

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***Nuevos entornos artificiales para la diferenciación neural***

**TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

ALUMNA: Carmen Andreu Oller

TUTOR: Manuel Monleón Pradas

***Curso Académico: 2013-2014***

VALENCIA, Junio 2014



# RESUMEN

## Nuevos entornos artificiales para la diferenciación neural

Las patologías del sistema nervioso central y periférico tienen una gran incidencia sobre la población (consecuencias del ictus, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, trauma, tumores) y aguardan nuevos conceptos para su tratamiento. Las terapias celulares desarrollan la hipótesis general del efecto beneficioso que el aporte de factores y células pluripotentes pueden tener cara a lograr la regeneración de las estructuras dañadas o degeneradas. Para localizar y dirigir este aporte celular y de factores es necesario desarrollar materiales microestructurados que les sirvan de vector. El objetivo de este trabajo consiste en fabricar y diseñar dos entornos artificiales que induzcan la diferenciación neural mediante técnicas de ingeniería tisular. Las células precursoras neurales se encuentran encapsuladas en alginato, un hidrogel. En este primer entorno, se evalúa el efecto que ejerce la presencia o ausencia del factor BDNF (brain-derived neurotrophic factor), así como el efecto del “cross-talk” entre las células de Schwann y los precursores neurales en la diferenciación a linaje neuronal. También se crea un entorno de cocultivo 3D-2D, con las células precursoras neurales en el interior de un “scaffold” de PEA y células de Schwann cultivadas sobre la superficie de un “film” de PEA, donde también se estudia el posible efecto de los factores que secretan las células de Schwann sobre los precursores neurales en el proceso de diferenciación neural. En ambos entornos artificiales se observa que la presencia de células de Schwann induce la diferenciación neural de los precursores neurales.

**Palabras clave:** regeneración, ingeniería tisular, diferenciación neural, entornos artificiales, alginato, células encapsuladas, BDNF, “cross-talk”, células de Schwann, “scaffold” de PEA, cocultivo 3D-2D.

**Autor del TFG:** Alumna Dña. Carmen Andreu Oller

Valencia, Junio 2014

**Tutor académico:** Prof. D. Manuel Monleón Pradas



# ABSTRACT

## New artificial environments for neural differentiation

The pathologies of the central and peripheral nervous system have a great impact on the population (consequences of stroke, neurodegenerative diseases such as Parkinson's, trauma, tumors) that await new concepts for treatment. Cell therapies develop the general hypothesis about the beneficial effect of input factors and pluripotent cells to achieve the regeneration of damaged or degenerated structures. To target and direct this cell and factor supply is necessary to develop microstructured materials. The objective of this work is to design and manufacture two artificial environments that induce neural differentiation by tissue engineering techniques. Neural precursor cells were encapsulated in alginate, a hydrogel. In the first setting, the effect that the presence or absence of the factor BDNF (brain-derived neurotrophic factor), and the effect of cross-talk between Schwann cells and neural precursors in the neural lineage differentiation were evaluated. Environment co-culture 3D-2D is also created, with the neural precursor cells within a scaffold of PEA and Schwann cells cultured on the surface of a film of PEA, which also the effect of secreted Schwann cells factors on neural precursors in the process of neural differentiation were analysed. In both artificial environments is observed that the presence of Schwann cells induces neural differentiation of neural precursors.

**Key words:** regeneration, tissue engineering, neural differentiation, artificial environment, alginate, encapsulated cells, BDNF, cross-talk, Schwann cells, PEA scaffold, co-culture 3D-2D.

**TFG Author:** Student Miss. Carmen Andreu Oller

Valencia, June 2014

**Academic Tutor:** Prof. Mr. Manuel Monleón Pradas



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, este trabajo no habría sido posible de realizar sin Keila, que aunque por temas burocráticos de la universidad no puede aparecer como cotutora, lo es. Simplemente, gracias por todo, eres genial.

Agradecer también a Manolo Monleón el hecho de haberme permitido realizar este trabajo en el CBIT. He aprendido muchísimo y me llevo un buen recuerdo de la gente que he conocido allí.

A los “monómeros”, por estar ahí cada día soportándome, y en especial a mi estimado Alej.

A mis queridísimas biotecs, porque son lo mejor que me llevo de estos 4 años, y dentro de este grupo, a las pringuis de la CPI, porque la terraza con ellas... tenía otro color.

Y, por último, a mi familia, les debo todo lo que soy. Gracias a ellos soy quién soy, y he llegado hasta aquí, de momento.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Antecedentes históricos.....	1
1.2	Primeras estrategias de regeneración del SNC .....	2
1.3	Encapsulamiento de células en alginato .....	3
1.4	Estrategias actuales de regeneración neural: Uso de “scaffolds”, andamios tridimensionales.....	4
1.5	Cultivos bifásicos .....	5
1.6	Terapias celulares e ingeniería tisular.....	7
1.7	Hipótesis-Justificación.....	7
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3	MATERIALES .....	11
3.1	Cultivo celular: Precusores neurales.....	11
3.2	Cultivo celular: Células de Schwann.....	11
3.3	Alginato .....	11
3.4	PEA .....	11
4	MÉTODOS.....	12
4.1	Caracterización de los grupos de estudio .....	12
4.1.1	Viabilidad: LIVE/DEAD y MTS .....	12
4.1.2	Morfología y distribución celular: Falacidina-DAPI .....	13
4.1.3	Diferenciación: Western Blot .....	13
4.2	Microscopía.....	14
4.2.1	Óptica .....	14
4.2.2	De fluorescencia.....	14
4.2.3	Confocal.....	15
4.2.4	Electrónica de barrido .....	15
4.3	Entorno artificial 1: precusores neurales encapsulados en alginato cálcico. ....	15
4.3.1	Concentración de alginato .....	15
4.3.2	Concentración de CaCl <sub>2</sub> .....	16
4.3.3	Encapsulación de los precusores neurales .....	16
4.3.4	Liberación de células encapsuladas .....	17
4.4	Entorno artificial 2: cocultivo de precusores neurales en un “scaffold” 3D de PEA y células de Schwann cultivadas en films 2D de PEA.....	17
4.4.1	Elaboración del “scaffold” 3D de PEA. ....	17

4.4.2	Caracterización de la morfología.....	18
4.4.3	Procesado de los materiales. ....	18
4.4.4	Diseño y elaboración del dispositivo de cocultivo .....	19
4.4.5	Cultivo bifásico 3D-2D .....	20
5	RESULTADOS .....	21
5.1	Entorno artificial 1: precursores neurales encapsulados en alginato cálcio.....	21
5.1.1	Encapsulamiento de células .....	21
5.1.2	Evaluación de la viabilidad .....	22
5.1.3	Evaluación de la morfología y distribución celular.....	24
5.1.4	Evaluación de la diferenciación.....	24
5.1.5	Evaluación de la liberación celular .....	26
5.2	Entorno artificial 2: cocultivo de precursores neurales cultivados en un “scaffold” 3D de PEA y células de Schwann cultivadas en films 2D de PEA. ....	26
5.2.1	Viabilidad.....	26
5.2.2	Morfología y características de los “scaffolds” 3D de PEA.....	27
5.2.3	Evaluación de la morfología y distribución celular del cocultivo .....	27
5.2.4	Evaluación de la diferenciación en el cocultivo.....	28
6	DISCUSIÓN.....	29
6.1	Entorno artificial 1 (EA1): precursores neurales encapsulados en partículas de alginato.....	29
6.1.1	Viabilidad.....	29
6.1.2	Diferenciación .....	30
6.1.3	Migración .....	31
6.2	Entorno artificial 2 (EA2): cocultivo 3D-2D de precursores neurales atrapados en un “scaffold” de PEA con células de Schwann en un film de PEA. ....	31
6.2.1	Viabilidad.....	31
6.2.2	Diferenciación .....	31
6.3	Factores secretados por las células de Schwann: efectos sobre los 2 entornos artificiales.....	32
7	CONCLUSIONES .....	33
8	PERSPECTIVAS DE FUTURO .....	33
9	BIBLIOGRAFÍA.....	34
10	ANEXOS .....	39
10.1	Anexo 1.....	39
10.1.1	Cultivo de precursores neurales.....	39

10.2	Anexo 2.....	39
10.2.1	Cultivo de células de Schwann .....	39
10.3	Anexo 3.....	40
10.3.1	Medio control.....	40
10.3.2	Hormone mix.....	40
10.3.3	Medio completo de crecimiento.....	41
10.3.4	Medio de diferenciación .....	41
10.4	Anexo 4.....	42
10.4.1	Composición del medio de cultivo de células de Schwann, SCM .....	42
10.5	Anexo 5.....	42
10.5.1	Fundamento de la técnica MTS:.....	42
10.6	Anexo 6.....	42
10.6.1	NPER:.....	42
10.7	Anexo 7.....	43
10.7.1	BCA:.....	43
10.8	Anexo 8.....	43
10.8.1	Reconstrucción tridimensional del EA2 control, sin células de Schwann .....	43
10.8.2	Reconstrucción tridimensional del EA2 con el cocultivo de células de Schwann	43

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1:.....	3
Ilustración 2: .....	9
Ilustración 3.....	17
Ilustración 4: .....	20
Ilustración 5:.....	21
Ilustración 6:.....	21
Ilustración 7:.....	22
Ilustración 8:.....	23
Ilustración 9:.....	24
Ilustración 10:.....	24
Ilustración 11:.....	25
Ilustración 12.....	26
Ilustración 13:.....	26
Ilustración 14:.....	27
Ilustración 15:.....	28
Ilustración 16.....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:.....	23
Tabla 2:.....	25

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes históricos

Hasta hace pocos años se pensaba que los tejidos del sistema nervioso no podían regenerarse, de manera que todos los individuos nacían con una cantidad exacta de neuronas y a lo largo del tiempo se perdían poco a poco <sup>(1)</sup>.

Este concepto ha cambiado. Ahora se sabe que diversas poblaciones celulares en el sistema nervioso se pueden regenerar, ya que en el cerebro adulto existen células troncales, capaces de multiplicarse y diferenciarse. Este descubrimiento resulta de vital importancia en la búsqueda de tratamientos contra enfermedades mentales (Alzheimer, Parkinson y otras lesiones cerebrales) <sup>(2-4)</sup>.

Entre la diversidad de linajes celulares presentes en el sistema nervioso central, las neuronas son las células fundamentales. Éstas reciben y emiten señales, esenciales para que se ejecute la función orgánica adecuada, y se comunican entre sí a través de impulsos nerviosos que se transmiten neurona a neurona a través de los axones, y los captan las dendritas de las otras neuronas.

La sinapsis es el nombre que recibe esta serie de conexiones inter-neuronales. Diversas enfermedades o accidentes pueden dañar o deteriorar estas interacciones sinápticas, y las células neuronales adultas no son capaces de generar los axones de nuevo.

Actualmente, a través de la ingeniería de tejidos y gracias al conocimiento de los factores involucrados en la diferenciación neuronal y en el crecimiento axonal, se están diseñando biomateriales que mimetizan las condiciones *in vivo* que favorecen la diferenciación neuronal. Estos biomateriales se utilizan como “scaffold” o andamios.

El presente trabajo se centra en el diseño y desarrollo de sistemas para favorecer y evaluar el proceso de diferenciación de precursores neurales a linaje neural, ya que la regeneración de estas extensiones neuronales es necesaria para restablecer el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Consecuentemente, es necesaria la generación de sistemas que permitan estudiar los fenómenos ocurridos durante este proceso.

Por lo tanto, en este proyecto, partiendo de la base de la comprensión de los elementos que determinan la capacidad de diferenciación neural durante el desarrollo embrionario, se pretende desarrollar dos estrategias encaminadas a mimetizar el ambiente adecuado para

promover la neurodiferenciación, que involucran el uso de factores de crecimiento, cocultivos celulares y andamios, así como el encapsulamiento de precursores neurales en un hidrogel, que podrá ser usado como vehículo para transportar y preservar células hasta la zona lesionada, las cuales podrían liberar en el tejido dañado factores de crecimiento y/o matriz extracelular que favorezcan el proceso de regeneración y posteriormente las células también podrían ser liberadas.

## **1.2 Primeras estrategias de regeneración del SNC**

Tras una lesión en el sistema nervioso, la recuperación funcional del tejido conlleva la reparación de los circuitos neuronales, lo cual se consigue mediante la regeneración axonal y el restablecimiento de las conexiones específicas. Pero la capacidad de regeneración del sistema nervioso es limitada. Parece ser que la presencia de células de Schwann alineadas longitudinalmente y que forman las estructuras conocidas como bandas de Büngner, facilitan y promueven el crecimiento axonal en el SNP. Las células progenitoras neuronales (CPN) del Sistema Nervioso Central (SNC), persisten a lo largo de toda la vida, y una vez que se diferencian se integran a las redes neuronales existentes. Esta capacidad del cerebro adulto ha despertado un gran interés por las potenciales aplicaciones terapéuticas en diversos trastornos neurológicos. Estas células, las CPN, mantienen la capacidad de autorrenovación, de manera que la manipulación endógena de éstas o el trasplante de células diferenciadas derivadas de CPN adultas, se puede utilizar para reemplazar las neuronas que se degradan en enfermedades como el Parkinson, Alzheimer, Huntington y esclerosis múltiple <sup>(5, 6)</sup>.

Uno de los primeros proyectos que se proponían para llevar a cabo este reemplazamiento neural consistía en incrementar la proliferación en las zonas neurogénicas del cerebro adulto, inducir la migración de las CPN y, una vez éstas se encuentran en el área dañada, inducir su diferenciación en tipos celulares específicos. De esta forma se pretendía promover la recuperación funcional del SNC.

Hasta ahora, la capacidad de integración celular, la comunicación célula-célula y las propiedades de la matriz extracelular, han dificultado que las nuevas neuronas generadas por el cerebro adulto se integren sinápticamente en las redes neuronales preexistentes. Además, en las zonas de daño cerebral, el propio sistema mata a los precursores neurales que acuden al sitio de la lesión. Por lo tanto es necesario el desarrollo de sistemas que protejan a las células trasplantadas del entorno adverso presente en una lesión.

Según esto, para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la regeneración neural, es necesario terminar de comprender los microambientes en los que crecen estos tipos

celulares, así como su regulación sistémica. La integración de todos estos conocimientos permitirá nuevas estrategias para la regeneración del SNC <sup>(7)</sup>.

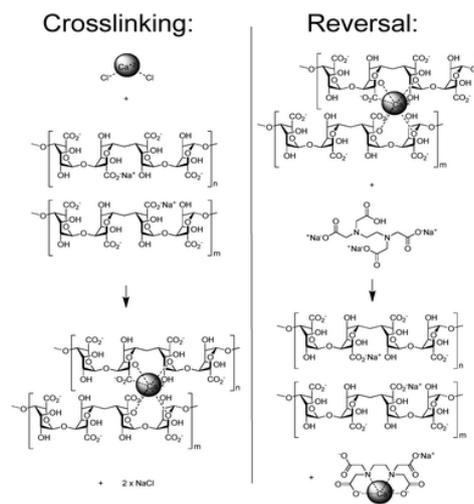
### 1.3 Encapsulamiento de células en alginato

La ingeniería tisular es una herramienta muy prometedora en el ámbito de la investigación científica, y podría resultar muy útil en los proyectos relacionados con el sistema nervioso central de mamífero. Hasta hoy, el trasplante neural es inviable, y la ingeniería tisular propone el uso de hidrogeles tridimensionales biodegradables como una alternativa eficaz para la regeneración de distintos tipos de tejidos.

Existen estudios en los que se reporta que el encapsulamiento de precursores neurales de ratón en hidrogeles tridimensionales, con la intención de madurar estas células en el interior de este constructo, presenta resultados positivos, en los cuales se consigue la diferenciación neural de forma eficaz <sup>(8)</sup>.

En 1990 se consiguió inmovilizar células animales en perlas de alginato, encapsuladas en este material, obteniéndose resultados positivos, ya que trascurridos 12 días desde la inoculación del hidrogel a los animales, las células implantadas en el interior del alginato continuaban vivas <sup>(9)</sup>.

El alginato es un polisacárido aniónico, que se encuentra de forma natural en las paredes celulares de las algas marinas pardas. En presencia de iones de calcio, el alginato posee la capacidad de gelificar, propiedad que se aprovecha en este estudio para llevar a cabo la encapsulación de las células. De esta forma, el alginato cálcico ejerce la función de fijador sobre las células de interés.



**Ilustración 1:** Estructura química del alginato

La idea de obtener un hidrogel tridimensional biodegradable de alginato cálcico mediante la técnica del encapsulamiento, parece ser factible para el fin de este proyecto. Se podría conseguir un método de inmovilización y transporte celular, al mismo tiempo que se podría inducir la diferenciación neural de los precursores neurales en el interior del hidrogel, pudiendo incluso conseguir una liberación gradual de las células en el lugar específico de la región neural dañada favoreciendo el proceso de regeneración.

De forma análoga, se pretende estudiar el efecto que ejerce el alginato en el proceso de diferenciación neural. Es probable que las propiedades del alginato, ya que se trata de un material denso, provoquen una respuesta biomecánica distinta sobre las células encapsuladas. Al encapsular las células en alginato, se está limitando el espacio de las células para desplazarse, pudiendo, de esta forma, verse afectada la diferenciación neural.

#### **1.4 Estrategias actuales de regeneración neural: Uso de “scaffolds”, andamios tridimensionales**

La capacidad de regeneración de axones en el SNC es un hecho. Pero este proceso variará en función de la gravedad de la lesión y de la edad del paciente, en mamíferos jóvenes es común observar este proceso, al contrario que en adultos <sup>(10-13)</sup>.

Además, para conseguir la regeneración neural en adultos, hay que superar por separado los factores, cuya combinación, parece que es la principal razón que dificulta la regeneración del tejido neural en el SNC: la presencia de factores inhibitorios, la muerte de neuronas dañadas, la falta de moléculas neurotróficas para la supervivencia celular, y la revascularización del sitio de la lesión, problema principal en la regeneración tisular <sup>(14-16)</sup>.

La ingeniería tisular propone el uso de “scaffolds” o andamios tridimensionales como herramienta para conseguir la regeneración de tejidos. Además, estos “scaffolds” sirven de soporte celular, permiten el crecimiento celular y el mantenimiento de las funciones celulares. Para que el “scaffold” sea funcional, la porosidad va a jugar un papel muy importante en su elaboración, ya que, este parámetro va a ser crucial para conseguir una buena distribución y acomodamiento celular, además de garantizar la difusión de nutrientes y oxígeno que permitan una correcta vascularización de las células implantadas en este andamio <sup>(17, 18)</sup>.

El uso de andamios tridimensionales parece ser una herramienta prometedora en el campo de la ingeniería de tejidos, además, podría ser un dispositivo útil para guiar el crecimiento axonal.

El poli (etil acrilato), PEA, se trata de un polímero cuyas características hace de éste un material excelente para llevar a cabo ensayos biológicos. El PEA se encuentra en la forma

reticulada a temperatura ambiental y a temperatura corporal, ya que su temperatura de transición vítrea es de  $-10^{\circ}\text{C}$ . Además, este polímero presenta unas propiedades mecánicas con valores bastante similares a las de los revestimientos biológicos blandos. Este material se obtiene mediante la reacción polimerización de los radicales del monómero de etil acrilato, y se puede entrecruzar con EGDMA (etilenglicol dimetacrilato). Las propiedades físicas que caracterizan al PEA son la flexibilidad de la cadena principal, la naturaleza polar y la longitud de las cadenas laterales <sup>(19)</sup>. En cuanto a las características relacionadas con su comportamiento en entornos biológicos, se trata de un polímero altamente compatible con distintos tipos de células *in vitro*, siendo unas de ellas las células neuronales <sup>(20-23)</sup>. Esta alta compatibilidad biológica parece que es debida a que el PEA favorece la fibrillogénesis de laminina y fibronectina en sus superficies <sup>(24-26)</sup>, lo cual permite una correcta deposición de la matriz extracelular, la cual es reconocida por las células y se adhieren a esta con facilidad. Las características de la estructura molecular del PEA, movilidad de la cadena lateral, la polaridad y su baja hidrofiliidad, permiten que tenga lugar una interacción directa entre el polímero y las proteínas de la matriz extracelular. Por otra parte, es posible llevar a cabo la preparación de materiales ultraporosos, que permiten la invasión celular y que se utilizan como guías para el crecimiento celular, son los “scaffolds” <sup>(21-22, 27-36)</sup>. Además mediante distintas variantes de la técnica de porógeno-lixiviación se consiguen distintas estructuras porosas <sup>(27-29, 31, 33-36)</sup>. La porosidad del “scaffold” variará en función de las características del tejido que se pretende regenerar. Además, el tamaño de los poros y la geometría, no modifican las propiedades de este tipo de “scaffolds” de PEA. El diámetro de los poros tampoco interfiere en las propiedades mecánicas del material, siempre que no se llegue a colapsar el poro durante la compresión <sup>(29)</sup>.

Según esto, en el presente proyecto, se decide utilizar un “scaffold” sintético de PEA (poli-etil-acrilato), con poros pequeños cuyos tamaños oscilen entre 70 y 50 micras, de manera que el andamio actúe como una “trampa” para los precursores neurales, quedando los cuerpos neuronales anclados en el interior de los poros y consiguiendo un crecimiento axonal direccionalizado.

### 1.5 Cultivos bifásicos

En condiciones *in vivo*, las células se encuentran envueltas dentro de la matriz extracelular y rodeadas de otros tipos celulares. Por lo tanto, si queremos reproducir en condiciones *in vitro* la regeneración neural, los resultados obtenidos no serían significativos si se cultivan solo los precursores neurales en el “scaffold”, aunque éstas proliferen y se diferencien, las conclusiones no se podrían extrapolar a las condiciones *in vivo*, ya que el dispositivo no sería representativo de las condiciones reales.

El término de precursores neurales se usa para identificar un sistema de cultivo en el que se encuentran “clusters” flotantes de células madre neurales. Estos precursores neurales suponen un método eficaz para la realización de estudios de precursores neurales en condiciones *in vitro*. Los precursores neurales no son exactamente idénticas a las células madre, ya que dentro de los “clusters” de precursores neurales solo un pequeño porcentaje con células madre neuronales<sup>(37)</sup>.

Por otra parte, las células de Schwann son células gliales periféricas que se forman en la cresta neural embrionaria y acompañan a las neuronas durante su crecimiento y desarrollo. Además, se encargan de recubrir los axones de las neuronas, formando las vainas de mielina, que son aislantes. Entre las funciones de las células de Schwann, encontramos que éstas ayudan a guiar el crecimiento axonal y la regeneración de las lesiones en los axones periféricos, por lo tanto, influyen positivamente en el proceso de diferenciación neural.

Un cocultivo de precursores neurales junto con células de Schwann, tipo celular relacionado con éstas, sería un buen modelo, el experimento se asemejaría más a las condiciones *in vivo* de la regeneración neural. Las células de Schwann, tienen un efecto positivo sobre los precursores neurales, además, son capaces de sintetizar una matriz extracelular para acomodar correctamente a los precursores neurales.

Los astrocitos, también tienen un efecto positivo en la estimulación del crecimiento axonal, además de secretar matriz extracelular, pero, este fenómeno no se observa en etapas adultas, solo en estadios tempranos de crecimiento. Al contrario que este tipo celular, las células de Schwann ejercen efectos positivos tanto en estadios tempranos como en adultos<sup>(38-41)</sup>.

Por otra parte, mediante un sistema de cocultivo se podrían estudiar los fenómenos de “cross-talk” entre los dos linajes celulares distintos. El mecanismo de “cross-talk” es muy importante en el proceso de desarrollo y regeneración del sistema nervioso. Mediante el “cross-talk” no solo se ve favorecida la transmisión sináptica, sino que además, presenta una gran importancia en el proceso de crecimiento y diferenciación neural. Las células de Schwann producen factores como BDNF o neurotrofina-3, que resultan esenciales en el mantenimiento de la viabilidad de las neuronas y en el proceso de diferenciación neural<sup>(42)</sup>.

Resulta pues interesante realizar un cocultivo de precursores neurales con células de Schwann, esperando, *a priori*, resultados beneficiosos en el proceso de diferenciación neural.

### 1.6 Terapias celulares e ingeniería tisular

Las enfermedades neurológicas como el Parkinson, la Isquemia cerebral o la Corea de Huntington, tienen en común la pérdida de neuronas en el cerebro. 24 millones de personas en el mundo padecen demencia, y el 60% de estas personas desarrollaran Alzheimer. El Parkinson, junto con el Alzheimer, son dos de las enfermedades neurodegenerativas con más incidencia de este siglo <sup>(43-48)</sup>.

El tratamiento convencional para el Parkinson consiste en la administración oral de agonistas de dopamina, pero a medida que la enfermedad progresa, este tratamiento produce efectos secundarios graves. También se ha intentado introducir directamente el fármaco en la zona cerebral, pero los resultados continúan siendo poco eficientes <sup>(49-53)</sup>. Una terapia alternativa sería la implantación de células precursoras neurales en el sitio de la lesión, pero se ha observado que las células trasplantadas migran a otras regiones del CNS, y no permanecen en el sitio donde se ha producido el daño <sup>(54)</sup>.

La ingeniería tisular ha supuesto una revolución en el campo de los cultivos celulares. La combinación de la ciencia de los materiales, las ciencias de la vida y la bioingeniería, resulta prometedora para la investigación biomédica. La ingeniería de tejidos propone la creación de “dispositivos vivos”, que sean funcional, estructural y mecánicamente similares al tejido que se pretende reparar, de forma que se puedan implantar fácilmente y llevar a cabo la regeneración en el sitio de la lesión.

Uno de los principales retos de la ingeniería tisular en el campo de la regeneración neuronal, es conseguir de forma eficiente la maduración neuronal, o lo que es lo mismo, la diferenciación neural. Las células neuronales adultas viven muy poco tiempo en los cultivos. Por lo tanto, una buena estrategia sería inducir la diferenciación neuronal a partir de células precursoras neurales en el sitio específico de la lesión <sup>(55-58)</sup>.

Otro reto es la necesidad de una matriz extracelular *in vitro* para reproducir lo máximo posible las condiciones *in vivo*, que permita la adhesión y el crecimiento de las células neurales <sup>(59)</sup>. Según esto, un sistema de cocultivo con dos linajes celulares distintos, podría permitir la fabricación de forma natural de una matriz extracelular, la cual albergaría a las células neuronales de interés que se pretende diferenciar.

### 1.7 Hipótesis-Justificación

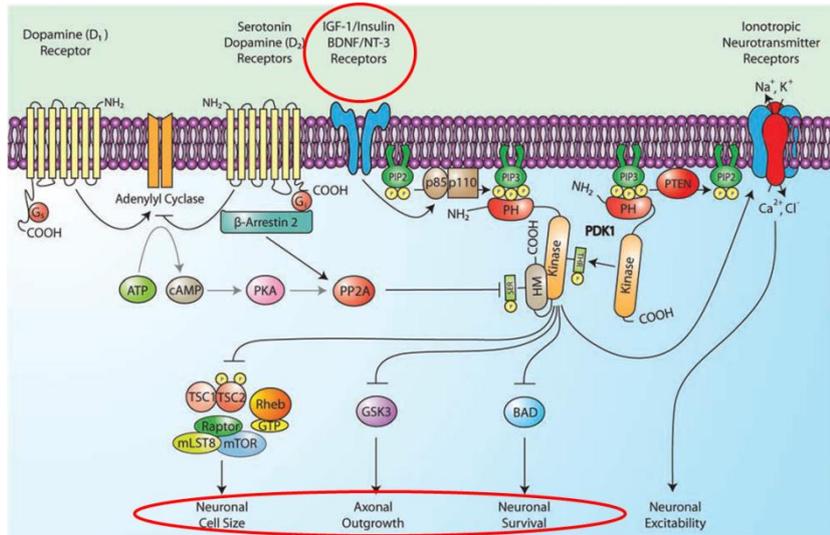
1. El encapsulamiento de células precursoras neurales en un hidrogel biocompatible de baja rigidez y alta permeabilidad favorece la neuroprotección (preservación de la viabilidad).

2. Los factores de crecimiento secretados por las células de Schwann tienen un efecto positivo en la diferenciación y viabilidad de células precursoras neurales cultivadas en un "scaffold" de PEA.
3. La presencia de BDNF (factor de diferenciación neural), favorece la diferenciación neural de células precursoras neurales contenidas en distintos entornos artificiales.

En este trabajo se presenta un sistema de encapsulamiento con alginato de células precursoras neurales, a las cuales se les adiciona BDNF, con el objetivo de obtener un sistema que permita llevar las células hasta el lugar específico de la lesión y que permita el mantenimiento de las células en el lugar en el que se implantan.

Se decide utilizar el factor BDNF (brain-derived neurotrophic factor) porque en numerosos artículos se reporta que se trata de un factor crucial en la regulación de la supervivencia neuronal y de la plasticidad sináptica en el cerebro de los mamíferos. Además, se ha demostrado que el BDNF influye positivamente en la diferenciación de los precursores neurales embrionarios <sup>(60)</sup>. También se han realizado diversos experimentos en los que se ha observado que, efectivamente, el BDNF aumenta el crecimiento axonal y la proliferación dendrítica con morfología compleja. La adición de BDNF influye tanto en la supervivencia de las células precursoras neurales, como en la diferenciación neural. Según esto, resulta interesante estudiar el efecto del BDNF en los estudios de trasplante celular bajo condiciones neuropatológicas, motivo por el cual se decide utilizar este factor en los experimentos llevados a cabo en este proyecto.

En la figura inferior se representan las distintas rutas de señalización en las que está involucrado el factor BDNF. Este factor, mediante la acción de la Kinasa Akt, activa rutas que favorecen el crecimiento axonal, la supervivencia e interviene en el tamaño de las neuronas <sup>(61)</sup>.



**Ilustración 2:** Rutas de señalización en las que está involucrado el factor BDNF, el cual, favorece el crecimiento axonal, la supervivencia e interviene en el tamaño de las neuronas. (TF Franke, Oncogene (2008))<sup>(61)</sup>

Las células neurales precursoras en el SNC (sistema nervioso central) son capaces de migrar a otras regiones cuando estas se implantan en un sitio concreto. Esto supone un problema, ya que lo que interesa es la regeneración neural en el sitio en el cual se realiza el trasplante de células. Por esta razón, se propone el encapsulamiento de las células como un mecanismo de transporte y de mantenimiento de las células en el sitio en el que se implantan. Se retrasa la migración de las células porque las esferas dentro de las cuales se encuentran encapsuladas presentan un tamaño lo suficientemente grande como para evitar la difusión de estas moléculas a otros tejidos o fluidos corporales.

Existen numerosos artículos en los que se reportan las ventajas que presenta la encapsulación de células en los experimentos de trasplantes y xenotrasplantes, siendo la más representativa la no necesidad de inmunosupresión. De esta forma, las células trasplantadas quedan protegidas ante el rechazo inmunológico. Además, el hecho de encapsular las células en alginato otorga la consistencia de un hidrogel, por lo tanto, el material obtenido presentará las características propias de los hidrogeles, que resultan ventajosas para la aplicación final de este sistema. Como el polímero que se ha usado es altamente permeable e hidrofílico, se va a permitir el flujo y/o liberación de moléculas al interior/exterior del material. Según esto, a medida que el hidrogel se vaya degradando, se irán liberando las células y los factores que se hayan introducido en su interior. Adicionalmente, se pretende observar el efecto que ejerce este sistema de encapsulamiento con alginato sobre la diferenciación de los precursores neurales <sup>(62)</sup>.

Una segunda fase del experimento se basa en la determinación del efecto que la matriz extracelular generada por células de Schwann ejerce sobre las células precursoras neurales de ratón. Se ha reportado que la presencia de células de Schwann en el interior de polímeros biodegradables favorece la capacidad regenerativa de los precursores neurales en modelos *in vivo*, ya que la presencia de las células de Schwann tiene un papel importante en la regeneración de los nervios <sup>(63)</sup>. En el SNP, las células de Schwann son el principal componente de la glía y se organizan en las bandas de Büngner, que al parecer son importantes en el proceso de regeneración neural.

En este segundo experimento se propone el uso de un sistema de cocultivo, o cultivo bifásico, en el cual los precursores neurales se cultivarían en un “scaffold” poroso de PEA (poli-etil-acrilato), y las células de Schwann se colocarían sobre films 2D de este mismo material.

Se decide utilizar el polímero sintético de PEA porque ya se han reportado estudios de reparación neuronal, tanto en el SNC como en el SNP, con el uso de este tipo de “scaffolds”, además de que es un material que ya está bien caracterizado que permite la supervivencia y la diferenciación de los precursores neurales <sup>(20, 64-65)</sup>.

## **2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

El objetivo de este trabajo es diseñar y generar entornos artificiales que favorezcan la diferenciación de precursores neurales a linaje neuronal.

El primer entorno artificial consistirá en encapsular células precursoras neurales un hidrogel mediante la técnica de encapsulación. Este hidrogel estará formado íntegramente de alginato cálcico. En este sistema se evaluará el efecto del BDNF en la diferenciación a linaje neuronal. También se determinará el efecto del cocultivo con células de Schwann a diferentes tiempos de cultivo.

Se obtendrá y caracterizará un andamio tridimensional sintético de PEA (poli-etil-acrilato), con poros de entre 70 y 50 micras, de manera que el andamio actúe como una “trampa” para las células precursoras neurales, quedando los cuerpos neuronales anclados en el interior de los poros y consiguiendo un crecimiento axonal direccionalizado.

Como segundo entorno, se pretende elaborar un dispositivo que permita llevar a cabo la elaboración de un cultivo bifásico (3D-2D), para observar el efecto de las células de Schwann

cultivadas en un film de PEA sobre los precursores neurales que se encuentran en el interior de un andamio.

### **3 MATERIALES**

#### **3.1 Cultivo celular: Precursores neurales**

Se expandieron los precursores neurales, donados por el Doctor Ulises Gómez Pinedo, Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid, que corresponden a precursores neurales obtenidos a partir de ratones transfectedados con la proteína roja fluorescente (RFP-NSCs, "RFP-expressing Neural Stem Cells). El cultivo criopreservado ( $1 \times 10^6$  células/mL), en pase 1 (P1), fue expandido hasta pase 3 (P3) para obtener la densidad celular necesaria para llevar a cabo los experimentos (Anexo 1). (Los medios de cultivo utilizados en este cultivo y sus composiciones se encuentran en el Anexo 3).

#### **3.2 Cultivo celular: Células de Schwann**

Las células de Schwann utilizadas en este trabajo corresponden a la línea celular "Rat Schwann Cells de ScienCell USA" y se utilizó el medio de cultivo "Schwann Cell Medium" (SCM) de ScienCell USA (Anexo 4). Estas células fueron expandidas hasta el pase 5 (P5) para obtener el número de células necesario para el experimento (Anexo 2). Provenían de un cultivo criopreservado, pase 3 de inicio. Posteriormente, tanto los precursores neurales como las células de Schwann fueron expandidas hasta la fase de confluencia.

#### **3.3 Alginato**

Para el encapsulamiento de células se utilizó alginato, el cual es una sal sódica del ácido algínico de algas pardas. Además, es adecuado para la inmovilización de células. Es un coloide hidrófilo y poliurónico compuesto por residuos de ácido glucurónico y manurónico (SIGMA-ALDRICH)

#### **3.4 PEA**

Para obtener los materiales 3D se utilizó como monómero el Etil Acrilato  $\geq 99.5\%$  (SIGMA-ALDRICH), el cual fue posteriormente entrecruzado.

## 4 MÉTODOS

Todos los experimentos van a realizarse sobre 2 entornos artificiales distintos. El primer entorno se abreviará con las siglas EA1, que se corresponderá con los precursores neurales encapsulados en partículas de alginato. El segundo entorno se abreviará con las siglas EA2, y se corresponderá con el cocultivo 3D-2D de precursores neurales atrapados en un “scaffold” de PEA con células de Schwann en un film de PEA.

En todos los experimentos que se realizaron con el EA1 se dispuso de 3 grupos de estudio. Al primer grupo se le adicionó el factor de neurodiferenciación, BDNF (B+), al segundo grupo no se le añadió factor BDNF (B-), y, por último, el tercer grupo se encontraba en cocultivo con células de Schwann y no se le adicionó el factor BDNF (S).

En los experimentos llevados a cabo con el EA2 se dispuso de 2 grupos de estudio: un grupo control que solo contenía el andamio de PEA con los precursores neurales, y el grupo de cocultivo que comprendía a las células de Schwann sobre un film 2D de PEA y a las neuroesferas en el interior del “scaffold” de PEA.

### 4.1 **Caracterización de los grupos de estudio**

#### 4.1.1 **Viabilidad: LIVE/DEAD y MTS**

La prueba de LIVE/DEAD se basa en el principio de permeabilidad de la membrana plasmática. Se incuban las células con calceína y con homodímero 1 de etidio. Las células vivas retienen la calceína, de forma que emitirán fluorescencia verde, ya que las membranas intactas de las células vivas excluyen al EthD-1. Al contrario que éstas, las células muertas tendrán las membranas dañadas, permitiendo la entrada del EthD-1, y emitiendo luminiscencia roja. A partir de una solución de 10mL que contenía calceína 2 $\mu$ M y EthD-1 4 $\mu$ M, se realizó el test de viabilidad, añadiendo 1 $\mu$ L de calceína y 5 $\mu$ L de EthD-1 en 2mL de medio neurobasal, realizándose a continuación una incubación a 37°C durante 40 minutos. Los resultados se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. Se evaluó la viabilidad para cada grupo y tiempo de cultivo por triplicado, para lo cual se obtuvieron imágenes en el microscopio confocal, y se cuantificó el porcentaje de células vivas y muertas mediante el software “ImageJ”.

También se realizó un ensayo de viabilidad mediante MTS. (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega). Se evaluó cada grupo con 9 repeticiones por grupo y tiempo de cultivo. (Explicación del principio de esta técnica en el Anexo 5). Los resultados obtenidos se evaluaron mediante el equipo lector de placas "VICTOR<sup>3</sup>, 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer precisely".

#### **4.1.2 Morfología y distribución celular: Falacidina-DAPI**

Se llevó a cabo un marcaje de citosqueleto y núcleo mediante falacidina y DAPI. Estas moléculas permiten observar en el microscopio de fluorescencia los núcleos y el citoesqueleto de actina de las células. El DAPI es un marcador fluorescente que emite a una longitud de onda de 461nm (azul) y que se une fuertemente a los núcleos de las células, zonas ricas en adenina y timina.

Por otra parte, la falacidina se trata de una toxina que se une a la actina F del citoesqueleto, impidiendo su despolimerización y provocado el envenenamiento celular. Este marcador, se une específicamente en la interfase entre las subunidades de F-actina, observándose al microscopio la distribución del citoesqueleto, teñido de color verde, si la falacidina está acoplada a un fluoróforo verde, como en el caso de la que se usó en este trabajo, se encuentra conjugada con fluoresceína, que emite a una longitud de onda de 521nm (verde).

Para llevar a cabo esta tinción, las muestras fueron permeabilizadas con Tritón X100 al 0.1% en 0.1MPBS++ a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se incubaron las muestras con falacidina a una concentración de 1:200 en 0.1MPBS++, durante 2 horas. Se lavó 2 veces con 0.1MPBS++. A continuación se incubó con DAPI, estando a una concentración de 1µg/mL, durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó todo una vez con 0.1MPBS++. Los resultados se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. Las muestras fueron colocadas en portaobjetos horadados con fondo de cubreobjetos en 0.1MPBS++ para su observación al microscopio de fluorescencia.

Las muestras del entorno artificial 1, precursores neurales encapsulados en alginato, solo se marcaron con DAPI.

#### **4.1.3 Diferenciación: Western Blot**

Para llevar a cabo un análisis de la diferenciación en los diferentes grupos de estudio se realizó un ensayo de Western Blot. Se realizó una extracción de proteínas mediante el buffer N-PER (Pierce) (Anexo 6), y a continuación cuantificación por BCA (Anexo 7).

Las proteínas extraídas fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% de 0.75mm en un sistema Miniprotein-IV. Se cargaron 50µg de proteínas por grupo y por triplicado. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF en un sistema de transferencia semi-húmedo (BIO-RAD) a 20 Voltios durante 45 minutos. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con una solución de “Skin-Milk” al 5% en 0.1M PBS/0.1%Tween durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 3 veces en agitación durante 5 minutos con 0.1M PBS/0.1%Tween. Luego estas membranas fueron incubadas con el anticuerpo correspondiente: anti-βIII-Tubulina (monoclonal, ABCAM) a una dilución de 1:1000; anti-GFAP (policlonal, ABCAM) a una dilución de 1:1000. Estos anticuerpos se incubaron durante toda la noche a 4°C, después se lavaron tres veces con 0.1M PBS/0.1%Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario peroxidado correspondiente a una dilución 1:25000. Para finalizar, las membranas fueron reveladas con el Kit “ECL Plus Western Blotting Detection Reagents” (altamente sensible para Western Blot y quimioluminiscencia) con un tiempo de exposición de 20 segundos. Los equipos utilizados para llevar a cabo el Western Blot eran todos de la casa comercial “BIO-RAD” y se utilizó el equipo “Kodak X-OMAT 2000 Processor” para el revelado.

## **4.2 Microscopía**

### **4.2.1 Óptica**

Para determinar la morfología de las partículas de alginato o bien la distribución celular, se obtuvieron fotografías (20X) en diferentes planos con el microscopio óptico “Nikon Eclipse E600”, con el software “LINKSYS”. Las partículas de alginato se evaluaron a 3 tiempos distintos: día 1, día 7 y día 14 y se realizó un promedio de todas las medidas tomadas en las distintas fotografías, con un promedio de 3 partículas de alginato por fotografía.

La liberación de células por parte de las partículas de alginato también se evaluó mediante microscopía óptica. Con el microscopio óptico invertido “Nikon Eclipse TS100” se observaron cada uno de los distintos grupos de estudio a día 7, y se determinó la liberación o no según se observaba o no presencia de células en los cubreobjetos recubiertos de laminina.

### **4.2.2 De fluorescencia**

Para determinar la morfología celular, mediante tinciones con fluoróforos o bien moléculas acopladas a fluoróforos con afinidad por núcleo o citoesqueleto, se obtuvieron imágenes a diferentes aumentos con el microscopio de fluorescencia “Nikon Eclipse 80”i,

mediante el software “NIS-Elements AR 4.00.06”. Se adquirieron imágenes en diferentes campos a 20X y se procesaron con el software “ImageJ”.

Esta metodología se empleó en el primer entorno artificial (EA1) para evaluar la viabilidad mediante la técnica LIVE/DEAD. También se empleó, tanto como en el entorno artificial 1 como en el 2, para observar los resultados del marcaje con falacidina-DAPI.

#### **4.2.3 Confocal**

Para determinar la distribución tridimensional de las células en los entornos artificiales, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal, en el presente estudio se utilizaron el microscopio confocal “Olympus FV1000” y el microscopio confocal “Zeiss LSM 780”. Se adquirieron imágenes en diferentes campos y se procesaron con el software “IMARIS” e “ImageJ”.

#### **4.2.4 Electrónica de barrido**

Para caracterizar la morfología de la estructura del andamio de PEA, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de barrido mediante el microscopio Jeol JSM6300. Se tomaron imágenes de los andamios sin cortar y de los andamios criocortados a 50µm de espesor a diferentes aumentos.

### **4.3 Entorno artificial 1: precursores neurales encapsulados en alginato cálcico.**

Como paso previo para realizar el cocultivo de los precursores neurales encapsulados en alginato, las células de Schwann fueron cultivadas en placas de cultivo de 48 pocillos (P48) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL y se incubaron durante 3 días.

#### **4.3.1 Concentración de alginato**

Se realizaron distintos ensayos piloto a distintas concentraciones, para observar si la concentración de alginato ejercía algún efecto en el comportamiento de los precursores neurales. Se hicieron pruebas con concentraciones de alginato a 0.2%, 0.25%, 0.3% y 0.5%. Los resultados obtenidos fueron que a una concentración de 0.5%, a la cual el entrecruzamiento de la red de alginato genera una rigidez con consecuencias negativas en la viabilidad y no favoreció la liberación celular. Por otra parte, las concentraciones a 0.2% y 0.25% eran muy poco consistentes, y las partículas de alginato se degradaban con facilidad. Por lo tanto, se decidió utilizar una concentración de alginato al 0.3%, que si permitía el flujo de factores y células y era consistente.

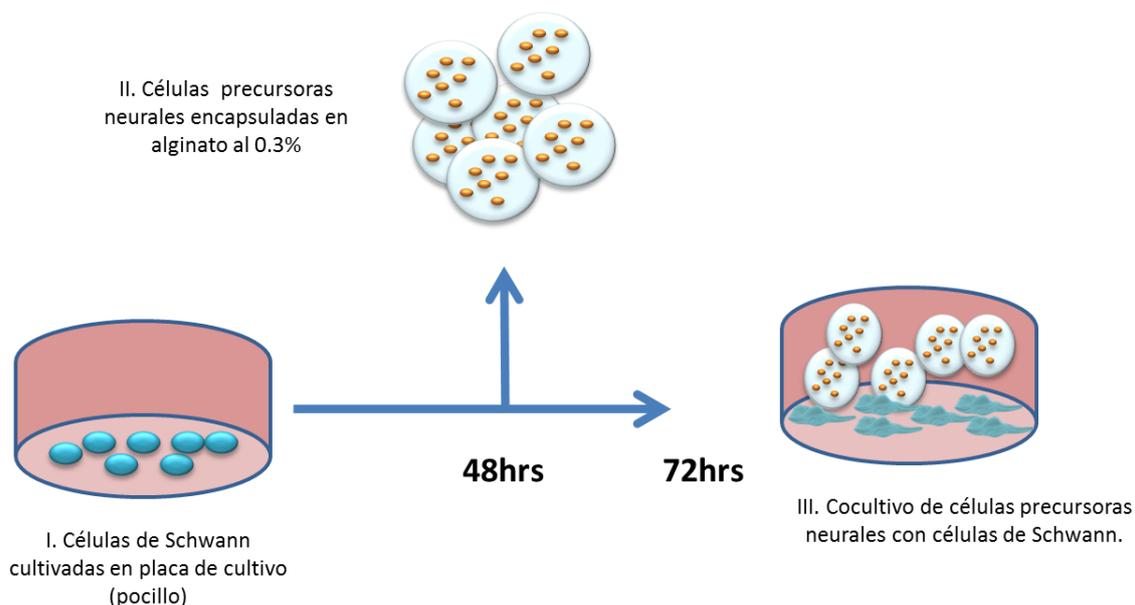
#### **4.3.2 Concentración de $\text{CaCl}_2$**

En cuanto a la concentración de  $\text{CaCl}_2$  que se debía utilizar, era una decisión crítica, ya que una cantidad de calcio excesiva, produce la muerte celular. Debía de ser una cantidad baja para que no fuera tóxico, pero lo suficientemente elevada para permitir que las esferas adquirieran la consistencia deseada. Se realizaron ensayos con las 3 concentraciones de alginato que se probaron, cada uno con una concentración de  $\text{CaCl}_2$  a 0.1M y a 0.05M. El mejor resultado fue la combinación de concentración de alginato al 0.3% y  $\text{CaCl}_2$  0.1M, y estas fueron las condiciones que se emplearon en el experimento.

#### **4.3.3 Encapsulación de los precursores neurales**

Para llevar a cabo el proceso de encapsulación se usó el equipo de encapsulación electroestática "Encapsulador NISCO-VAR V1". El encapsulador es uno de los equipos más adecuados para la generación de micropartículas utilizando matrices, donde la gelificación está basada en la coacervación interfacial. Este equipo es capaz de encapsular desde proteínas hasta bacterias, entre otros, produciendo micropartículas de tamaño controlado que varían entre 150 y 1000 $\mu\text{m}$ . Las micropartículas se forman mediante el principio de fuerzas electroestáticas donde el equipo tiene una sola aguja estática que está conectada eléctricamente a tierra, y un electrodo que es sumergido en la solución de endurecimiento, de manera que se genera un campo electrostático entre la punta de la aguja y dicha solución. Una bomba de jeringa produce un flujo constante a través de la aguja y caen en la solución de endurecimiento. La aguja, el brazo, el electrodo, el conector para la aguja y el tubo se esterilizaron en el autoclave, ya que se pretendía producir materiales estériles.

Los parámetros que se utilizaron fueron los siguientes: 4 Voltios de Tensión, una aguja de 200 $\mu\text{m}$  de diámetro, un flujo de 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ , una distancia de 6cm entre la aguja y la superficie de la solución de endurecimiento, que se trataba de Cloruro de Calcio 0.1M. Todo esto se realizó con una agitación suave para que las micropartículas no formaran agregados al caer sobre la solución de  $\text{CaCl}_2$  0.1M, y utilizándose alginato con una concentración del 0.3%. En presencia de calcio el alginato forma una estructura característica que otorga más rigidez al gel. Todo esto en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar.



**Ilustración 3:** EA1. Los precursores neurales están encapsulados en el interior de las partículas de alginato. No hay contacto directo entre las células de Schwann y los precursores neurales.

#### 4.3.4 Liberación de células encapsuladas

Se realizó también un ensayo adicional para evaluar la liberación de las células encapsuladas. Se recubrieron las superficies de unos cubreobjetos con 20 $\mu$ g/mL de laminina, y se depositaron sobre su superficie los precursores neurales encapsulados en alginato. el tiempo de evaluación fueron 7 días. Se evaluó mediante microscopía óptica.

### 4.4 Entorno artificial 2: cocultivo de precursores neurales en un “scaffold” 3D de PEA y células de Schwann cultivadas en films 2D de PEA.

#### 4.4.1 Elaboración del “scaffold” 3D de PEA.

El “scaffold” poroso de PEA se realizó a partir de una placa sinterizada de PMMA, que posteriormente fue impregnada con una solución de etil Acrilato, EGDMA (2%) y Benzoína (Scharlab) (1%). Se polimerizó por UV 8 horas, se postpolimerizó a 90°C, se eliminó el porógeno con lavados de acetona en agitación continua durante 4 días, intercambiando la acetona cada 24 horas.

Las placas de PMMA se obtuvieron con la prensa “Gumix” modelo T0-250/20, realizando 3 compresiones consecutivas bajo las siguientes condiciones: la plataforma con el porógeno se precalentó 5 minutos a 150°C sin compresión. La primera compresión se realizó a 150°C y 100 bares durante 8 minutos. La segunda compresión fue de 4 minutos a 140°C y 100 bares y la tercera compresión tuvo lugar a 140°C y 200 bares durante 20 segundos. Entre cada

compresión se enfriaban las placas de la prensa hasta 60°C y con una presión de entre 40-50 bares. Además, se deben precalentar las placas durante 1 minuto antes de la segunda y la tercera compresión. Las placas obtenidas tenían un grosor de 3mm aproximadamente. Para eliminar la capa continua que se forma como resultado del calentamiento, las placas obtenidas fueron devastadas superficialmente con una lija de grano grueso y luego con una de grano fino, el control de este proceso se realizó observando en el microscopio óptico las placas lijadas. Después se cortaron en fragmentos de 4x4cm, los cuales fueron impregnados con la solución de etil Acrilato, EGDMA (2%) y benzoína (1%), con ayuda de una pipeta Pasteur, mojando ambas caras, una vez impregnada totalmente, la placa se colocó entre dos moldes de vidrio separados por un cable, para hacer las veces de un contenedor, las placas fueron luego colocadas en un estufa con luz ultravioleta para su polimerización durante 8hrs, posteriormente se postpolimerizó a 90°C durante 8 horas.

Transcurridos los 4 días de lavado, se llevó a cabo un intercambio de agua paulatino de la siguiente forma: se añadieron 6mL de agua desionizada (Scharlab) cada 10 minutos, hasta llegar a 100mL. Después se añadieron 11mL de agua cada 10 minutos hasta alcanzar los 200mL. A continuación, se aumentaba la cantidad hasta 15mL cada 10 minutos, pero en este último paso se bajaba el tiempo de adición de agua hasta 5 minutos, cuando se estaba llegando al final del proceso. Se debe tener en cuenta que no se debe de añadir nunca el agua encima del "scaffold", se debe verter sobre la pared del cristizador, es importante remover el agua para evitar la formación masiva de burbujas y, conforme avanza el proceso, se debe quitar la mezcla y añadir agua al cristizador.

Una vez que el material alcanzó el tamaño original, ya que se había expandido con los lavados de acetona, se continuó con los lavados de agua durante 2 días más y finalmente se dejó secar el material, 24 horas a 40°C en el desecador a vacío "P-SELECTA, VACUO-TEMP"

#### **4.4.2 Caracterización de la morfología.**

La caracterización de la morfología de las partículas se llevó a cabo mediante microscopía óptica y la de los andamios mediante microscopía electrónica de barrido. En el primer caso se tomó un promedio de 50 imágenes por cada grupo de estudio. Se caracterizó el material con un microscopio electrónico de barrido para poder evaluar la porosidad del "scaffold".

#### **4.4.3 Procesado de los materiales.**

Los "scaffolds" 3D de PEA se troquelaron, utilizando un troquel de 5mm de diámetro y a continuación se incluyeron en OCT (Leica) mediante presión negativa: se colocaron los

“scaffolds” en el interior de una jeringa, se cerró el flujo y se introdujo en el interior de la jeringa el OCT. Al intentar aspirar aire con la jeringa, como el flujo estaba cerrado, se conseguía la impregnación total del material con OCT mediante presión negativa. Una vez las muestras estaban incluidas, se realizaron cortes del material con el criostato (Leica CM 1520) a una temperatura de -30°C, obteniendo de esta forma, membranas 3D de PEA porosas de 50 µm de espesor. Para eliminar los residuos de OCT, las muestras fueron sonicadas (con el sonicador “Ultrasonic Cleaner, VWR”) y lavadas con agua desionizada, mediante intercambios continuos, 10 veces.

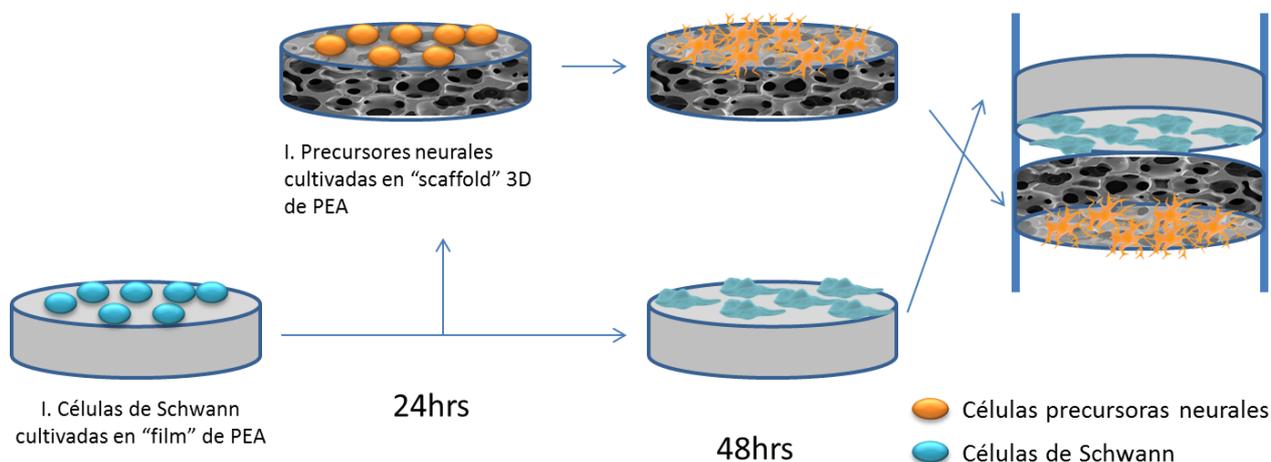
Los materiales se dejaron secar sobre superficies de teflón, para que no se adhirieran a la superficie y se esterilizaron por autoclave, 120°C 2 bares, y, a continuación, se acondicionaron con laminina, (20ug/mL), durante 2 horas a 37°C. Posteriormente estas membranas de PEA fueron lavadas con solución salina.

#### **4.4.4 Diseño y elaboración del dispositivo de cocultivo**

Al elaborar el dispositivo de cocultivo surgieron varios problemas. La membrana de PEA era muy fina, 50µm de grosor, y su manipulación resultaba muy complicada, ya que era muy fácil comprimir con las pinzas, y cuando ocurría esto esa membrana ya no servía porque se habían modificado sus propiedades morfo-mecánicas. Además, al problema de la manipulación de las membranas se añadía el problema de cómo realizar el cultivo. El PEA es un material altamente hidrófobo, de forma que al cultivar las células, éstas, junto con el medio de cultivo, quedaban formando una gota sobre el material, y no se impregnaba fácilmente.

Una vez se consiguió impregnar completamente las membranas, el próximo reto era montar el sistema de cocultivo sin dañar la membrana ni las células. Y, a continuación, había que fijar de alguna forma este sistema. Para esto se dispusieron tanto la membrana como el film, en el interior de un cilindro en el cual encajaban perfectamente los dos materiales cultivados. Estos cilindros se obtuvieron a partir de tubos Eppendorf de 0.2mL. Se cogieron tubos Eppendorf y se cortaron justo por debajo del cilindro de la tapa y justo por encima de la parte con forma de cono.

Cuando ya estaba montado el dispositivo, y se dispuso a introducir el medio de cultivo correspondiente para cada ensayo, las membranas 3D de PEA flotaban, por lo tanto, se tuvo que cambiar la orientación de cada uno de los dispositivos, cuando ya estaban montados, quedando de la siguiente forma:

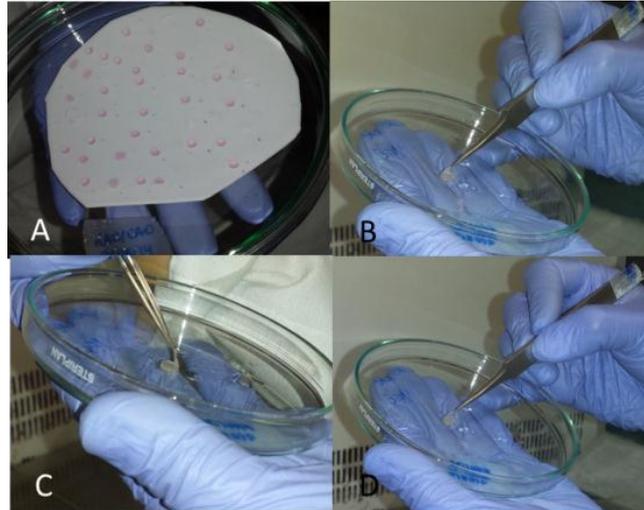


**Ilustración 4:** EA2. Los precursores neurales se cultivan en una cara de la membrana, "scaffold" de PEA, donde quedan atrapados entre los poros de este material. Las células de Schwann se cultivan sobre la superficie del "film" de PEA. El montaje del dispositivo se realiza de forma que el "scaffold" de PEA queda en la parte superior y el "film" con células de Schwann queda en la parte inferior, y no hay contacto directo entre los dos tipos celulares. Para fijar este entorno, se colocan ambas superficies en el interior de un cilindro, que se obtiene al cortar tubos Eppendorf. Un corte se realiza justo por debajo de la tapa, y el otro se realiza justo antes del comienzo de la forma cónica del tubo Eppendorf.

#### 4.4.5 Cultivo bifásico 3D-2D

Se cultivaron los precursores neurales sobre estas membranas procesadas durante 24 horas. Pero, previamente, se había llevado a cabo el cultivo de células de Schwann durante 48 horas sobre films 2D de PEA, que fueron proporcionados por el CBIT (Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular). Estos films se troquelaron también a 5mm pero se les hizo tres muescas triangulares a cada film para favorecer el flujo del medio. Fueron esterilizados antes de realizar el cultivo de células, bajo las mismas condiciones que las membranas 3D porosas de PEA.

Se hizo coincidir las 24 horas de los precursores neurales con las 48 de las células de Schwann. A continuación, se colocó el "scaffold" 3D sobre los films 2D con las células de Schwann con los dispositivos que diseñamos. Se incubó el cocultivo y los resultados obtenidos se evaluaron a 2 tiempos: 7 y 14 días.



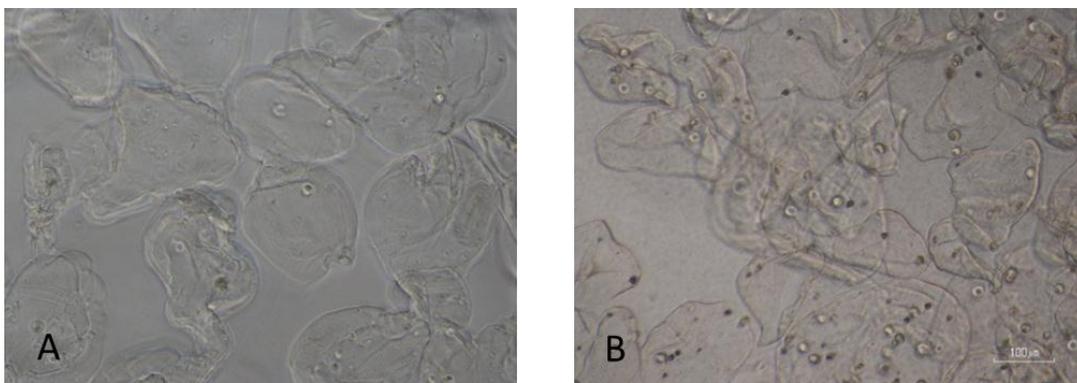
**Ilustración 5:** En este conjunto de fotografías se observa paso a paso como se montó el sistema de cocultivo, haciendo coincidir la cara del “scaffold” donde no había células con la cara del film de PEA donde estaban las células de Schwann. El scaffold actúa como una barrera entre unas células y otras.

## 5 RESULTADOS

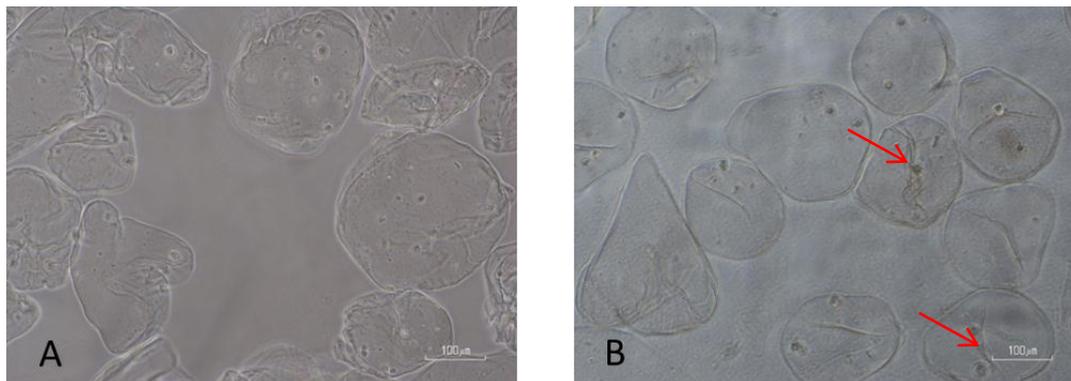
### 5.1 Entorno artificial 1: precursores neurales encapsulados en alginato cálcio.

#### 5.1.1 Encapsulamiento de células

Fue posible encapsular los precursores neurales en alginato al 0.3% con una densidad de 5 a 12 células por partícula de alginato. Además, estas células siguen vivas a día 7, como se observa en la imagen B.



**Ilustración 6:** Microscopía óptica. A→precursores neurales encapsulados en partículas de alginato a día 1. B→ precursores neurales encapsulados en partículas de alginato a día 7. Este entorno permite la viabilidad celular y la proliferación, ya que en la ilustración B se observa que ha aumentado la población celular. Las partículas presentan un promedio de 10-15 células cada una.



**Ilustración 7:** Microscopía óptica. A → precursoros neurales encapsulados en partículas de alginato a día 1. B → precursoros neurales encapsulados en partículas de alginato a día 7. En la ilustración B se observan unos cambios morfológicos en las células que podrían estar asociados a la formación de procesos celulares, indicado con flechas rojas

Las partículas de alginato presentan un diámetro promedio de  $190\mu\text{m}$ , medida que resulta coherente ya que la aguja que se utilizó en el proceso de encapsulación presentaba un diámetro de  $200\mu\text{m}$ .

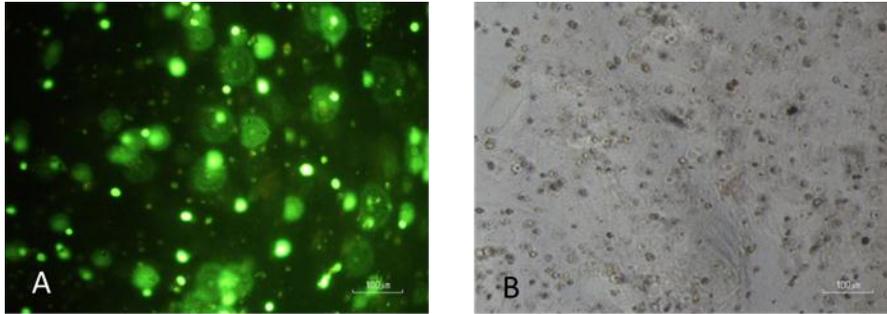
Las partículas obtenidas no son completamente esféricas, como se puede observar en las ilustraciones 6 y 7. Además, se observan variaciones en la forma de las esferas a lo largo del tiempo, éstas se van disgregando, de forma que según pasa el tiempo, menos partículas quedan. El número de partículas totales va disminuyendo en el tiempo, habiendo muchas a día 1 y quedando muy pocas a día 14. Por otra parte, a partir del día 7 se observan cambios morfológicos en un 20% de las células que podrían corresponder a la formación de procesos celulares.

### 5.1.2 Evaluación de la viabilidad

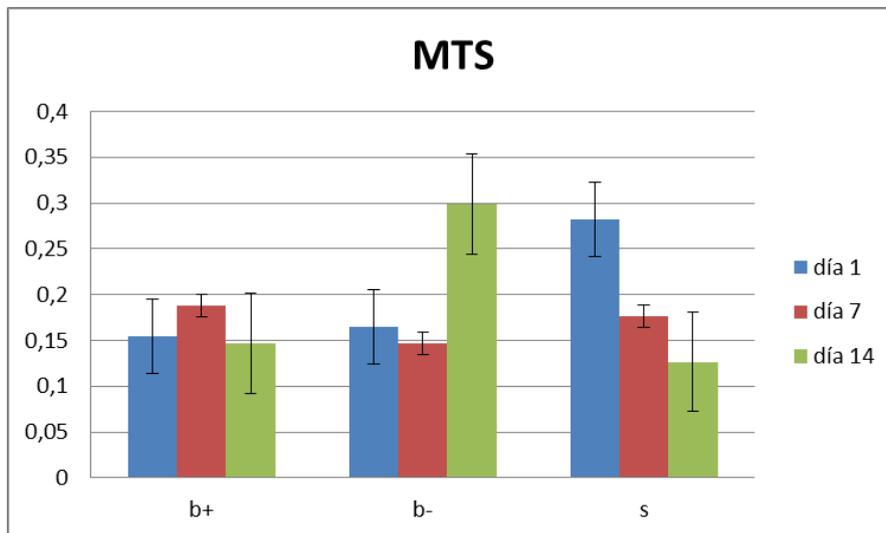
Como ensayo de viabilidad se realizó la prueba de LIVE/DEAD, y se observó que, efectivamente, los precursoros neurales sobrevivían en el interior de las esferas de alginato a los 3 tiempos que se estudiaron. En la imagen se pueden observar las células teñidas de verde, lo cual indica que la Calceina penetra en el interior de las membranas de las células que están vivas.

También se realizó la prueba de viabilidad de MTS: en la figura se observa que en el grupo de precursoros neurales encapsulados en alginato cuyo medio fue enriquecido con BDNF, no presenta diferencias significativas en los tres tiempos evaluados. Sin embargo, en el grupo de estudio con el medio de cultivo no enriquecido con BDNF, se observa un fenómeno particular. La viabilidad permanece constante hasta los 7 días, pero a día 14 se ha aumentado considerablemente. En el último grupo, que se trata del cocultivo con células de Schwann, la

eficiencia inicial de siembra es estadísticamente superior con respecto a los otros dos grupos de estudio. Pero, la viabilidad va disminuyendo a cada tiempo, observándose que a día 14 la viabilidad es menor al 50% con respecto al día 1.

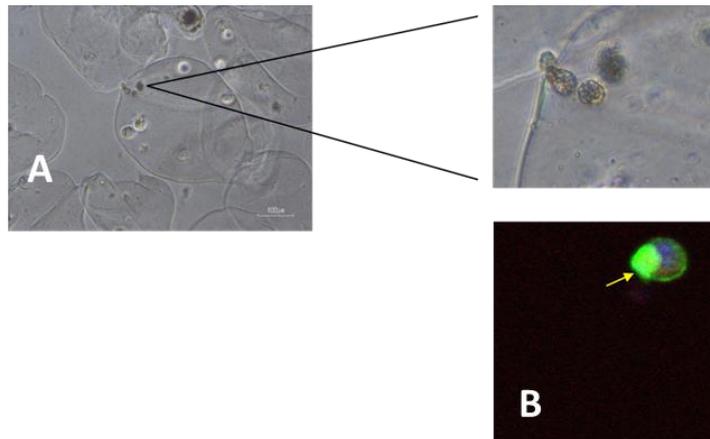


**Ilustración 8:** Microscopía de fluorescencia, ensayo de LIVE/DEAD. En las dos ilustraciones se muestra el mismo plano de células, pero en la ilustración A se observa qué células están vivas, marcadas en color verde, mientras que en la ilustración B se observa esas mismas células pero en campo claro.

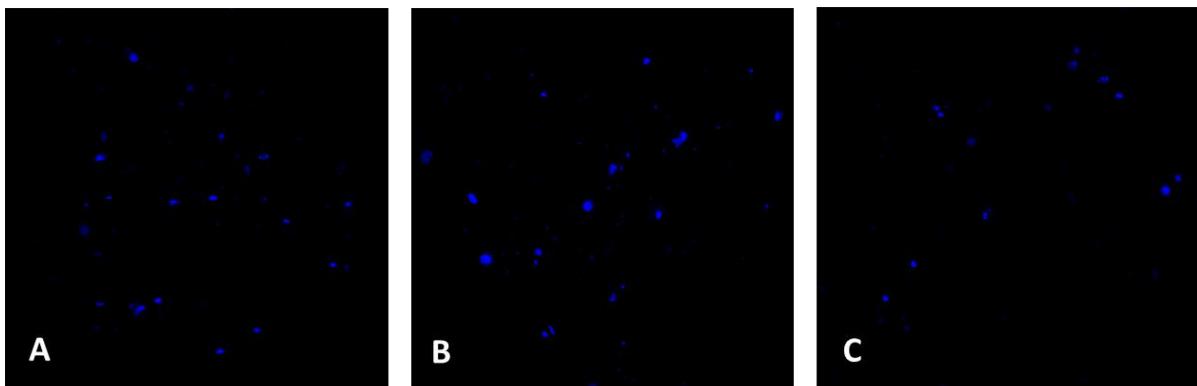


**Tabla 1:** Ensayo de MTS. b+→medio de con BDNF; b- →medio sin BDNF; s →grupo de cocultivo con células de Schwann. En el grupo b+ se mantiene la viabilidad constante; en el grupo b- la viabilidad aumenta de forma considerable a día 14; en el grupo s la viabilidad disminuye a lo largo del tiempo aunque es el grupo con mayor eficiencia de siembra.

### 5.1.3 Evaluación de la morfología y distribución celular



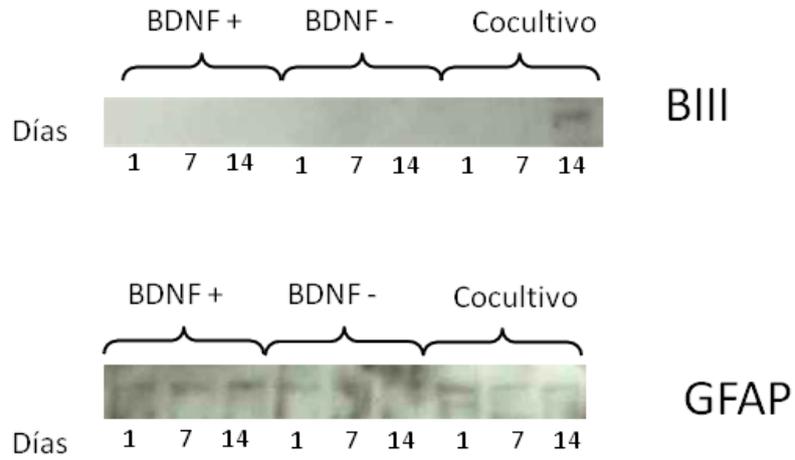
**Ilustración 9:** En la fotografía A, microscopía óptica, con el zoom se observa que las células que están próximas a la superficie adquieren una morfología típica de migración, y parece que las células intentan salir de las partículas de alginato. La fotografía B, microscopía de fluorescencia, se trata de un marcaje con falacidina-DAPI. En azul está marcado el núcleo y en verde el citoesqueleto. En la célula que se muestra en la fotografía B se puede observar la polarización del citoesqueleto de actina, lo cual puede ser indicativo de la formación de un filopodio. La célula está extendiéndose hacia una dirección y este proceso puede estar relacionado con la migración o con la diferenciación celular.



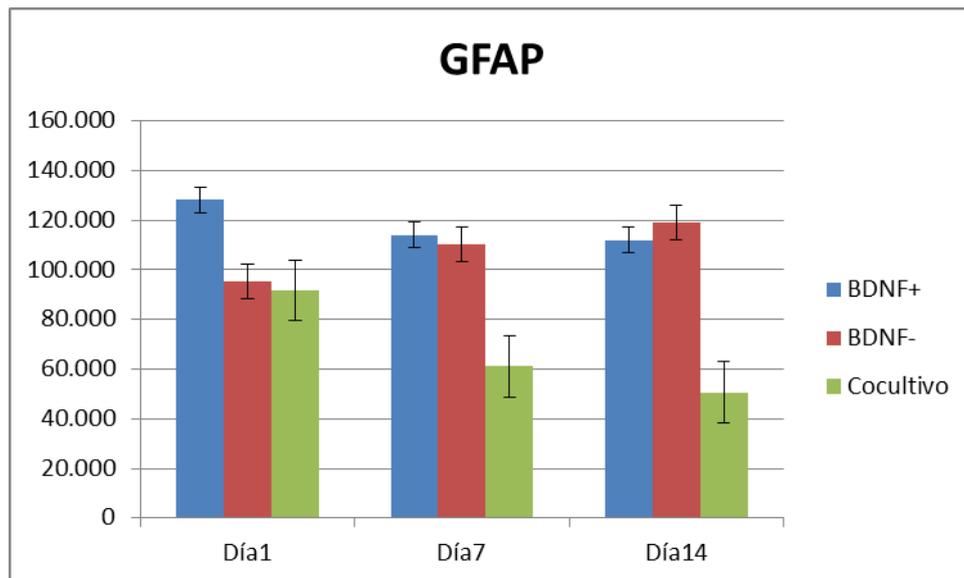
**Ilustración 10:** Microscopía confocal. Marcaje DAPI de las células precursoras neurales encapsuladas en partículas de alginato. Los núcleos de las células se distribuyen más hacia los extremos de la partícula de alginato en la fotografía A. En las 3 fotografías se observa como el núcleo mantiene la morfología circular, las células no se extienden correctamente.

### 5.1.4 Evaluación de la diferenciación

Los resultados obtenidos en el Western Blot para identificar la presencia de  $\beta$ III-tubulina, que es un indicador de diferenciación a neurona, y de GFAP, que es un indicador de diferenciación a células de linaje glial, fueron los que se muestran en las siguientes figuras:

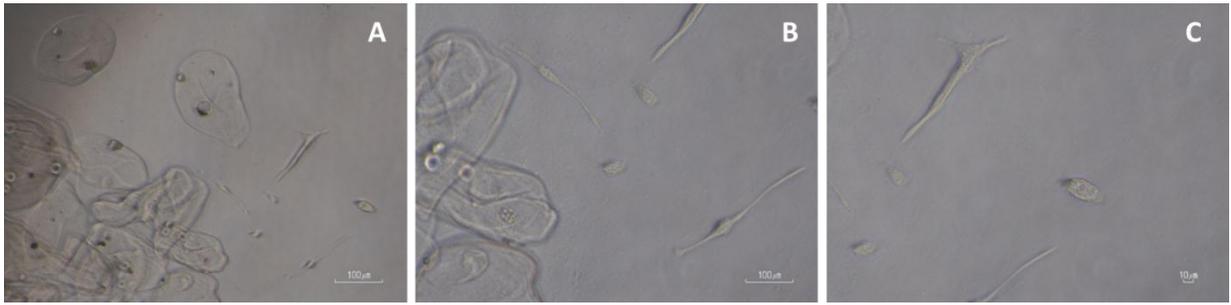


**Ilustración 11:** Resultado del Western Blot. Se observa que solo hay presencia de  $\beta$ III-tubulina en el sistema de cocultivo de precursores neurales con células de Schwann a día 14. Por otra parte, en todos los ensayos se aprecia la presencia de GFAP, indicadora de presencia de linaje glial.



**Tabla 2:** Cuantificación de GFAP. En todos los ensayos se aprecia la presencia de GFAP, pero, como se puede ver en la gráfica, la presencia de esta molécula es menor en los ensayos de cocultivo, y este es el único grupo en el que sí hay presencia de  $\beta$ III-tubulina, indicador de diferenciación neural.

### 5.1.5 Evaluación de la liberación celular

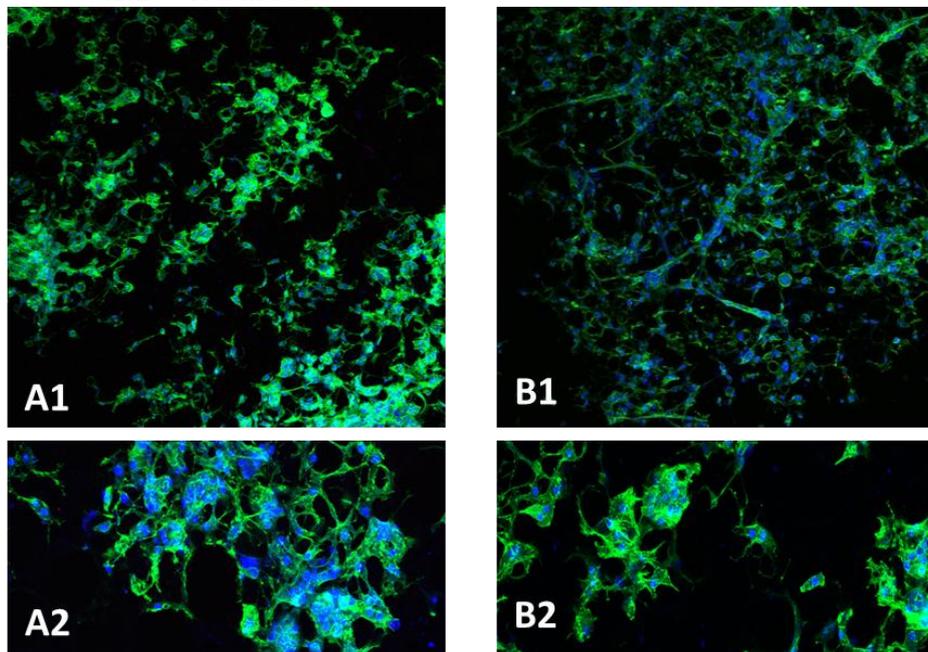


**Ilustración 12:** Microscopía óptica. Cada fotografía, A, B y C, muestran un zoom óptico distinto para el mismo conjunto de células, pertenecientes al grupo de estudio sin BDNF y evaluadas a día 7. Se observa presencia de células en el cubreobjetos de laminina, por lo tanto, se produce migración celular.

Se observaron los resultados del ensayo de migración celular a día 7 mediante microscopía óptica, y se vió que el resultado de esta prueba fue: en el grupo de estudio que contenía el factor BDNF y en el grupo de cocultivo con Schwann, no se observó migración, mientras que sí se observó en el grupo de estudio que no contenía BDNF.

## 5.2 Entorno artificial 2: cocultivo de precursores neurales cultivados en un "scaffold" 3D de PEA y células de Schwann cultivadas en films 2D de PEA.

### 5.2.1 Viabilidad



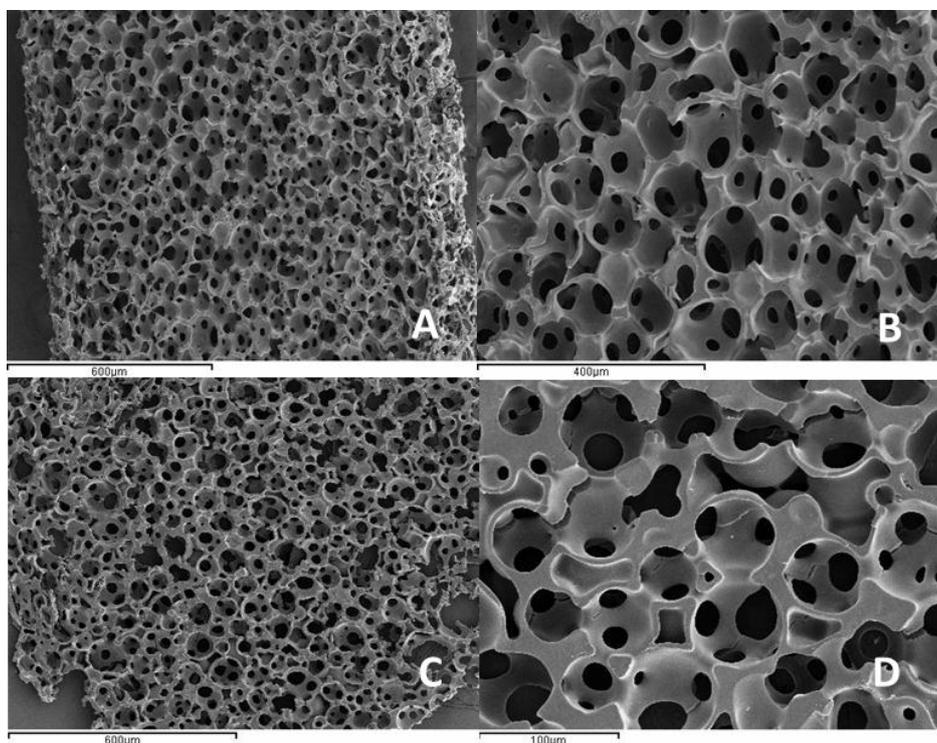
**Ilustración 13:** Microscopía confocal. Marcaje con falacidina-DAPI de las células del EA2. A1 y A2 → fotografías del ensayo control, sin presencia de células de Schwann. B1 y B2 → fotografías de los precursores neurales en presencia de células de Schwann. En ambos casos se observa que las células

sobreviven, pero cuando hay presencia de células de Schwann las células presentan un mayor desarrollo del citoesqueleto, emitiendo prolongaciones. Día 7.

### 5.2.2 Morfología y características de los "scaffolds" 3D de PEA

El material obtenido resultó un andamio tridimensional, con poros, de entre 50-70 micras, interconectados, con un grosor de 50 $\mu$ m. Estos materiales fueron troquelados, quedando con forma circular, con 5mm de diámetro. Al tener tan poco grosor, se les considera como unas membranas.

Los materiales no se colapsaron y se consiguió una interconexión adecuada que permitió realizar el experimento de cocultivo como se había planteado en el esbozo inicial del estudio.

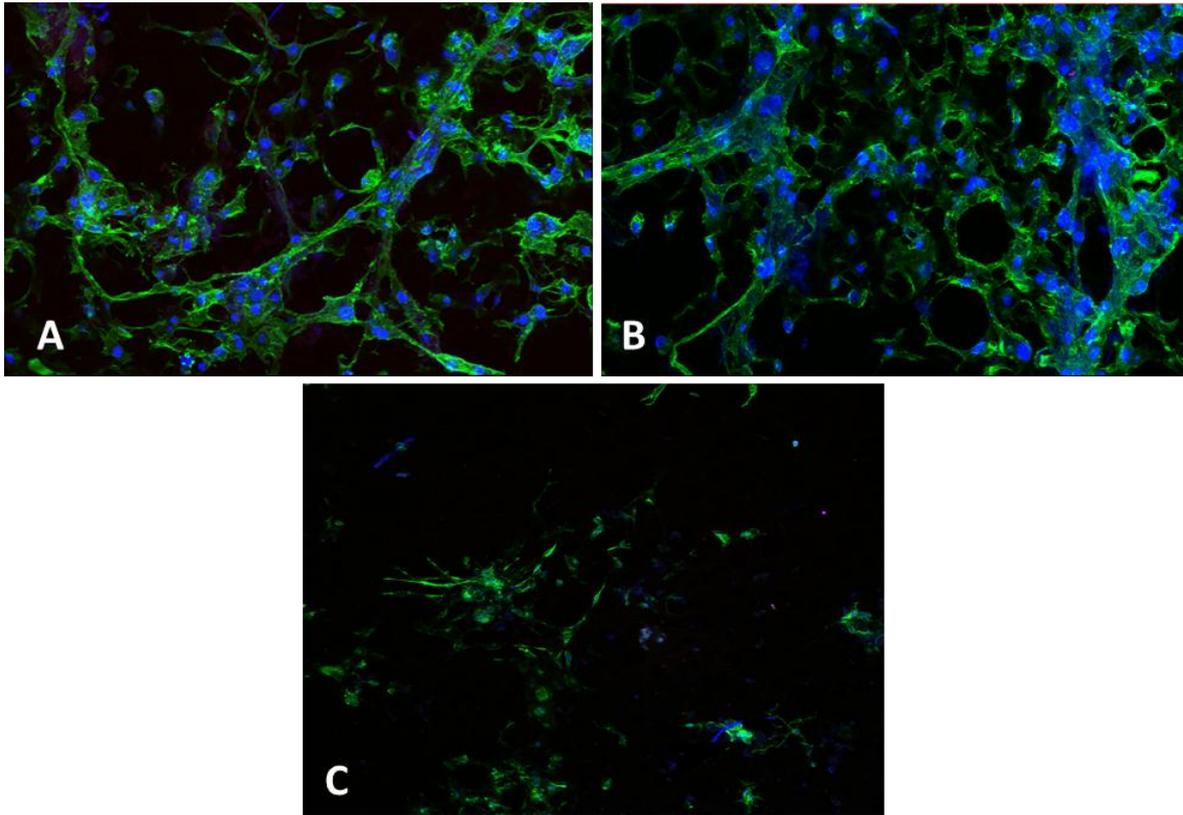


**Ilustración 14** Microscopía electrónica de barrido de "scaffolds" de 3D de PEA. Se observa la estructura, morfología y distribución de los poros. A y B "Scaffolds" de 3D de PEA sin cortar, 1mm de espesor. C y D "Scaffolds" de 3D de PEA cortados a 50 $\mu$ m de espesor.

### 5.2.3 Evaluación de la morfología y distribución celular del cocultivo

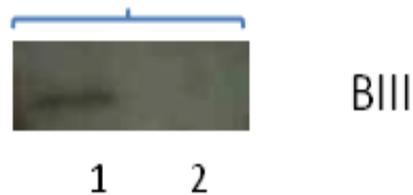
Las células se encuentran perfectamente extendidas y se pueden observar las prolongaciones de los filamentos del citoesqueleto de actina aunque también se observan células sin prolongaciones. Estas imágenes fueron tomadas a día 7.

Se realizaron construcciones tridimensionales mediante el software "Imaris" a partir de las fotografías tomadas con el microscopio confocal. (Anexo 8)



**Ilustración 15:** Microscopía confocal. Neuroesferas cultivadas en scaffolds de PEA en cocultivo con células de Schwann. Tinción de núcleos (DAPI, Azul) y citoesqueleto de actina (faloidina/Biodypil, Verde). 20X. En las fotografías A y B se observa como las células desarrollan prolongaciones celulares alrededor de los poros del “scaffold”. La fotografía C muestra también las prolongaciones de las células, pero proporciona una imagen más general del entorno.

#### 5.2.4 Evaluación de la diferenciación en el cocultivo



**Ilustración 16:** Resultado del Western Blot. Se observa que solo hay presencia de  $\beta$ III-tubulina en el sistema de cocultivo de precursores neurales con células de Schwann. 1) Extracto total de proteínas de células precursoras neurales en cocultivo con células de Schwann, sobre un “scaffold” 3D de PEA a día 7. 2) Extracto total de proteínas de precursoras neurales sobre un “scaffold” 3D de PEA a día 7.

## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Entorno artificial 1 (EA1): precursores neurales encapsulados en partículas de alginato.

#### 6.1.1 Viabilidad

Según los resultados obtenidos en la encapsulación de células, se puede inferir que el alginato permite la proliferación celular, pero esta tiene lugar de forma más lenta que en condiciones *in vitro* normales. Es probable que esto ocurra porque la composición del alginato podría influir al brindar estímulos de tipo biomecánico en las células, impidiendo su libre movimiento y alterando de esta forma el proceso proliferativo. Además, este entorno es viable para las células, ya que se observa supervivencia celular hasta 14 días después de su encapsulación.

En el ensayo al cual se le adicionó el factor BDNF, se observó que la viabilidad permanecía constante. Parece ser que parte de las células mueren porque reciben el estímulo químico para diferenciarse a neurona pero no lo consiguen porque otros factores concurrentes no están presentes, como proteínas de matriz extracelular organizadas en filamentos extendidos, ya que esta descrito que el crecimiento axonal, depende en parte, de la interacción célula-matriz mediante integrinas; a la par, otro grupo de células se diferencian a linaje glial, ya que en el ensayo de Western Blot se observa una gran presencia de proteína glial. Por lo tanto, el mantenimiento de la viabilidad constante se puede explicar por la presencia de células de la glía que proliferan.

En el ensayo en el que no se adicionó el factor de diferenciación, la viabilidad aumenta de forma considerable a día 14. La explicación a este hecho puede ser que, al no estar obligando a las células a diferenciarse a linaje neural, ya que no hay presencia de BDNF en el medio, un porcentaje elevado va diferenciarse a linaje glial y va a proliferar sin ningún impedimento, porque, según los resultados del primer grupo de estudio, este factor induce la muerte celular en el interior de las partículas de alginato.

Por último, en el ensayo correspondiente al tercer grupo de estudio, el cocultivo con células de Schwann y medio sin BDNF, es el grupo en el que se observa una mayor disminución de la viabilidad a lo largo del tiempo. Es probable que esto ocurra debido a que se está induciendo la diferenciación a neurona, mediante los factores secretados por las células de Schwann, en un porcentaje considerablemente más elevado en los sistemas anteriores, presentándose una

situación similar a la del ensayo con BDNF, las células al no poder llevar a cabo la diferenciación, no progresan y entrarían en apoptosis, por lo que al existir un mayor porcentaje de células con un proceso de diferenciación a neurona, el porcentaje de muerte es mayor.

### **6.1.2 Diferenciación**

Según estudios realizados recientemente, la rigidez de los hidrogeles afecta a la diferenciación neuronal. Los hidrogeles que presentan una rigidez menor a 1kP favorecen la diferenciación neuronal, y en función de cual sea la rigidez del hidrogel, se favorecerá la diferenciación hacia un linaje celular u otro <sup>(66)</sup>.

En el ensayo al cual se le adicionó el factor BDNF y la ausencia de una matriz extracelular organizada en filamentos, favorecieron la disminución de la viabilidad celular en este entorno artificial. Eso puede que ocurra porque las células están recibiendo un estímulo que las induce a realizar una función que les es imposible de llevar a cabo debido a que están envueltas por alginato. Entonces, al no poder realizar esa función, las células inducen la apoptosis. Este comportamiento puede deberse a que el espacio del que disponen las células para crecer y diferenciarse es muy limitado, y al recibir el estímulo que les indica diferenciación, y no poder llevarla a cabo por las limitaciones del entorno en el que se encuentran, las células mueren.

En el segundo grupo de estudio, sin factor BDNF, sí se observó diferenciación de los precursores pero no a linaje neural, sino a células de la glía. De esto se deduce que el primer entorno, si no se le adiciona ningún factor que induce la diferenciación neural, favorece la diferenciación a células de la glía y permite también la proliferación de estas células.

En el tercer grupo de estudio, cocultivo con Schwann, las células sí se diferencian a linaje neural, observándose expresión de la proteína característica de neuronas,  $\beta$ -III-tubulina, a día 14. De esto se deduce, que el conjunto de factores que secretan las células de Schwann son suficientes para inducir la diferenciación neural. La adición única del factor BDNF sería insuficiente para inducir la diferenciación a neurona en este entorno artificial.

Por otra parte, es muy probable que las células no puedan producir la matriz extracelular en el interior de las partículas de alginato o puede que no sean capaces de organizarla bien, por lo que las células acaban muriendo. Este entorno impide o la secreción o la organización de la matriz extracelular por lo que es posible que el proceso de diferenciación no se desarrolle de forma normal.

### **6.1.3 Migración**

En el grupo de estudio al cual se adicionó BDNF no se observó migración de las células hacia el portaobjetos recubierto de laminina. Lo cual pudo haber ocurrido porque la población de células no era lo suficientemente elevada, ya que una gran parte morirían al intentar diferenciarse a linaje neural.

En el segundo grupo de estudio, sin factor BDNF, sí se observaron células en el portaobjetos, por lo tanto, sí tuvo lugar la migración celular. Las células que migraron eran células de la glía. De esto podemos inferir que la población celular se incrementó lo suficientemente como para dar lugar a liberación de células, ya que el espacio para crecer estaba limitado por la partícula de alginato.

En el grupo del cocultivo con células de Schwann, es probable que no se observe liberación celular, debido a la baja densidad infiriendo que un porcentaje elevado se diferenció a células neurales en comparación con los otros grupos, el porcentaje de proliferación se ve reducido.

## **6.2 Entorno artificial 2 (EA2): cocultivo 3D-2D de precursores neurales atrapados en un “scaffold” de PEA con células de Schwann en un film de PEA.**

### **6.2.1 Viabilidad**

Este entorno, permite la viabilidad y proliferación de células hasta 7 días después del cultivo de los precursores neurales. Esto es coherente de acuerdo con toda la información que está reportada con respecto a los “scaffolds” de PEA y el cultivo de células. De esto podemos deducir que el “scaffold” sí permite la correcta secreción y organización de la matriz extracelular por parte de los precursores neurales, proceso crucial para que las células puedan sobrevivir, proliferar y diferenciarse, si se dan las condiciones adecuadas.

### **6.2.2 Diferenciación**

En el ensayo que se realizó sin cocultivo de Schwann, no se observó diferenciación neural, a día 7 evaluado mediante la expresión de  $\beta$ III-tubulina, mientras que cuando en el caso en el que sí hay presencia de células de Schwann ocurre la diferenciación neuronal. Por lo tanto, las células de Schwann influyen claramente en el proceso de diferenciación, tal y como ya se infiere en el EA1 según los resultados obtenidos.

### 6.3 Factores secretados por las células de Schwann: efectos sobre los 2 entornos artificiales

Según los resultados obtenidos en el Western Blot que se realizó, se deduce que la estrategia de cocultivo induce la diferenciación neural. Además, en la gráfica de GFAP, resultado del EA1, se observa que el grupo de cocultivo es el que menos cantidad de células gliales presenta, lo cual podría indicar que eso se debe a que los precursores neurales se están diferenciando en mayor proporción a neuronas que a células gliales. Es entonces evidente que las células de Schwann secretan factores como el NGF (“nerve growth factor”), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NY-4/5), CNTF (“neurokines ciliary neurotrophic factor), BDNF, LIF (“leukemia inhibitory factor”), TGFs-beta y GDNF (“glial cell line-derived neurotrophic factor”) que favorecen la diferenciación a linaje neural de las células precursoras neurales<sup>(67)</sup>.

Resulta, pues, evidente, la existencia de un fenómeno de “cross-talk” muy importante entre las células de Schwann y los precursores neurales, ya que las señales que envían las células de Schwann son más variadas y precisas que las que pueden ser inducidas mediante medios de cultivo y la adición artificial de factores de diferenciación. Existe la posibilidad de que, incluso la concentración a la cual son secretados estos factores sea la idónea para inducir el proceso de diferenciación. Cabe destacar que la interacción entre células no depende de un solo factor aislado, sino que constituye un diálogo perfectamente orquestado con abundantes elementos. Por lo tanto, la diversidad de factores secretados por las células de Schwann en las cantidades precisas favorecieron la diferenciación al linaje neural, en el grupo control es probable que se requirieran tiempos más largos de evaluación.

Lo mismo ocurre en el dispositivo de cocultivo diseñado en el segundo entorno artificial, ya que pese a que los dos linajes celulares no se encuentran en contacto directo, los factores producidos por las células de Schwann llegan hasta los precursores neurales que están anclados en el interior del “scaffold” de PEA. Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia del “cross-talk” entre Schwann y los precursores neuronales en el proceso de diferenciación neural. Recientemente se ha descubierto la existencia de una microvesículas de membrana circulantes, que actúan como mensajeros de la activación de células para que realicen funciones determinadas. Puede que en el “cross-talk” no directo que tiene lugar en los entornos artificiales propuestos en este trabajo, estén involucradas estas “microvesículas viajeras”, ya que en ningún momento se produce contacto directo entre los precursores neurales y las células de Schwann<sup>(68)</sup>.

## **7 CONCLUSIONES**

Se consigue encapsular células precursoras neurales en alginato al 0.3%, favoreciendo la neuroprotección y preservando su viabilidad hasta 14 días.

En este primer entorno artificial (EA1), precursores neurales encapsulados en partículas de alginato, se establecieron 3 condiciones:

BDNF + Precursores Neurales encapsulados en alginato → no es un buen entorno, no se observa diferenciación neural y las células que intentan diferenciarse a neurona entran en apoptosis. Solo se observa diferenciación a linaje glial de los precursores neurales que consiguen sobrevivir.

Medio de diferenciación sin BDNF + Precursores Neurales encapsulados en alginato → es un buen entorno para mantener la viabilidad celular y para inducir la diferenciación de los precursores neuronales a células de la glía.

Células de Schwann + Medio de diferenciación sin BDNF + Precursores Neurales encapsulados en alginato → es un buen entorno para inducir la diferenciación neural, que es uno de los objetivos de este trabajo.

Por otra parte, en el segundo entorno artificial (EA2), cocultivo 3D-2D de precursores neurales atrapados en un “scaffold” de PEA con células de Schwann en un film de PEA, se observa que, efectivamente, los factores que secretan las células de Schwann tienen un efecto positivo sobre la diferenciación de los precursores neurales hacia el linaje neuronal. Además, se consigue atrapar a los cuerpos neuronales en el interior de los poros del “scaffold”, consiguiendo observar cómo se desarrollan las prolongaciones celulares a través de los canales formados por la interconexión de los poros del material.

## **8 PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Una idea futura relacionada con el primer entorno artificial, sería poder implantar las células en el lugar específico de la lesión mediante un hidrogel de alginato, evitando de esta

forma la migración celular a otras zonas, y que, además, este hidrogel se pudiera utilizar como un sistema de liberación de células y factores que se podría aplicar en otras situaciones.

También, cabe la posibilidad de poder combinar los dos entornos propuestos en uno solo, de forma que se introdujeran las partículas de alginato en los poros del scaffold de PEA que se ha descrito.

La membrana tridimensional de PEA, con un grosor de 50µm, obtenida en este estudio puede emplearse en proyectos de investigación de cocultivo para ver los efectos de una línea celular sobre otra línea celular distinta, resultando muy útil para evaluar el fenómeno de “cross-talking” que ocurre entre distintos linajes celulares.

Por último, sería interesante observar cómo afectaría al proceso de diferenciación neural el hecho de encapsular tanto los precursores neurales como las células de Schwann, es decir, tener el cocultivo encapsulado en alginato.

## 9 **BIBLIOGRAFÍA**

1. Ramón y Cajal S. *Degeneration and regeneration of the nervous system*. In Ramón y Cajal S, ed. New York: Haffner Publishing; 1928
2. Gage FH. *Mammalian neural stem cells*. *Science* 2000; 287: 1433-8.
3. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. *Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology*. *Physiol Rev* 2005; 85: 523-69.
4. Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. *Neurogénesis en el cerebro adulto*. *Rev Neurol* 2007; 44: 541-50.
5. Aguayo AJ, Bray GM, Perkins SC. *Axon-Schwann cell relationships in neuropathies of mutant mice*. *Ann N Y Acad Sci* 1979; 317:512-31.
6. David S, Aguayo AJ. *Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats*. *Science* 1981; 214:931-3.
7. O. Arias-Carrión, R. Drucker-Colín, *Neurogénesis como estrategia terapéutica para regenerar el sistema nervioso central*, *REV NEUROL* 2007; 45 (12): 739-745.
8. A.C. Shivachar, *Isolation and Culturing of Glial, Neuronal and Neural Stem Cell Types Encapsulated in Biodegradable Peptide Hydrogel*, *Topics in Tissue Engineering*, Vol. 4. Eds. N Ashammakhi, R Reis, & F Chiellini © 2008.
9. R. Serrano, M.P. Rodríguez, L. Sorel, A. Aguilar, L. Herrera, J, de la Fuente, *Encapsulación de células en perlas de alginato de calcio: posibilidades de aplicación*, *Bioteología Aplicada Vol.7, No.3, 341-345 (1990)*.

10. Cadelli DS, Bandtlow CE, Schwab ME. *Oligodendrocyte- and myelin-associated inhibitors of neurite outgrowth: Their involvement in the lack of CNS regeneration*. Exp Neurol 1992;115:189.
11. Nishio T. *Axonal regeneration and neural network reconstruction in mammalian CNS*. J Neurol 2009;256:306.
12. Davies SJ, Silver J. *Adult axon regeneration in adult CNS white matter*. Trends Neurosci 1998;21:515.
13. Huebner EA, Strittmatter SM. *Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems*. Results Probl Cell Differ 2009;48:339.
14. Bandtlow CE. *Regeneration in the central nervous system*. Exp Gerontol 2003;38:79.
15. Zhang H, Hayashi T, Tsuru K, Deguchi K, Nagahara M, Hayakawa S, Nagai M, Kamiya T, Osaka A, Abe K. *Vascular endothelial growth factor promotes brain tissue regeneration with a novel biomaterial polydimethylsiloxane-tetraethoxysilane*. Brain Res 2007;1132:29.
16. Kemp SW, Syed S, Walsh W, Zochodne DW, Midha R. *Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, Schwann cell association, and neovascularization compared to silicone conduits*. Tissue Eng Part A 2009;15:1975.
17. Tian WM, Hou SP, Ma J, Zhang CL, Xu QY, Lee IS, Li HD, Spector M, Cui FZ. *Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury*. Tissue Eng 2005;11:513.
18. Woerly S, Petrov P, Sykova E, Roitbak T, Simonova Z, Harvey AR. *Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: Ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies*. Tissue Eng 1999;5:467.
19. N G McCrum, B E Read, G Williams. *Anelastic and dielectric effects in polymeric solids*. John Wiley & Sons 1967; Dover repr 1991
20. J M Soria, C Martínez-Ramos, V Benavent, A Campillo-Fernández, J L Gómez-Ribelles, M Salmerón-Sánchez, J M García-Verdugo, M Monleón Pradas, J A Barcia. *Survival and differentiation of embryonic neural explants onto different biomaterials*. J Biomed Mater Res 79 A, 495-502 (2006)
21. J M Soria, C Martínez Ramos, O Bahamonde, D M García Cruz, M. Salmerón Sánchez, C Casas, M Guzmán , X Navarro, J L Gómez Ribelles, J M García Verdugo, M Monleón Pradas, J A Barcia. *Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability*. J Biomed Mater Res 83 A, 463-470 (2007)
22. C Martínez-Ramos, S Lainez, F Sancho-Bielsa, A García Esparza, R Planells-Cases, J M García Verdugo, J L Gómez Ribelles, M Salmerón Sánchez, M Monleón Pradas, J A Barcia, J M Soria. *Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on polymeric substrates*. Tissue Engineering 14, 1365-1375 (2008)
23. Jose Miguel Soria, María Sancho-Tello, M Angeles Garcia Esparza, Vicente Mirabet, Jose Vicente Bagan, Manuel Monleón, Carmen Carda. *Biomaterials coated by dental pulp cells as substrate for neural stem cell differentiation*. J Biomed Mater Res Part A 97 A, 85-92 (2011)
24. J C Rodríguez Hernández, M Salmerón Sánchez, J M Soria, J L Gómez Ribelles, M Monleón Pradas. *Substrate chemistry-dependent conformations of single laminin molecules on polymer surfaces are revealed by the phase signal of atomic force microscopy*. Biophysical Journal 93, 202-207 (2007)

25. P Rico, J C Rodríguez Hernández, D Moratal, M Monleón Pradas, M Salmerón Sánchez. *Substrate-induced assembly of fibronectin into networks. Influence of surface chemistry and effect on osteoblast adhesion.* Tissue Engineering15, 3271-3281 (2009)
26. D Gugutkov, G Altankov, J C Rodríguez Hernández, M Monleón Pradas, M Salmerón Sánchez. *Fibronectin activity on substrates with controlled -OH density.* J Biomed Mater Res A 92, 322-331 (2010)
27. A J Campillo Fernández, A A Arredondo Zamudio, G Gallego Ferrer, M Monleón Pradas, M C Carda Batalla. *Polymeric scaffolds for guided dentine regeneration.* Int J Artif Organs 28, 362 (2005)
28. R. Brígido Diego, M. Pérez Olmedilla, A. Serrano Aroca, J. L. Gómez Ribelles, M. Monleón Pradas, G. Gallego Ferrer, M. Salmerón Sánchez. *Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering.* J. Mater. Sci.: Mater. in Medicine 16, 693-698 (2005)
29. J. Más Estellés, I. Krakovsky, J. C. Rodríguez Hernández, A. M. Piotrowska, M. Monleón Pradas, *Mechanical properties of porous crosslinked poly(ethyl-acrylate) for tissue engineering, 2007.*
30. A J Campillo-Fernández, S Pastor, M Abad-Collado, L Bataille, J L Gómez Ribelles, J M Meseguer Dueñas, M Monleón Pradas, A Artola, J L Alió, J M Ruíz Moreno. *Future design of a new keratoprosthesis. Physical and biological analysis of polymeric substrates for epithelial cell growth.* Biomacromolecules 8, 2429-2436 (2007)
31. J C Rodríguez Hernández, A Serrano Aroca, J L Gómez Ribelles, M Monleón Pradas. *Three-dimensional nanocomposite scaffolds with ordered cylindrical orthogonal pores.* J Biomed Mater Res B: Appl Biomaterials 84 B, 541-549 (2008)
32. A J Campillo-Fernández, R E Unger, K Peters, S Halstenberg, M Santos, M Salmerón Sánchez, J M Meseguer Dueñas, M Monleón Pradas, J L Gómez Ribelles, C J Kirkpatrick. *Analysis of the biological response of endothelial and fibroblast cells cultured on synthetic scaffolds with various hydrophilic/hydrophobic ratios. Influence of fibronectin adsorption and conformation.* Tissue Engineering15, 1331-1341 (2009)
33. A Vallés-Lluch , M Arnal-Pastor, M Keicher, M Monleón Pradas. *Constrained swelling of hyaluronan hydrogel in the pores of an elastomeric scaffold.* J Colloid Interface Sci 361, 361-369 (2011)
34. A Vallés Lluch, G Gallego Ferrer, A Campillo Fernández, M Monleón Pradas. *Bioactive scaffolds mimicking natural dentin structure.* J Biomed Mater Res B: Appl Biomaterials 90, 182-194 (2009)
35. A Vallés, E Novella, M Sancho, G Gallego, M Monleón, C Carda. *Bioactive nanohybrid scaffolds mimicking natural dentin xenotransplanted in immunodeficient mice.* Pp 213-217 de: R M Natal Jorge, S M Santos, J M Tavares (eds), Biodental engineering. CRC Press-Taylor & Francis, London 2010. ISBN 978-0-415-57394-8
36. A Vallés Lluch, E Novella Maestre, M Sancho Tello, M Monleón Pradas, G Gallego Ferrer, C Carda Batalla. *Mimicking natural dentin using bioactive nanohybrid scaffolds for dentinal tissue engineering.* Tissue Engineering 16, 2783-2793 (2010)
37. Kempermann, Gerd. *Adult Neurogenesis.* Oxford University Press, 2006, p. 66-78.
38. So K-F, Aguayo AJ (1985) *Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats.* Brain Res. 328, 349-354.

39. Plant GW, Harvey AR, Chirila TV (1995) *Axonal growth within poly (2-hydroxyethyl methacrylate) sponges infiltrated with Schwann cells and implanted into the lesioned rat optic tract*. Brain Res. 671, 119–130.
40. Berry M, Carlile J, Hunter A (1996) *Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve*. J. Neurocytol. 25, 147–170.
41. Negishi H, Dezawa M, Oshitari T, Adachi-Usami E (2001) *Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat*. Brain Res. Bull. 55, 409–419.
42. Claudia Verderio, Fabio Bianco, Marie Pierre Blanchard, Matteo Bergami, Marco Canossa, Eric Scarfone, and Michela Matteoli, *Cross talk between vestibular neurons and Schwann cells mediates BDNF release and neuronal regeneration*. Brain Cell Biology (Impact Factor: 3.25). 07/2006; 35(2-3):187-201.
43. Bensadoun, J., Almeida, L., Fine, E.G., Tseng, L., Deglon, N., Aebischer, P., 2003. *Comparative study of GDNF delivery systems for the CNS: polymer rods, encapsulated cells, and lentiviral vectors*. J. Control. Release 87 (1-3), 107-115.
44. Kishima, H., Poyot, T., Bloch, J., 2004. *Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons*. Neurobiol. Dis. 16 (2), 428-439.
45. McArthur, J.C., 2004. HIV dementia: an evolving disease. J. Neuroimmunol. 157, 3-10.
46. Menei, P., Montero-Menei, C., Venier, M.C., Benoit, J.P., 2005. *Drug delivery into the brain using poly(lactide-co-glycolide) microspheres*. Expert Opin. Drug Deliv. 2, 363-376.
47. Flachenecker, P., 2006. *Epidemiology of neuro-immunological diseases*. J. Neurol. 253, 2-8.
48. Kabanov, A.V., Gendelman, H.E., 2007. *Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders*. Prog. Polym. Sci. 32 (8-9), 1054-1082.
49. Pollak, P., Fraix, V., Krack, P., et al., 2002. *Treatment results: Parkinson's disease*. Mov. Disord. 17, 75-83.
50. Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., et al., 2001. *Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease*. N. Engl. J. Med. 344, 710-719.
51. William, G.J., 2000. *Late-onset neurodegenerative diseases-the role of protein insolubility*. J. Anat. 196 (4), 609-616.
52. Dickson, D.W., 2002. *Misfolded, protease-resistant proteins in animal models and human neurodegenerative disease*. J. Clin. Invest. 110 (10), 1403-1405.
53. Woodruff, B.K., Graff-Radford, N.R., Ferman, T.J., 2006. *Family history of dementia is a risk factor for Lewy body disease*. Neurology 66 (12), 1949-1950.
54. Jain M, Armstrong RJ, Elneil S, Barker RA. *Transplanted human neural precursor cells migrate widely but show no lesion-specific tropism in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease*. Cell Transplant 2006;15(7):579–93.
55. Ma W, Fitzgerald W, Liu QY, O'Shaughnessy TJ, Maric D, Lin HJ, Alkon DL, Barker JL. *CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in 3-dimensional collagen gels*. Experimental Neurology 2004; 190:276-288
56. Rothstein JD, Snyder EY. *Reality and Immortality-neural stem cells for therapies*. Nature Biotechnology 2004; 22:283-285

57. Hayman MW, Smith KH, Cameron NR, Przyborski SA. *Growth of human stem cell-derived neurons on solid three dimensional polymers*. J. Biochemical and Biophys. Methods. 2005; 62:231-240
58. Lietz M, Dreesmann L, Hoss M, Oberhoffner S, Schlosshauer B. *Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types*. Biomaterials 2006; 27:1425-1436.
59. Woerly S, Plant GW, Harvey AR. *Neural tissue engineering: from polymer to biohybrid organs*. Biomaterials 1996; 17:301-310.
60. Ashok K. Shetty, Dennis A. Turner. *Neurite Outgrowth from Progeny of Epidermal Growth Factor-Responsive Hippocampal Stem Cells Is Significantly Less Robust Than from Fetal Hippocampal Cells following Grafting onto Organotypic Hippocampal Slice Cultures: Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor*. Journal of Neurobiology vol. 38 issue 3 15 February 1999. p. 391 - 413
61. TF Franke, *Akt signaling in animal physiology and human disease*. Oncogene (2008) 27, 6473–6488.
62. Cristina Martínez-Ramos, Ana Vallés Lluch, José Manuel García Verdugo, José Luis Gómez Ribelles, Juan Antonio Barcia, Amparo Baiget Orts, José Miguel Soria López, Manuel Monleón Pradas. *Channeled “scaffolds” implanted in adult rat brain*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012; 100A (12): 3276
63. Tessa Hadlock, Cathryn Sundback, Daniel Hunter, Mack Cheney, and Joseph P. Vacanti. *A Polymer Foam Conduit Seeded with Schwann Cells Promotes Guided Peripheral Nerve Regeneration*. Tissue Engineering. April 2000, 6(2): 119-127.
64. Osanai T, Kuroda S, Yasuda H, Chiba Y, Maruichi K, Hokari M, Sugiyama T, Shichinohe H, Iwasaki Y. *Noninvasive transplantation of bone marrow stromal cells for ischemic stroke: Preliminary study with a thermoreversible gelation polymer hydrogel*. Neurosurgery 2010;66:1140.
65. Walker PA, Aroom KR, Jimenez F, Shah SK, Harting MT, Gill BS, Cox CS, Jr. *Advances in progenitor cell therapy using “scaffold”ing constructs for central nervous system injury*. Stem Cell Rev 2009;5:283.
66. Junmin Lee, Amr A. Abdeen, Douglas Zhang, Kristopher A. Kilian, *Directing stem cell fate on hydrogel substrates by controlling cell*, Biomaterials 34 (2013) 8140e8148.
67. geometry, matrix mechanics and adhesion ligand composition
68. S P Frostick, Q Yin, G J Kemp, *Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration*. Microsurgery (Impact Factor: 1.62). 02/1998; 18(7):397-405.
69. Laurent Plawinski, and Eduardo Anglés-Cano, *Membrane microvesicles: a circulating source for fibrinolysis, new antithrombotic messengers*. Haematologica 2013; 98:e75

## **10 ANEXOS**

### **10.1 Anexo 1**

#### **10.1.1 Cultivo de precursores neurales**

1. Todo debe realizarse bajo cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las células criopreservadas se descongelaron en un baño a 37°C por un tiempo aproximado de 2 min, el contenido fue vertido en un tubo cónico de 15ml conteniendo 9ml de medio y se centrifugó a 200g por 2 min.
2. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 5 ml de medio de cultivo completo (Anexo 2) y vertido en una placa Petri y se añadieron 5ml más de medio.
3. Los precursores neurales crecen en suspensión, por lo tanto para inducir adherencia, es necesario modificar el medio de cultivo y acondicionar el sustrato, para lo cual se realiza el siguiente procedimiento:

El cultivo se transfirió a un tubo cónico de 15 ml, se centrifugó a 200g por 2 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1ml de una enzima para disgregar los agregados (Acutase, StemPro) que se incubó por 10 min, después se añadieron 9 ml de medio y se centrifugó 200g a 5min, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en 1ml de medio para cuantificar.

### **10.2 Anexo 2**

#### **10.2.1 Cultivo de células de Schwann**

1. Las células criopreservadas se descongelaron en un baño a 37°C por un tiempo aproximado de 5 min, el contenido fue vertido en un tubo cónico de 15ml conteniendo 9ml de medio de células de Schwann y se centrifugó a 200g por 5 min.
2. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 5 ml de medio de cultivo (Anexo 4) y vertido en un frasco de cultivo y se añadieron 5ml más de medio.
3. Para subcultivar las células, se eliminó el medio del frasco de cultivo y se lavó cuidadosamente con 0.1MDPBS dos veces. Posteriormente se añadieron 3ml de 0.5%tripsina/EDTA, se incubó 3 min a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 6ml de medio de cultivo. La suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 15ml y se centrifugó a 200g por 5min, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1ml de medio para cuantificar.

### 10.3 Anexo 3

#### 10.3.1 Medio control

<b>COMPOSICION</b>	<b>V<sub>F</sub>=250ml</b>
<b>DMEM-F12 1X</b>	207.5ml
<b>Glucosa 30%</b>	5ml
<b>NaHCO<sub>3</sub> 7.5%</b>	3.75ml
<b>HEPES 1M</b>	1.25ml
<b>L-Glutamina 100X</b>	2.5ml
<b>Hormone mix 10X</b>	25ml
<b>Antibiotico P-E</b>	5ml

#### 10.3.2 Hormone mix

	<b>V<sub>F</sub>=250ml</b>
<b>DMEM/F12 1X</b>	170ml
<b>Glucosa 30%</b>	4ml
<b>NaHCO<sub>3</sub> 7.5%</b>	3ml
<b>HEPES 1M</b>	1ml
<b>Apo-t-transferrina</b>	200mg
<b>Insulina Solution</b> 100mg insulina 4ml HCl 0.1M 36ml H <sub>2</sub> O Milli-Q	20ml
<b>Putrescina Solution</b> 38.6mg putrescina 40ml H <sub>2</sub> O Milli-Q	20ml
<b>Progesterona 2mM</b>	20μl
<b>Sodioselenite 3mM</b>	20μl

**10.3.3 Medio completo de crecimiento**

	<b>V<sub>F</sub>=50ml</b>
<b>MEDIO CONTROL</b>	49.810µl
<b>Heparina 0,2%</b>	100µl
<b>BSA 30%</b>	60µl
<b>FGF 10ng/ml</b> (stock 25µg/ml)	20µl
<b>EGF 20ng/ml</b> (stock 100µg/ml)	10µl

**10.3.4 Medio de diferenciación**

	<b>V<sub>F</sub>=50ml</b>
<b>MEDIO CONTROL</b>	49400 µl
<b>Heparina 0,2%</b>	10 µl
<b>FBS 2%</b>	500 µl
<b>BDNF (20ng/ml)</b>	200 µl
<b>FGF</b>	20 µl

## 10.4 Anexo 4

### 10.4.1 Composición del medio de cultivo de células de Schwann, SCM

SMC consta de 500 ml de medio basal, 25 ml de suero bovino fetal (FBS, Cat.No.0025), 5 ml de suplemento de crecimiento de células de Schwann (SCGS, Cat.No.1752) y 5 ml de solución de penicilina / estreptomicina (P / S, Cat.No.0503).

## 10.5 Anexo 5

### 10.5.1 Fundamento de la técnica MTS:

Éste es un método colorimétrico para evaluar la viabilidad de células en proliferación o en ensayos de exposición a químicos. El MTS es una es una sal de tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), la cual es reducida en por las células en un producto de formazán que es soluble en el medio de cultivo, y se analiza en un lector de placas a una longitud de onda de 490nm. En esta técnica se emplea una sal metabólicamente activa que se reduce en la mitocondria, dando lugar a la formación de cristales que al diluirse adquieren cierta coloración. Estos cristales solo se forman cuando las células están metabólicamente activas, lo cual implica que estén vivas

## 10.6 Anexo 6

### 10.6.1 NPER:

Para llevar a cabo la extracción de proteínas se utilizó el N-PER, reactivo para la extracción de proteínas neuronales. Este reactivo está optimizado para extraer proteínas y células neuronales del tejido neurológico. Además, este reactivo no contiene proteasas ni inhibidores de fosfatasa. Cuidadosamente se decantó el medio de cultivo de las células, se cogió un cantidad de precursores neurales equivalente a 200µL, se llevó a cabo un lavado con PBS++ 1x, para evitar la desintegración de las esferas, y se añadieron 200µL del buffer de extracción N-PER por cada muestra. Las esferas se resuspendieron vigorosamente con este buffer para desintegrar las esferas de alginato y lisar las células. Incubando en hielo durante 5 minutos seguidamente. Las muestras se centrifugan a 12000rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo para llevar a cabo la cuantificación, congelándose a -80°C hasta su uso.

## 10.7 Anexo 7

### 10.7.1 BCA:

Para realizar la cuantificación de proteínas se recurrió a la técnica de BCA. Método colorimétrico para la detección y cuantificación de proteínas, compatible con detergentes mediante ácido bicinconínico (BCA), basado en la reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ , por las proteínas en medio alcalino (reacción de biuret), con una alta sensibilidad y selectividad colorimétrica para la detección de cationes cuprosos ( $\text{Cu}^{+1}$ ) empleando un reactivo que contiene Ácido bicinconínico. El color morado de la reacción se produce por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion de Cu. Este complejo soluble en agua presenta una absorbancia a 562nm y tiene una relación proporcional con el incremento de la concentración de proteínas en un rango que va desde 20-2000ug/mL. Además, debido a que la reacción de coloración no se detiene este método no es definitivo. Sin embargo debido a que el proceso es lento, es posible medir muchas muestras a la vez. Para realizar la curva patrón se prepararon una serie de diluciones de albúmina y se preparó la solución de trabajo siguiendo las siguientes proporciones: 25 partes de la solución MA con 24 partes de la solución MB, con 1 parte de la solución MC (25:24:1, solución MA:MB:MC). El procedimiento para llevar a cabo la cuantificación fue el siguiente: Se pipetearon 10 $\mu$ l de cada estándar o muestra por cada pocillo, se añadieron 200 $\mu$ l de la solución de trabajo a cada pocillo y se agitó la placa durante 30 segundos. Finalmente, se cubrió la placa y se incubó a 37°C durante 30 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562nm.

Los resultados se leyeron con el equipo lector de placas "VICTOR<sup>3</sup>, 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer precisely".

## 10.8 Anexo 8

### 10.8.1 Reconstrucción tridimensional del EA2 control, sin células de Schwann

Archivo adjunto vídeo 1.

### 10.8.2 Reconstrucción tridimensional del EA2 con el cocultivo de células de Schwann

Archivo adjunto vídeo 2.