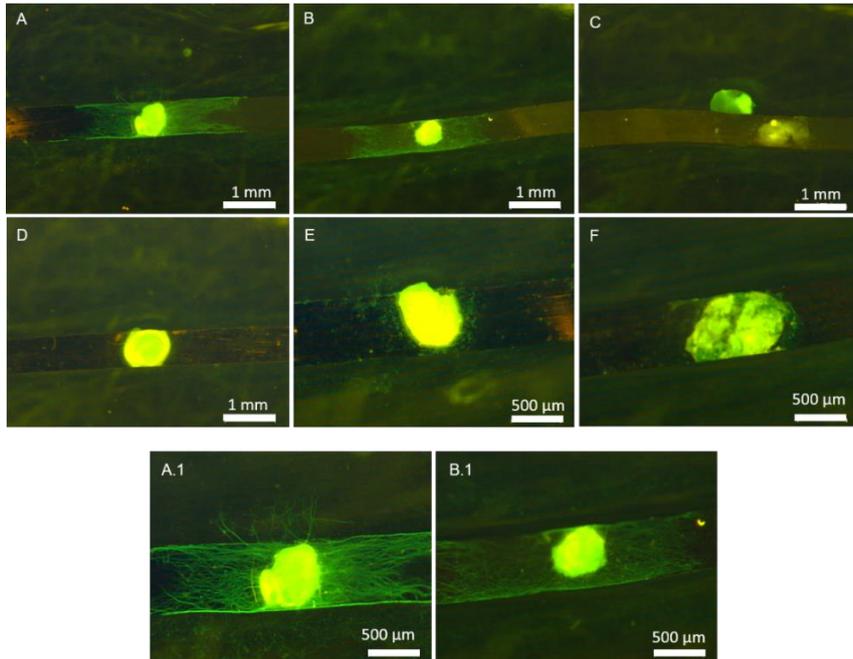


Figura 16. Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (β III tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observó la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre las bandas de oro con las SCs. Las figuras A.1 y B.1 reflejan el detalle a 6.3 aumentos de las figuras A y B respectivamente. Se trata del grupo control.

El resultado de estimular sobre las bandas de oro a las SCs en primer lugar y al DRG posteriormente en cocultivo, se refleja en la figura 17. Respecto a las SCs, Tanto a 50 mA como a 100 su observación en el microscopio de fluorescencia reflejó que estaban muertas. Tampoco se apreció extensión axonal por lo que dichas corrientes son demasiado elevadas y matan a ambas poblaciones celulares. Se concluye que la corriente fue capaz de pasar por el material conductor y tuvo un efecto sobre las células. Estas estaban muertas o presentaban muy poca extensión por lo que sería necesario rebajar la corriente por debajo de 50 mA.

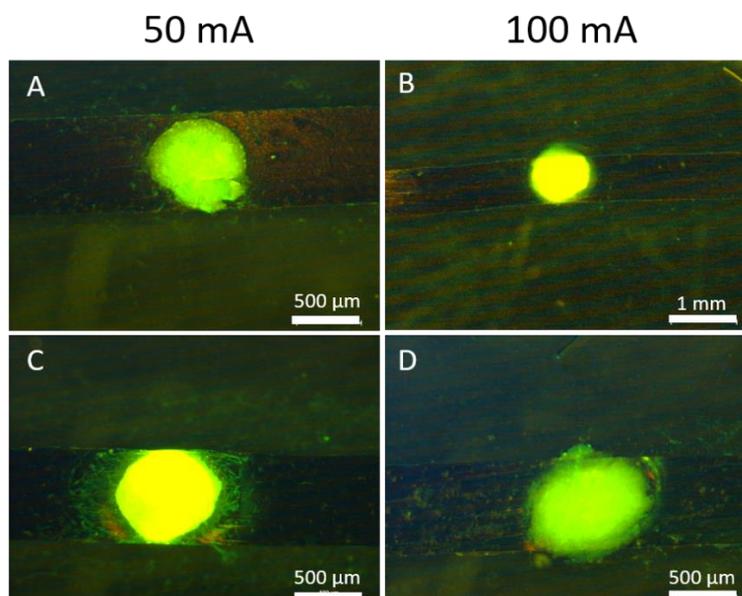


Figura 17. Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (β III tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observa la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre la banda de oro con las SCs a distintas intensidades de corriente.

Ensayo celular en PPy

El PPy es un material muy bien caracterizado y usado ampliamente por no presentar citotoxicidad celular (Williams & Doherty, 1994; Yu et al., 2013; Xu et al., 2019). Además, el tiempo de desarrollo de los presentes dispositivos y su coste son elevados. Por estos motivos no se realizó un ensayo previo sin estimulación para determinar su citotoxicidad, sino que directamente se probaron distintas condiciones de estimulación y se comparó, frente al oro, su capacidad para facilitar la adhesión celular.

Tras estimular ambas poblaciones celulares secuencialmente sobre las fibras de PLA recubiertas con PPy, se observó que tanto a 50 mA como a 100 mA las SCs resultaron viables incluso después del proceso de siembra y adhesión de los DRG, tiempo en el cual los pocillos estuvieron vacíos de medio. Las fibras de PPy mantienen mejor la humedad y por tanto permitieron la supervivencia de las SCs.

Se observó extensión axonal guiada por las fibras (Figura 18) debido a que el PPy es peor conductor que el oro y por tanto la aplicación de corriente eléctrica no generó un efecto tan drástico en las células en comparación a la banda de oro y no se pudo apreciar una diferencia significativa entre el grupo estimulado a 50 mA y a 100 mA.

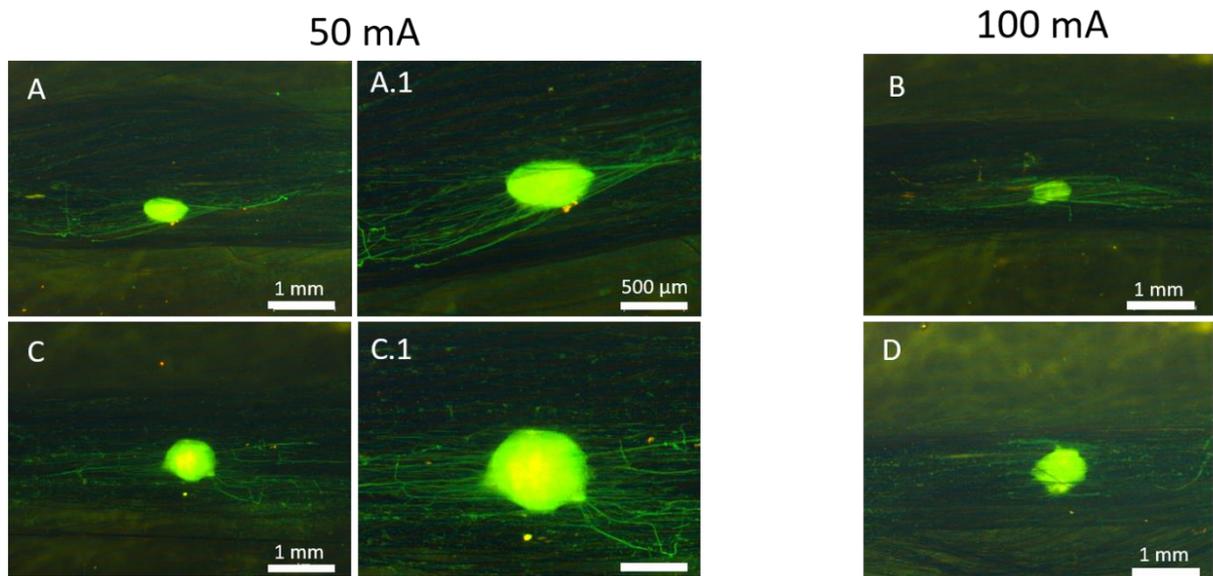


Figura 18. Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (β III tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observa la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre las fibras de PLA recubiertas de PPy con las SCs a distintas intensidades de corriente.

El PPy es, por tanto, un material muy favorable para la viabilidad y adhesión celular debido a que está conformado por fibrillas con estructura cilíndrica de diámetro micrométrico que favorecen la adhesión a diferencia de la banda de oro lisa 2D.

Ensayo celular en sistema combinado

El efecto de la estimulación a 50 mA no se pudo estudiar puesto que las bandas de oro se rompieron impidiendo el paso de la corriente y por tanto la estimulación. Esto se debió a que, tras poner y quitar las pinzas del generador de corriente durante el proceso de siembra del DRG, las bandas de oro se fracturaron.

En el sistema combinado, en ausencia de ES, los DRG presentaron extensión axonal (figura 19 A y C) y de esta forma se ha impedido la muerte celular. Se comparó con la estimulación a 100 mA (Figura 19 B y D) y se confirmó que se debe a una corriente demasiado alta para las células. Es necesario rebajarla en futuros experimentos ya que, en su ausencia, la extensión tiene lugar.

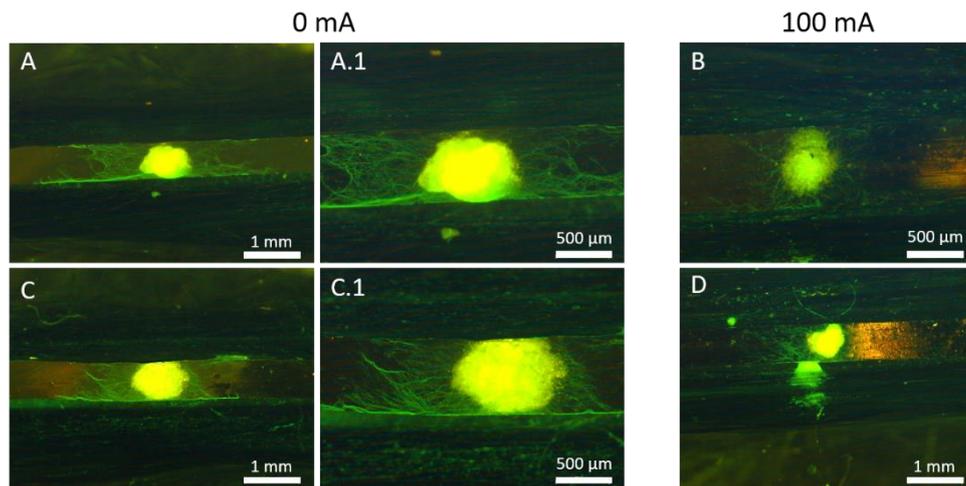


Figura 19. Imágenes obtenidas con la lupa de fluorescencia. Se refleja en verde (β III tubulina) el marcaje de las neuronas. Se observa la extensión axonal de los DRG de pollo sembrados sobre el sistema combinado con las SCs.

Si se compara la estimulación a 100 mA en el sistema combinado (Figuras 19 B y D) y en las bandas de oro (Figura 17 B y D), la adición de las fibras de PPy incrementa la viabilidad celular y por tanto, la extensión axonal. Esto podría deberse a que además de favorecer la adhesión celular, las fibras de PPy mantienen mejor la humedad y por tanto permiten la supervivencia de las SCs durante el procedimiento de siembra de los DRG.

Se puede apreciar por falta de literatura que los estudios en relación al oro como material electroconductor para la promover la regeneración nerviosa son muy limitados. Muy pocos artículos lo emplean para sembrar células y tejidos excitables (Heida, 2003; Ibrahim et al., 2012), sino que se centran principalmente en su uso como electrodos. Por tanto, por sus ya mencionadas atractivas características eléctricas y de biocompatibilidad para dicha aplicación sería necesaria más investigación futura.

Por un lado, se ha demostrado que es necesario disminuir las intensidades de corriente. Sin embargo, a la hora de determinar los parámetros de estimulación óptimos, los artículos suelen indicar el campo eléctrico, pero no la resistencia y por tanto no se puede conocer la corriente. Resulta difícil unificar la información contenida en la bibliografía teniendo en cuenta que en cada estudio los dispositivos de estimulación son diferentes en cuanto a materiales y configuración.

Sería interesante probar intensidades de entre 0.1-1 mA, ya que se ha demostrado que en coestimulación de SCs y neuronas, dicha intensidad aumenta hasta 3,2 veces más la extensión total (Koppes et al., 2011). Adicionalmente, la ventaja de preestimar las SCs por separado supone hasta un 30% de crecimiento de neuritas en relación a la coestimulación de ambos grupos celulares, lo que sugiere que la estimulación modifica el fenotipo de SCs mejorando la extensión (Koppes et al., 2013).

Por otro lado, en numerosos estudios, se emplean electrodos sumergidos en el medio de cultivo para generar una corriente eléctrica que estimula las células. No obstante, en estas aproximaciones se requieren puentes salinos para mantener el equilibrio de los electrolitos. Mediante el dispositivo desarrollado en el presente trabajo, se ha solventado dicho problema, pues la mayor parte de la corriente circula por los materiales electroconductores, cuya conductividad es mucho mayor a la del medio. No se han requerido puentes salinos o dispositivos homólogos. La corriente circula por los materiales y no por el medio de cultivo dado que no se observaron cambios de color en el medio debido a las posibles variaciones de pH.

Se ha demostrado, por tanto, que el dispositivo desarrollado permite obtener celdas de cultivo individualizadas en las cuales sembrar distintas poblaciones celulares de interés sobre los materiales conductores. Estos materiales conducen la corriente eléctrica y generan un efecto en las células, en este caso muerte celular debido al exceso de corriente. El principal problema de las bandas de oro reside en la baja adhesión, al ser un material con una estructura 2D, no la facilita tanto como las microfibrillas cilíndricas de PPy, las cuales poseen diámetros que topográficamente son más atractivos para las neuronas. La solución planteada a dicho problema fue desarrollar fibras compuestas por microfibrillas de oro de 10 μm de diámetro para simular esta topografía ventajosa de las fibras de PPy pero emplando un material con características eléctricas mucho más atractivas para la ES. No obstante, debido a la situación desatada por la crisis sanitaria en relación la COVID-19 no se pudo evaluar la posible mejora de este material en la adhesión celular.

5. CONCLUSIONES

En el presente proyecto se ha llevado a cabo un estudio preliminar, es una prueba de concepto con el fin de hacer un cribado inicial y se ha concluido:

- Se ha diseñado y fabricado un dispositivo estanco que permite la ES en bandas 2D y en microfibrillas 3D, en el cual se puede realizar un número elevado de réplicas (8 por dispositivo)
- De los 3 materiales conductores empleados (fibras recubiertas con oro, bandas de oro, fibras recubiertas con PPy), se observó una elevada resistencia y variabilidad en el caso del recubrimiento con oro, descartándose para la ES en el ensayo celular.
- Los materiales seleccionados para el ensayo no presentaron citotoxicidad, aunque sí se observó una baja adhesión en la banda de oro.
- Al emplear corrientes muy elevadas se provoca la muerte celular de los DRG. Por tanto, se ha demostrado que los dispositivos estudiados conducen según lo esperado, ya que cuando el DRG no es estimulado sobrevive y presenta una óptima extensión axonal.
- Derivado de este estudio prueba de concepto se puede concluir que el oro al ser más electroconductor y no citotóxico, resultaría un mejor material en comparación con el PPy pero en forma de microfibrillas unidas conformando un carril.

6. TRABAJO FUTURO.

Debido a la situación desatada por la crisis sanitaria en torno a la COVID-19, falta mucho por hacer y no se han podido realizar todas las mejoras planteadas en este apartado. El presente proyecto, por tanto, ha consistido en una prueba de concepto para probar la viabilidad del dispositivo desarrollado para el cultivo de células nerviosas y su ES.

Mediante el ensayo control en las bandas de oro se pudo determinar que los DRG presentan buena extensión en este material pero que el principal problema reside en la dificultad de adhesión. Sería útil en experimentos futuros añadir un recubrimiento previo a las bandas de oro con proteínas que faciliten la adhesión como Poli-L-Lisina o laminina. También se podrían fabricar carriles compuestos por microfibrillas de oro de 10 μm de diámetro. La rotura de las bandas de oro provocó que el grupo a 50 mA del sistema combinado no se pudieron estimular los DRG. Esto es debido a que, tras poner y quitar repetidamente las pinzas del generador de corriente, las bandas de oro se rompen. Una posible solución sería soldar los contactos con estaño, haciendo así el dispositivo más estable.

Principalmente, los trabajos futuros deberán enfocarse en modificar los parámetros de estimulación, bajar las corrientes a valores en torno a 0.1-1 mA y encontrar el valor óptimo para maximizar la extensión axonal dado que, con los parámetros empleados en el presente proyecto, los DRG mueren por exceso de corriente, aunque gracias a ello se ha determinado que realmente pasa corriente por el dispositivo desarrollado. También sería interesante determinar si es más ventajoso estimular únicamente las SCs, únicamente los DRG o ambas poblaciones celulares en cocultivo.

Finalmente, una vez determinados los parámetros de estimulación óptimos para maximizar la extensión axonal, un ensayo a realizar sería determinar la secreción de factores por parte de las SCs y su impacto en la extensión axonal mediante técnicas de biología molecular como ensayos ELISA. De la misma forma se podría determinar cambios en la expresión génica tanto de SCs como de neuronas para estudiar la alineación con el campo eléctrico.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- ALEX, S., & TIWARI, A. (2015). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(3), 1869-1894.
- BADNER, A., SIDDIQUI, A. M., & FEHLINGS, M. G. (2017). Spinal cord injuries: How could cell therapy help? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(5), 529-541.
- BALINT, R., CASSIDY, N. J., & CARTMELL, S. H. (2014). Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2341-2353.
- BARRETTE, B., HEBERT, M.-A., FILALI, M., LAFORTUNE, K., VALLIERES, N., GOWING, G., JULIEN, J.-P., & LACROIX, S. (2008). Requirement of Myeloid Cells for Axon Regeneration. *Journal of Neuroscience*, 28(38), 9363-9376.
- BRETT RUNGE, M., DADSETAN, M., BALTRUSAITIS, J., KNIGHT, A. M., RUESINK, T., LAZCANO, E. A., LU, L., WINDEBANK, A. J., & YASZEMSKI, M. J. (2010). The development of electrically conductive polycaprolactone fumarate–polypyrrole composite materials for nerve regeneration. *Biomaterials*, 31(23), 5916-5926.
- CANNING, D. R., HÖKE, A., MALEMUD, C. J., & SILVER, J. (1996). A POTENT INHIBITOR OF NEURITE OUTGROWTH THAT PREDOMINATES IN THE EXTRACELLULAR MATRIX OF REACTIVE ASTROCYTES. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 14(3), 153-175.
- CAO, Q. (2002). Differentiation of Engrafted Neuronal-Restricted Precursor Cells Is Inhibited in the Traumatically Injured Spinal Cord. *Experimental Neurology*, 177(2), 349-359.
- CHI, N. H., & DAHL, D. (1983). Autologous peripheral nerve grafting into murine brain as a model for studies of regeneration in the central nervous system. *Experimental Neurology*, 79(1), 245-264.
- CHOU, R.-H., LU, C.-Y., WEI-LEE, FAN, J.-R., YU, Y.-L., & SHYU, W.-C. (2014). The Potential Therapeutic Applications of Olfactory Ensheathing Cells in Regenerative Medicine. *Cell Transplantation*, 23(4-5), 567-571.
- DAVID, S., & AGUAYO, A. J. (1985). Axonal regeneration after crush injury of rat central nervous system fibres innervating peripheral nerve grafts. *Journal of Neurocytology*, 14(1), 1-12.
- DAVID, S., BRAUN, P. E., JACKSON, D. L., KOTTIS, V., & MCKERRACHER, L. (1995). Laminin overrides the inhibitory effects of peripheral nervous system and central nervous system myelin-derived inhibitors of neurite growth. *Journal of Neuroscience Research*, 42(4), 594-602.
- DING, P., YANG, Z., WANG, W., WANG, J., & XUE, L. (2014). Transplantation of bone marrow stromal cells enhances infiltration and survival of CNP and Schwann cells to promote axonal

sprouting following complete transection of spinal cord in adult rats. *American Journal of Translational Research*, 6(3), 224-235.

DUBOVÝ, P., KLUSÁKOVÁ, I., & HRADILOVÁ SVÍŽENSKÁ, I. (2014). Inflammatory Profiling of Schwann Cells in Contact with Growing Axons Distal to Nerve Injury. *BioMed Research International*, 2014, 691041.

EBADI, M., BASHIR, R. M., HEIDRICK, M. L., HAMADA, F. M., EL REFAEY, E., HAMED, A., HELAL, G., BAXI, M. D., CERUTIS, D. R., & LASSI, N. K. (1997). Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochemistry International*, 30(4-5), 347-374.

EL SEBLANI, N., WELLEFORD, A. S., QUINTERO, J. E., VAN HORNE, C. G., & GERHARDT, G. A. (2020). Invited review: Utilizing peripheral nerve regenerative elements to repair damage in the CNS. *Journal of Neuroscience Methods*, 335, 108623.

EVANS, G. R. D., BRANDT, K., NIEDERBICHLER, A. D., CHAUVIN, P., HERMANN, S., BOGLE, M., OTTA, L., WANG, B., & PATRICK, C. W. (2000). Clinical long-term in vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11(8), 869-878.

FITZGERALD, R., BASS, L. M., GOLDBERG, D. J., GRAIVIER, M. H., & LORENC, Z. P. (2018). Physiochemical Characteristics of Poly-L-Lactic Acid (PLLA). *Aesthetic Surgery Journal*, 38(suppl_1), S13-S17.

GEORGE, P. M., SAIGAL, R., LAWLOR, M. W., MOORE, M. J., LAVAN, D. A., MARINI, R. P., SELIG, M., MAKHNI, M., BURDICK, J. A., LANGER, R., & KOHANE, D. S. (2009). Three-dimensional conductive constructs for nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(2), 519-527.

GÓMEZ-VILLAFUERTE, R., RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, F. J., ALASTRUE-AGUDO, A., STOJKOVIC, M., MIRAS-PORTUGAL, M. T., & MORENO-MANZANO, V. (2015). Purinergic Receptors in Spinal Cord-Derived Ependymal Stem/Progenitor Cells and Their Potential Role in Cell-Based Therapy for Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, 24(8), 1493-1509.

HAMID, S., & HAYEK, R. (2008). Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: An overview. *European Spine Journal*, 17(9), 1256-1269.

HEATH, C. A., & RUTKOWSKI, G. E. (1998). The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends in Biotechnology*, 16(4), 163-168.

HEIDA, T. (2003). *Electric Field-Induced Effects on Neuronal Cell Biology Accompanying Dielectrophoretic Trapping* (Vol. 173). Springer Berlin Heidelberg.

HOUSCHYAR, K. S., MOMENI, A., PYLES, M. N., CHA, J. Y., MAAN, Z. N., DUSCHER, D., JEW, O. S., SIEMERS, F., & SCHOONHOVEN, J. VAN. (2016). The Role of Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. *Plastic Surgery International*, 2016, 4175293.

HUETE GARCÍA, A., & DÍAZ VELÁZQUEZ, E. (2012). Análisis sobre la lesión medular en España: Informe de resultados. Federación Nacional Aspaym.

HUMPOLICEK, P., KASPARKOVA, V., SAHA, P., & STEJSKAL, J. (2012). Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals*, 162(7-8), 722-727.

HUSSAIN, M. A., M. A. KABIR y A. K. SOOD (2009). "On the cytotoxicity of carbon nanotubes." En: *Current Science* (00113891) 96.5 (vid. pág. 30).

IBRAHIM, A. M. S., GERSTLE, T. L., RABIE, A. N., SONG, Y.-A., MELIK, R., HAN, J., & LIN, S. J. (2012). Nanotechnology in Plastic Surgery: *Plastic and Reconstructive Surgery*, 130(6), 879e-887e.

JAFFE, L. F., & POO, M.-M. (1979). Neurites grow faster towards the cathode than the anode in a steady field. *Journal of Experimental Zoology*, 209(1), 115-127.

JESSEN, K. R., MIRSKY, R., & LLOYD, A. C. (2015). Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a020487.

KIM, B.-S., & MOONEY, D. J. (1998). Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 16(5), 224-230.

KOO, J., MACEWAN, M. R., KANG, S.-K., WON, S. M., STEPHEN, M., GAMBLE, P., XIE, Z., YAN, Y., CHEN, Y.-Y., SHIN, J., BIRENBAUM, N., CHUNG, S., KIM, S. B., KHALIFEH, J., HARBURG, D. V., BEAN, K., PASKETT, M., KIM, J., ZOHNY, Z. S., ... ROGERS, J. A. (2018). Wireless bioresorbable electronic system enables sustained nonpharmacological neuroregenerative therapy. *Nature Medicine*, 24(12), 1830-1836.

KOPPES, A. N., NORDBERG, A. L., PAOLILLO, G., GOODSSELL, N., DARWISH, H., ZHANG, L., & THOMPSON, D. M. (2013). Electrical Stimulation of Schwann Cells Promotes Sustained Increases in Neurite Outgrowth. *Tissue Engineering Part A*, 130924230853000.

KOPPES, A. N., SEGGIO, A. M., & THOMPSON, D. M. (2011). Neurite outgrowth is significantly increased by the simultaneous presentation of Schwann cells and moderate exogenous electric fields. *Journal of Neural Engineering*, 8(4), 046023.

KRAMES, E. S. (2014). The Role of the Dorsal Root Ganglion in the Development of Neuropathic Pain. *Pain Medicine*, 15(10), 1669-1685.

LI, YA, HUANG, Z., PU, X., CHEN, X., YIN, G., WANG, Y., MIAO, D., FAN, J., & MU, J. (2020). Polydopamine/carboxylic graphene oxide-composited polypyrrole films for promoting adhesion and alignment of Schwann cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 191, 110972.

LI, YONGCHAO, WEISS, M., & YAO, L. (2014). Directed Migration of Embryonic Stem Cell-derived Neural Cells In An Applied Electric Field. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(5), 653-662.

LINDBORG, J. A., MACK, M., & ZIGMOND, R. E. (2017). Neutrophils Are Critical for Myelin Removal in a Peripheral Nerve Injury Model of Wallerian Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 37(43), 10258-10277.

LOPEZ-VERILLI, M. A., PICOU, F., & COURT, F. A. (2013). Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system: Glial exosomes promote axonal regeneration. *Glia*, 61(11), 1795-1806.

LU, H. H., COOPER, J. A., MANUEL, S., FREEMAN, J. W., ATTAWIA, M. A., KO, F. K., & LAURENCIN, C. T. (2005). Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: In vitro optimization studies. *Biomaterials*, 26(23), 4805-4816.

LUO, S.-C., MOHAMED ALI, E., TANSIL, N. C., YU, H., GAO, S., KANTCHEV, E. A. B., & YING, J. Y. (2008). Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) Nanobiointerfaces: Thin, Ultrasoft, and Functionalized PEDOT Films with in Vitro and in Vivo Biocompatibility. *Langmuir*, 24(15), 8071-8077.

MAO, J., & ZHANG, Z. (2018). Polypyrrole as Electrically Conductive Biomaterials: Synthesis, Biofunctionalization, Potential Applications and Challenges. En H. J. Chun, C. H. Park, I. K. Kwon, & G. Khang (Eds.), *Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine* (Vol. 1078, pp. 347-370). Springer Singapore.

MCDONALD, J. W., LIU, X.-Z., QU, Y., LIU, S., MICKEY, S. K., TURETSKY, D., GOTTLIEB, D. I., & CHOI, D. W. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine*, 5(12), 1410-1412.

MCKEON, R., SCHREIBER, R., RUDGE, J., & SILVER, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 11(11), 3398-3411.

NAIR, L. S., & LAURENCIN, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 762-798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>

Nguyen, H. T., Wei, C., Chow, J. K., Nguy, L., Nguyen, H. K., & Schmidt, C. E. (2013). Electric field stimulation through a substrate influences Schwann cell and extracellular matrix structure. *Journal of Neural Engineering*, 10(4), 046011.

OPENSTAX-CNX. (2016). Neurons and Glial Cells. Retrieved May 10, 2017, from <https://cnx.org/contents/c9j4p0aj@4/Neurons-and-Glial-Cells>

PARK, S. Y., PARK, J., SIM, S. H., SUNG, M. G., KIM, K. S., HONG, B. H., & HONG, S. (2011). Enhanced Differentiation of Human Neural Stem Cells into Neurons on Graphene. *Advanced Materials*, 23(36), H263-H267.

POWELL, S., VINOD, A., & LEMONS, M. L. (2014). Isolation and Culture of Dissociated Sensory Neurons From Chick Embryos. *Journal of Visualized Experiments*, 91.

PURVES, D. (Ed.). (2004). *Neuroscience* (3rd ed). Sinauer Associates, Publishers.

RAMON Y CAJAL, S. (1928). *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Clarendon Press.

ROSENZWEIG, E. S., COURTINE, G., JINDRICH, D. L., BROCK, J. H., FERGUSON, A. R., STRAND, S. C., NOUT, Y. S., ROY, R. R., MILLER, D. M., BEATTIE, M. S., HAVTON, L. A., BRESNAHAN, J. C., EDGERTON, V. R., & TUSZYNSKI, M. H. (2010). Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury. *Nature Neuroscience*, 13(12), 1505-1510.

SCHMIDT, C. E., & LEACH, J. B. (2003). Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5(1), 293-347.

SCHÜNKE, M. (2017). *Prometheus: Texto y atlas de anatomía*. Tomo 3, Cabeza, cuello y neuroanatomía. Madrid etc. : Editorial Médica Panamericana, 2017.

STOLL, G., JANDER, S., & MYERS, R. R. (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 7(1), 13-27.

SUN, Y., XU, C.-C., LI, J., GUAN, X.-Y., GAO, L., MA, L.-X., LI, R.-X., PENG, Y.-W., & ZHU, G.-P. (2013). Transplantation of Oligodendrocyte Precursor Cells Improves Locomotion Deficits in Rats with Spinal Cord Irradiation Injury. *PLoS ONE*, 8(2), e57534.

TELLO, F., (1911). La influencia del neurotropismo en la regeneración de los centros nerviosos. *Trab. Lab Invest. Biol. Univ. Madrid*, pp. 123–159.

VIJAYAVENKATARAMAN, S. (2020). Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomaterialia*, 106, 54-69.

VISMARA, I., PAPA, S., ROSSI, F., FORLONI, G., & VEGLIANESE, P. (2017). Current Options for Cell Therapy in Spinal Cord Injury. *Trends in Molecular Medicine*, 23(9), 831-849.

WEIDNER, N., NER, A., SALIMI, N., & TUSZYNSKI, M. H. (2001). Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. 98(6), 3513-3518.

WILLIAMS, R. L., & DOHERTY, P. J. (1994). A preliminary assessment of poly(pyrrole) in nerve guide studies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(6-7), 429-433.

XU, Y., HUANG, Z., PU, X., YIN, G., & ZHANG, J. (2019). Fabrication of Chitosan/Polypyrrole-coated poly(L-lactic acid)/Polycaprolactone aligned fibre films for enhancement of neural cell compatibility and neurite growth. *Cell Proliferation*, 52(3), e12588.

YAMADA, M., TANEMURA, K., OKADA, S., IWANAMI, A., NAKAMURA, M., MIZUNO, H., OZAWA, M., OHYAMA-GOTO, R., KITAMURA, N., KAWANO, M., TAN-TAKEUCHI, K., OHTSUKA, C., MIYAWAKI, A., TAKASHIMA, A., OGAWA, M., TOYAMA, Y., OKANO, H., & KONDO, T. (2006). Electrical Stimulation Modulates Fate Determination of Differentiating Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 25(3), 562-570.

YANG, F., MURUGAN, R., WANG, S., & RAMAKRISHNA, S. (2005). Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26(15), 2603-2610.

YU, Q., XU, S., ZHANG, K., & SHAN, Y. (2013). Multi-porous electroactive poly(L-lactic acid)/polypyrrole composite micro/nano fibrous scaffolds promote neurite outgrowth in PC12 cells****☆. *Neural Regeneration Research*, 8.

ZILBERMAN, M., NELSON, K. D., & EBERHART, R. C. (2005). Mechanical properties and in vitro degradation of bioresorbable fibers and expandable fiber-based stents. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74B(2), 792-799.