



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Generación de entornos celulares con iones  
bioactivos de zinc y su efecto sobre la  
diferenciación neural.**

CURSO ACADÉMICO 2015-2016

**Alumno/a:** Maria Teresa Guillot Ferriols

**Tutor/a:** Prof. Gloria Gallego Ferrer

**Co-tutor/a:** Prof. Roser Sabater i Serra

**Tutor colaborador:** Hayk Mnatsakanyan Movsesyan

València, Julio de 2016





## Datos personales

**Nombre y apellidos:** Maria Teresa Guillot Ferriols

## Datos del trabajo de fin de grado

**Título:** Generación de entornos celulares con iones bioactivos de zinc y su efecto sobre la diferenciación neural.

**Tutor/a Académico:** Prof. Gloria Gallego Ferrer

**Cotutor/a:** Prof. Roser Sabater i Serra

**Cotutor/a colaborador:** D. Hayk Mnatsakanyan Movsesyan

**Localidad y fecha:** Valencia, Julio 2016

**Tipo de licencia:** Creative commons: *Atribución-NoComercial-SinDerivadas(CC BY-NC-ND)*

## Resumen

El zinc desempeña un papel esencial en el organismo. Es un elemento estructural de un gran número de enzimas y factores de transcripción, capaz de actuar como mensajero secundario y tiene una gran importancia en el sistema nervioso central, ya que actúa como neurotransmisor.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de este ion divalente sobre la diferenciación de precursores neurales obtenidos a partir de células madre embrionarias de ratón. Para la obtención de los precursores neurales, se han evaluado tres protocolos basados en la suplementación del medio de cultivo con ácido retinoico. La adición de una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico en el medio durante 8 días ha resultado ser el protocolo óptimo. Para testar el efecto del zinc sobre los precursores neurales se ha comprobado que concentraciones iguales o superiores a 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  resultan tóxicas para este tipo celular, por lo que se han empleado las concentraciones 10 y 20  $\mu\text{M}$  para evaluar el efecto del ion sobre la diferenciación neural. Se ha comprobado que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células GFAP y  $\beta\text{III}$ -tubulina positivas entre la condición control que contenía únicamente medio de diferenciación neural y dicho medio de diferenciación suplementado con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ . Sin embargo, la concentración 20  $\mu\text{M}$  del ion reduce el número de células GFAP positivas, incrementando el ratio entre células GFAP y  $\beta\text{III}$ -tubulina positivas.

En paralelo al estudio anterior, se han preparado soportes biodegradables basados en ácido poliláctico (PLLA) para la liberación controlada de iones zinc en entornos celulares para aplicaciones de regeneración neural. Los soportes se han preparado utilizando la metodología "solvent casting" a partir de una emulsión de PLLA disuelto en cloroformo y cloruro de zinc disuelto en agua miliQ. Los films obtenidos no son homogéneos ya que la emulsión no es totalmente estable. Esto dificulta la predicción del comportamiento del material a la hora de la liberación, por lo que será necesario la utilización de técnicas alternativas para su preparación.

## Palabras clave

Células madre embrionarias, precursores neurales, zinc, diferenciación neural, ácido poli-L-láctico



## Title

Cellular environments with bioactive zinc ions and their effect on neural differentiation

## Abstract

Zinc is essential in the organism. It is a structural element of a large number of enzymes and transcription factors, it is able to act as a second messenger and plays an important role in the central nervous system, acting as a neurotransmitter.

In the present work we have studied the effect of this divalent ion on the differentiation of neural precursors obtained from mice embryonic stem cells. We have tested three protocols to obtain neural precursors, based on the supplementation of the culture medium with retinoic acid. The addition of 0,5  $\mu\text{M}$  of retinoic acid in the medium during 8 days has proved to be the optimum protocol. To demonstrate zinc effect on this neural precursors, we have proved that concentrations of 40  $\mu\text{M}$  of  $\text{Zn}^{2+}$  or higher are toxic for this cellular type; thus we have employed concentrations of 10 and 20  $\mu\text{M}$  to evaluate its effect in neural differentiation. There are no significant statistic differences in the number of GFAP and  $\beta$ III-tubulin positive cells between the control condition, which only contains neural differentiation medium, and medium supplemented with 10  $\mu\text{M}$  of  $\text{Zn}^{2+}$ . Nevertheless, 20  $\mu\text{M}$  of zinc concentration reduces the number of GFAP positive cells, increasing the ratio between GFAP and  $\beta$ III-tubulin positive cells.

In parallel with the previous study, we have prepared biodegradable 2D substrates based on poly lactic acid (PLLA) for the controlled release of zinc ions. These substrates have been obtained by solvent casting method, by an emulsion of PLLA/chloroform and  $\text{ZnCl}_2$ /miliQ water. The films obtained are not homogeneous due to the instability of the emulsion. This phenomenon hinders the prediction of the materials as a release vehicle. It will be necessary the use of alternative techniques for their preparation.

## Key words

Embryonic stem cells, neural precursors, zinc, neural differentiation, poly-L-lactid acid

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Gloria y a Roser por dejarme formar parte de este proyecto y haber podido realizar mi trabajo de fin de grado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular. También por vuestro tiempo, vuestra dedicación y vuestra ayuda siempre que lo he necesitado.

Dar las gracias a Hayk, por enseñarme todo lo que necesitaba saber para trabajar en un laboratorio y por su paciencia cuando no encontraba nada durante los primeros meses. Gracias por tu optimismo y por darme ánimos cada vez que pensaba que algo no iba a salir o que no llegaba a tiempo, pero sobre todo por descubrirme el mundo de la investigación y la satisfacción cuando se obtienen resultados.

A Keila, por tu ayuda desinteresada con la microscopía y por responder todas y cada una de las preguntas que se me han ido ocurriendo durante los últimos dos meses.

En general a toda la gente del CBIT, por el buen ambiente de trabajo, por la cercanía y los buenos momentos que hemos pasado. En especial a Sandra, por compartir estos últimos meses y evitar que nos entrara la desesperación en algunos momentos.

Al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universitat Politècnica de València por su atención en la preparación de muestras y en el manejo de equipos.

Agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) el apoyo financiero a través del proyecto MAT2015-69315-C3-1-R que ha permitido realizar este trabajo.

A mis amigos, con los que he compartido este camino durante los últimos cuatro años, por vuestro apoyo incondicional, por aguantar mis quejas y mis agobios. Aunque esta carrera nos haya dado limones, habéis hecho de este tiempo un recuerdo especial que conservaré siempre. También a los de siempre, por estar conmigo y ser un apoyo fundamental.

Por último, dar las gracias a mi familia, por respaldarme en todas las decisiones que he tomado, por su paciencia infinita durante estos años, y por estar siempre a mi lado pase lo que pase. Gracias.

Gracias a todos

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Regeneración neural.....	1
1.1.1. Biomateriales empleados en regeneración neural .....	2
1.1.2. Ácido poliláctico .....	3
1.2. El Papel del zinc en el organismo .....	4
1.2.1. El zinc como mensajero secundario .....	4
1.2.2. El zinc como neurotransmisor.....	8
2. OBJETIVOS .....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. CULTIVOS CELULARES .....	11
3.1.1. Obtención de precursores neurales mediante cuerpos embrioides .....	11
3.1.2. Inmunocitoquímica de cuerpos embrioides en suspensión.....	12
3.1.3. Siembra de precursores neurales en adhesión .....	13
3.1.4. Ensayo de citotoxicidad.....	14
3.1.5. Inmunocitoquímica precursores neurales sembrados en adhesión .....	15
3.2. SÍNTESIS DE LOS FILMS .....	16
3.2.1. Disolución de PLLA/Cloroformo .....	16
3.2.2. Disolución de ZnCl <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O mQ.....	16
3.2.3. Emulsión PLLA/ZnCl <sub>2</sub> mediante Ultra-turrax® .....	17
3.2.4. Preparación de los films .....	17
3.3. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL .....	17
3.3.1 Caracterización morfológica .....	17
3.3.2 Análisis termogravimétrico.....	17
3.4 ENSAYO DE LIBERACIÓN .....	18
3.4.1 Preparación del ensayo .....	18
3.4.2 Análisis de la liberación .....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
4.1 Obtención de precursores neurales.....	20
4.2 Determinación de las concentraciones citotóxicas de zinc.....	22
4.3 Determinación del porcentaje de diferenciación de los precursores neurales .....	24
4.4 Caracterización morfológica del material .....	29
4.5 Análisis termogravimétrico .....	30
4.6 Ensayo de liberación. Perfil de liberación del material.....	31
5. CONCLUSIONES .....	35
6. BIBLIOGRAFÍA .....	36
7. ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la polimerización mediante apertura del anillo de lactida .....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema de la relación entre el aporte externo de zinc y la fosforilación del transportador ZIP7 mediante CK2.....	6
<b>Figura 3.</b> Esquema de la transducción al núcleo del factor de transcripción Snail mediante la activación de la cascada de señalización STAT-ZIP6 .....	6
<b>Figura 4.</b> Esquema que muestra la estimulación del receptor FcεR1, que produce la liberación de la ola de zinc dependiente de Ca <sup>2+</sup> y MAP kinasas .....	7
<b>Figura 5.</b> Transporte del zinc sináptico .....	8
<b>Figura 6.</b> Espectro de absorbancia del zincon libre (rojo) y del zincon unido a zinc (negro) en 50 mM de buffer borato (pH 9) a 20°C .....	19
<b>Figura 7.</b> Imágenes de microscopía óptica en campo claro a 10X de esferoides en suspensión tras 8 días de cultivo en medio de cultivo E.DMEM + 0,5 μM de ácido retinoico .....	20
<b>Figura 8.</b> Imagen de microscopía de fluorescencia de los esferoides tras 8 días de cultivo en suspensión en medio E.DMEM + 0,5 μM de ácido retinoico.....	21
<b>Figura 9.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en adhesión tras 1, 3 y 7 días de cultivo con diferentes concentraciones de zinc .....	22
<b>Figura 10.</b> Ensayo de citotoxicidad del zinc.....	23
<b>Figura 11.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en condiciones de diferenciación tras 8 días de cultivo, marcaje con βIII-tubulina .....	24
<b>Figura 12.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en condiciones de diferenciación tras 8 días de cultivo, marcaje con GFAP .....	25
<b>Figura 13.</b> Representación gráfica del porcentaje de células que expresan los marcadores βIII-tubulina y GFAP tras someter los precursores neurales a un cultivo de diferenciación en medio de diferenciación neural sin zinc (control) o con concentraciones no citotóxicas de zinc (10 μM y 20 μM) durante 8 días.....	26
<b>Figura 14.</b> Imagen de microscopía óptica en campo claro a 10X de precursores neurales sembrados en adhesión tras 7 días de cultivo en medio de diferenciación neural sin zinc. ....	27
<b>Figura 15.</b> Imagen de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en adhesión tras 8 días de cultivo con medio de diferenciación neural, marcaje con S100β. ....	28
<b>Figura 16.</b> Imagen de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en adhesión tras 8 días de cultivo con medio de diferenciación neural, marcaje con nestina. ....	28

<b>Figura 17.</b> Imágenes macroscópicas de los films de PLLA producidos mediante emulsión de disolución acuosa de sal de zinc a distintas concentraciones (1X, 10X y 50X) y posterior solvent casting.....	29
<b>Figura 18.</b> Imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de los films preparados con la disolución 10X de cloruro de zinc .....	30
<b>Figura 19.</b> Representación gráfica del porcentaje de masa residual (%) frente a la temperatura (°C) obtenida en el análisis termogravimétrico. ....	31
<b>Figura 20.</b> Representación gráfica de la liberación de zinc tras 2,5 horas de inmersión (simulación de los recubrimientos al material previos al cultivo, 2 horas de coating de poli-D-lisina seguido de media hora de coating de laminina) .....	32
<b>Figura 21.</b> Representación gráfica de la liberación de zinc a 2 h, 4 h y 1 día de inmersión. ....	33
<b>Figura 22.</b> Representación gráfica de la liberación de zinc a 1, 3 y 8 días de inmersión.....	33
<b>Figura 23.</b> Representación gráfica de la liberación de zinc acumulativa de las zonas opacas durante los 8 días de la simulación del cultivo. ....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades de las tres formas estereoquímicas del ácido poliláctico .....	3
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos y diluciones empleados en la inmunocitoquímica de los cuerpos embrioides en suspensión. ....	12
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos y diluciones empleados en la inmunocitoquímica de los precursores neurales sembrados en adhesión.....	15

## **ABREVIATURAS**

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CK2:** casein-kinasa 2

**DMEM:** dulbecco's modified eagle medium

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DPBS:** dulbecco's phosphate buffer saline

**EMT:** transición epitelio-mesenquimal

**ESC:** células madre embrionarias

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial

**iPSC:** células madre pluripotentes inducidas

**MSC:** células madre mesenquimales

**NBL:** neurosphere like bodies

**NO:** óxido nítrico

**NSC:** células madre neurales

**PDLA:** ácido poli-D-láctico

**PDLLA:** ácido poli-DL-láctico

**PGA:** ácido poliglicólico

**PLA:** ácido poliláctico

**PLGA:** ácido poli(láctico-co-glicólico)

**PLLA:** ácido poli-L-láctico

**RE:** retículo endoplasmático

**RNA:** ácido ribonucleico

**ROP:** polimerización por apertura del anillo

**SFD:** medio de diferenciación libre de suero

**SNC:** sistema nervioso central

**TGA:** análisis termogravimétrico



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Regeneración neural

El sistema nervioso central (SNC) tiene una habilidad de regeneración intrínseca muy restringida frente al daño y las enfermedades. Algunas de estas enfermedades, como el Parkinson o el Alzheimer se caracterizan por la pérdida o el daño neuronal, que lleva a una disfunción cognitiva, locomotora y sensorial. Este daño puede ser debido a la ausencia de factores de crecimiento axonales, factores de crecimiento locales y proteínas de la matriz extracelular. Además, la presencia de inhibidores de los factores de crecimiento también puede contribuir a esta pérdida (Fitch et al., 2008). Es difícil encontrar terapias exitosas debido a la complejidad del SNC y al microambiente inhóspito en la lesión y su entorno, que no lo hace muy apto para el trasplante celular (Tam et al., 2014).

Actualmente se encuentra ampliamente aceptada la existencia de precursores neurales o células madre neurales (NSCs) que pueden generar nuevas neuronas en múltiples áreas del sistema nervioso central de los mamíferos adultos, como el bulbo olfativo, el hipocampo o el área periventricular y el canal central de la médula espinal (Reynolds y Weiss, 1992). Bajo condiciones normales, las células precursoras se encuentran silenciadas. En condiciones de estrés o daño se activan, proliferan y se diferencian mayoritariamente en astrocitos positivos para el marcaje de proteínas ácidas fibrilares gliales (GFAP) que contribuyen a formar tejido cicatrizal, pero no forman apenas neuronas (Mothe et al., 2005; Barnabé-Heider F et al., 2010; Gage FH, 2000).

Las terapias celulares tienen como objetivo reemplazar o promover la supervivencia de las células dañadas, por ejemplo, las neuronas, o alterar el microambiente en el que se encuentran éstas para estimular la regeneración. Estas terapias incluyen el uso de células madre mesenquimales (MSCs) (Kode et al., 2009), progenitores neurales (NSCs) (Kokaia et al., 2012), células madre embrionarias (ESCs) (Lerou and Daley, 2005) y células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (Willerth, 2011).

Estos tipos celulares pueden ser trasplantados después de una lesión en el sistema nervioso central para sustituir los tejidos dañados o muertos en lo que se denominan terapias celulares. Este enfoque presenta un gran interés, pero presenta diversos problemas. Las células trasplantadas pueden migrar hacia otras regiones del cerebro no afectadas, por lo que es necesario inmovilizarlas en el lugar del daño. Por otro lado, su supervivencia y su actividad se deben mantener hasta que sean capaces de regenerar el tejido nervioso dañado. Por último, deben ser capaces de integrarse correctamente en el tejido donde han sido implantadas (Tam et al., 2014).

Aunque las células exógenas son inyectadas en el área dañada del sistema nervioso central junto con soluciones salinas o medio de cultivo, la agregación celular es casi inevitable, incluso antes de la inyección. Estos agregados celulares dificultan la actividad celular ya que cuando son introducidos son reconocidos por el sistema inmune y eliminados. Además de la presencia de las células del sistema inmune, la ausencia de factores de adhesión y de supervivencia dificultan la proliferación y supervivencia de las células inyectadas.

Como método alternativo a las terapias celulares, la liberación de moléculas bioactivas está siendo estudiada como una de las posibles estrategias terapéuticas para promover la regeneración tisular, lo que implica neurogénesis, plasticidad, regeneración axonal y neuroprotección. La principal desventaja que presentan este tipo de terapias es debida a la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica que limita la difusión de los fármacos o moléculas bioactivas usando los métodos de liberación tradicionales (Pardridge, 2012). Esta baja absorción hace necesarias altas dosis que permitan alcanzar concentraciones terapéuticas en el lugar del daño, lo que puede llevar a una citotoxicidad sistémica.

### **1.1.1. Biomateriales empleados en regeneración neural**

Las estrategias que combinan terapias celulares y el uso tanto de biomateriales como de moléculas bioactivas han adquirido especial relevancia en los últimos años. Este enfoque terapéutico es capaz de promover la supervivencia y la integración celular posteriores al trasplante y además permite la liberación localizada en el cerebro evitando la barrera hematoencefálica y los efectos secundarios sistémicos (Orive et al., 2009).

Los biomateriales pueden actuar como una matriz extracelular, actuando como vehículos de liberación de células, proporcionando apoyo para asegurar su retención y distribución en el sitio adecuado (andamios celulares), así como servir como plataformas de liberación de moléculas terapéuticas, como factores de crecimiento, proteínas o incluso iones terapéuticos. Además, la encapsulación de las células en microesferas puede ayudar a su protección frente al sistema inmune en el caso de células no autólogas y contra posibles moléculas dañinas que se encuentren en el microambiente celular.

Generalmente, estos biomateriales requieren cirugía para ser implantados, y según su grado de invasión pueden ser clasificados en scaffolds inyectables y scaffolds implantables, según Gao et al (2016).

#### **a) Biomateriales inyectables**

Los biomateriales inyectables son geles líquidos que una vez inyectados en el entorno fisiológico gelifican rápidamente debido a variaciones de temperatura, procesos de intercambio de iones o excitación de la luz (Jain et al., 2006; Piantino J et al., 2006). Algunos de ellos son el colágeno, la metilcelulosa o la agarosa.

Presentan diversas ventajas, ya que actúan como un material de soporte igual que un scaffold pero reduciendo la invasión del tejido al mínimo. Sin embargo, sus limitaciones respecto a la velocidad de formación del gel y sus pobres características mecánicas dificultan su aplicación (Ho et al., 2006).

#### **b) Scaffolds implantables**

Aquellos materiales porosos que necesitan ser preparados antes de su introducción en el área dañada son considerados como scaffolds implantables. Aunque su introducción en el organismo es más compleja que en el caso de los geles inyectables, ya que es necesaria una cirugía más invasiva para su implantación, los diversos métodos de obtención de estos andamios celulares han permitido que sus aplicaciones sean a su vez mucho más diversas.

Los scaffolds usados para la regeneración del sistema nervioso central incluyen hidrogel y scaffolds esponjosos no inyectables ricos en agua y que poseen múltiples poros que permiten la adhesión celular (Assunção-Silva et al., 2015). También se pueden encontrar scaffolds tubulares que tienen como objetivo reconstruir la trayectoria del crecimiento axonal y dirigir la regeneración neural (Li et al., 2009). Además, están adquiriendo gran importancia los nano-scaffolds, como los nanotubos o las nanofibras, que simulan la matriz extracelular y las estructuras tubulares como los microtúbulos, los axones o las dendritas. (Orive et al., 2009).

Entre los biomateriales más utilizados para el diseño de scaffolds implantables se encuentran los polímeros alifáticos  $\alpha$ -hidroxiácidos. Son un tipo de polímeros muy comúnmente usados en ingeniería tisular, ya que fueron los primeros materiales sintéticos biodegradables aprobados por la FDA para su uso *in vitro*. Los  $\alpha$ -hidroxiácidos más comunes son el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y sus copolímeros, ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA).

### 1.1.2. Ácido poliláctico

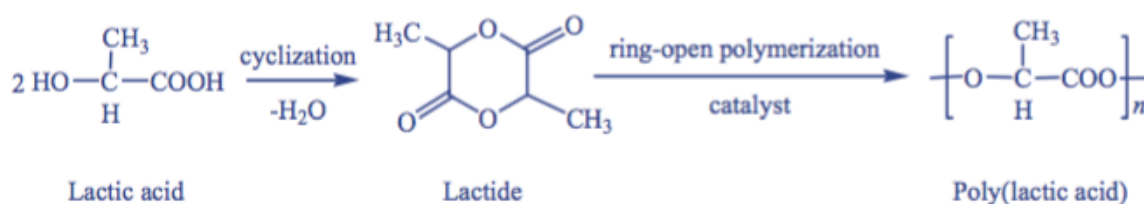
El ácido poliláctico (PLA) pertenece a la familia de los  $\alpha$ -hidroxiácidos, como ya se ha mencionado anteriormente. Este polímero se sintetiza a partir de la unión de monómeros de ácido láctico, un ácido orgánico de tres carbonos que presenta dos formas isoméricas ópticamente activas, el ácido L-láctico y el ácido D-láctico. La polimerización de una mezcla controlada de sus isómeros D y L permite modificar su estructura estereoquímica dando lugar a polímeros de elevado peso molecular que van desde niveles de organización amorfos hasta estructuras cristalinas (Garlotta, 2002). El PLA puede existir en tres formas estereoquímicas: poli (L-lactida) (PLLA), poli (D-lactida) (PDLA) y poli (DL-lactida) (PDLLA).

En la siguiente tabla se presentan algunas de las características de las tres formas estereoquímicas del PLA:

**Tabla 1.** Propiedades de las tres formas estereoquímicas del ácido poliláctico (Xiao et al., 2012).

Propiedades	PDLA	PLLA	PDLLA
<b>Solubilidad</b>	Todos son solubles en disolventes orgánicos como el benceno, el cloroformo o el dioxano. Son insolubles en etanol, metanol e hidrocarburos alifáticos		
<b>Estructura cristalina</b>	Cristalino	Semicristalino	Amorfo
<b>Temperatura de fusión (Tm)/°C</b>	180	180	Variable
<b>Temperatura de transición vítrea (Tg)/°C</b>	50-60	55-60	Variable
<b>Temperatura de descomposición/°C</b>	200	200	185-200
<b>Vida media a 37°C en solución salina</b>	4-6 meses	4-6 meses	2-3 meses

Las dos formas más importantes para sintetizar el ácido poliláctico son mediante policondensación directa o través de polimerización por apertura del anillo (ROP) de las lactidas. El modo de polimerización más comúnmente usado es ROP. Se basa en la ciclación de un monómero de ácido láctico y la eliminación del agua, lo que produce un dímero cíclico de ácido láctico denominado lactida. Posteriormente las lactidas son convertidas en PLA de alto peso molecular mediante la polimerización por apertura del anillo llevada a cabo por un catalizador. En la figura 1 se indica el esquema del proceso.



**Figura 1.** Esquema de la polimerización mediante apertura del anillo de lactida (Xiao et al., 2012).

Este polímero es un termoplástico biodegradable y biocompatible. Su naturaleza polimérica le aporta una gran flexibilidad en el diseño de scaffolds, ya que su estructura y composición pueden ser modificadas para adaptarse a necesidades específicas (Huang et al., 2007).

El PLA se degrada mediante la hidrólisis simple del enlace éster y no requiere la presencia de enzimas que catalicen este proceso (Garlotta, 2002). La tasa de degradación, que va desde los seis meses hasta los dos años, depende del tamaño y la forma del material, del ratio de los isómeros que lo conforman y de la temperatura de hidrólisis (Hartmann y Kaplan, 1998). Sus productos de degradación no son tóxicos, son fácilmente asimilados y excretados por el organismo, característica esencial que deben tener los polímeros empleados en el área de la ingeniería tisular.

Un papel importante que puede desarrollar este polímero en el campo de la ingeniería tisular es la liberación de moléculas bioactivas. Muchos tipos de partículas se han probado como vehículos de liberación para aplicaciones biomédicas, entre ellas destacan los liposomas, las nanopartículas sólidas lipídicas y los poliésteres biodegradables como el PLA o el PLGA (Torchilin, 2006). Debido a su excelente biocompatibilidad, biodegradación, sus propiedades mecánicas y su solubilidad en disolventes orgánicos, el PLA ha demostrado un gran potencial como herramienta de liberación en forma de microcapsulas, micropartículas o nanopartículas. Estas dos últimas están siendo ampliamente investigadas para la liberación controlada de fármacos, péptidos/proteínas e incluso RNA/DNA, debido a su pequeño tamaño que las hace permeables a las barreras biológicas, como la barrera hematoencefálica (Roney et al., 2005).

A pesar de que el uso de PLA para la liberación de iones no es tan común como su uso para la liberación de proteínas, se han realizado algunos ensayos. Fortunati et al. (2011) estudiaron la liberación de iones de plata, debido a su efecto antibacteriano, en un copolímero de ácido poliláctico/poliglicólico (PLGA). Asimismo, se han desarrollado scaffolds basados en composites PLA-vidrios bioactivos, donde se ha observado que la liberación de iones del vidrio bioactivo (Si, Ca, P y Zn, dependiendo de la composición del vidrio bioactivo) promueve la expresión de distintos genes en células osteoblásticas, estimula la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* o presenta efectos antiinflamatorios (Hoppe et al., 2011).

## **1.2. El Papel del zinc en el organismo**

### **1.2.1. El zinc como mensajero secundario**

El zinc es un oligoelemento esencial en gran parte de los sistemas biológicos (Bettger y O'Dell, 1981; Golden, 1989). Tiene un papel estructural, regulador y catalítico en la biología celular (Bettger y O'Dell, 1981). Es un ion pequeño (0,65 Å) y se une preferentemente al nitrógeno y al azufre, pero intercambia ligandos fácilmente debido a su baja energía de estabilización de campos de ligandos (Williams, 1989). Debido a ello, es fácilmente intercambiable entre los distintos compartimentos celulares.

Entre un 30 y 40% del zinc celular se encuentra en el núcleo, el 50% está presente en el citosol y en los orgánulos citosólicos, especialmente el retículo endoplasmático, y el resto asociado con las membranas celulares (Vallee and Falchuk, 1993). La mayoría de este zinc se encuentra asociado a proteínas o unido a aniones, por lo que el nivel de zinc libre intracelular es muy bajo. Algunos autores han estimado, mediante las constantes de inhibición enzimáticas, que la inhibición de los enzimas cruciales mediante zinc comienza a ser significativa con  $Zn^{2+}$  alrededor de  $10^{-8}$  M, por lo tanto su concentración se encuentra en este orden de magnitud (Maret et al., 1999).

A nivel molecular este elemento es un constituyente estructural de un gran número de proteínas, incluyendo enzimas que pertenecen a vías de señalización y factores de transcripción. Este ion es esencial para la actividad de más de 300 enzimas (Vallee y Auld, 1993; Prasad, 1995) y más de 2000

factores de transcripción implicados en la regulación génica, que necesitan la presencia del zinc para mantener su integridad estructural y unirse al DNA (Brown et al., 2005). Diversos motivos de unión del DNA a proteínas han sido identificados y caracterizados como dedos y clusters de zinc (Vallee et al., 1991). Su importancia se ve reflejada en el gran número de genes que codifican para motivos de unión al zinc, alrededor de un diez por ciento de su totalidad (Andreini et al., 2006).

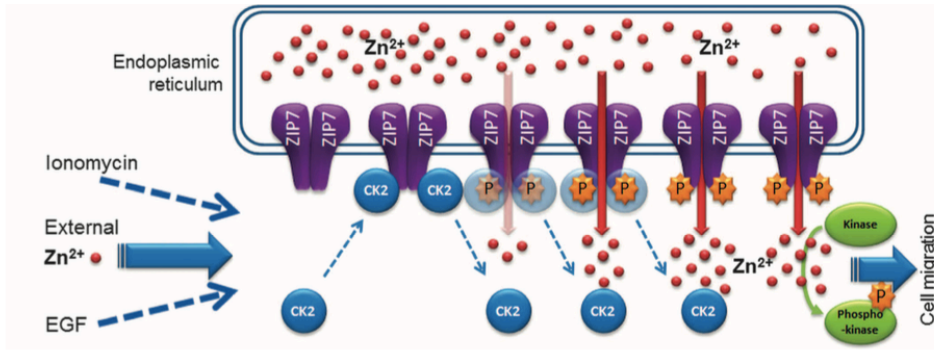
Su importante papel en el crecimiento y la proliferación celular fue descubierto mediante experimentos que ponían de manifiesto el retraso del crecimiento causado por una deficiencia de zinc en todos los organismos investigados (Vallee and Falchuk, 1993). El crecimiento y la diferenciación celular eucariota se induce generalmente mediante hormonas o factores de crecimiento que desencadenan cascadas de señalización intracelulares. Esto incluye receptores hormonales, mensajeros secundarios intracelulares, cascadas de kinasas, fosfatasa y factores de transcripción unidos a promotores de genes específicos. El zinc está involucrado en todos los niveles del proceso de señalización celular, ya sea como un elemento estructural, como un factor regulador o en ambos casos. Por lo tanto, el zinc es un elemento esencial para el funcionamiento de las vías de señalización en células eucariotas.

Actualmente se conoce un número limitado de mensajeros secundarios, entre los cuales se encuentran  $Ca^{2+}$ , cAMP, óxido nítrico (NO) o las kinasas. Sin embargo, diversos autores hipotetizan que el zinc puede actuar como las moléculas mencionadas, es decir, como un mensajero secundario (Yamasaki et al., 2007). Su gran importancia celular hace indispensable una correcta regulación de su concentración mediante transportadores de Zn y moléculas de unión al zinc.

El zinc es incapaz de difundir a través de las membranas, por lo que existen dos familias de transportadores de zinc que realizan esta función. La familia ZnT (SLC30A) que se encarga del eflujo de iones zinc (Palmiter y Huang, 2003) y los transportados que permiten el influjo o entrada de zinc, la familia ZIP (SLC39A). Existen nueve proteínas ZIP localizadas en humanos, la mayoría de las cuales han sido localizadas en la membrana plasmática y transportan el zinc al interior de las células (Taylor y Nicholson, 2003). Sin embargo, Taylor et al., (2004) han demostrado que uno de los miembros de esta familia, ZIP7, se encuentra en el retículo endoplasmático (RE) y es capaz de transportar zinc desde los compartimentos intracelulares hacia el citoplasma.

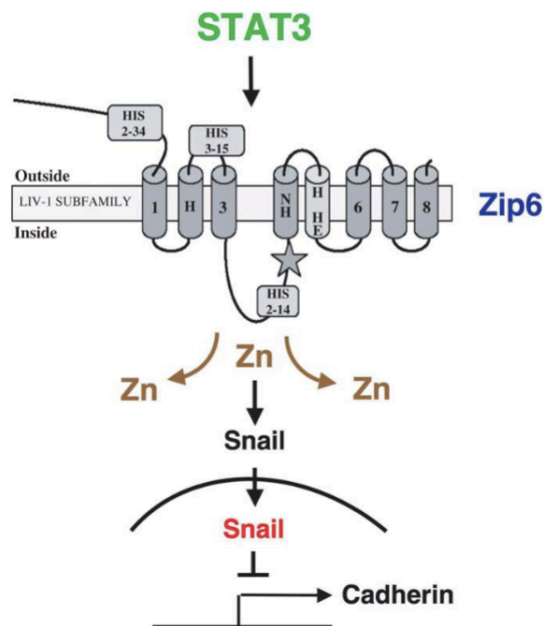
En humanos, el transportador ZIP7 es esencial para la liberación de zinc desde el retículo endoplasmático, un proceso que resulta en la activación de rutas de señalización aguas abajo que promueven la proliferación celular (Taylor K.M., 2008). La activación de estas vías de señalización puede ocurrir a través de la inhibición de las fosfatasa (Haase y Maret, 2005) que previenen la desactivación de las tirosin-kinasas fosforiladas. El papel de este transportador como barrera para la liberación del zinc desde el RE nos lleva a pensar en su papel esencial en las rutas de señalización.

El mismo grupo que describió en 2004 la localización de ZIP7, Taylor et al., descubrió en 2012 que la exposición de las células a estímulos exógenos, como el zinc extracelular, daba lugar a una liberación dependiente de zinc desde el RE mediante ZIP7. Como se observa en el esquema de la figura 2, esta liberación depende de la fosforilación de los residuos de serina del transportador mediante la proteína casein-kinasa 2 (CK2). La fosforilación del transportador permite la salida de zinc al citoplasma, activando diversas vías de señalización que promueven la proliferación y la migración celular.



**Figura 2.** Esquema de la relación entre el aporte externo de zinc y la fosforilación del transportador ZIP7 mediante CK2, que induce la liberación de zinc desde el retículo endoplasmático (Taylor et al., 2012).

Por otro lado, la cascada de señalización STAT3-ZIP6 está involucrada en la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en pez cebra y es necesaria para la transducción al núcleo de Snail, un factor de transcripción que contiene dedos de zinc y que es capaz de inhibir la acción de la E-cadherina. (Yamashita et al., 2004). Además, la localización nuclear de Snail depende tanto de los dominios formados por dedos de zinc como del transportador de zinc ZIP6, lo cual sugiere que éste puede actuar como una molécula señalizadora intracelular, como se observa en el esquema de la figura 3.

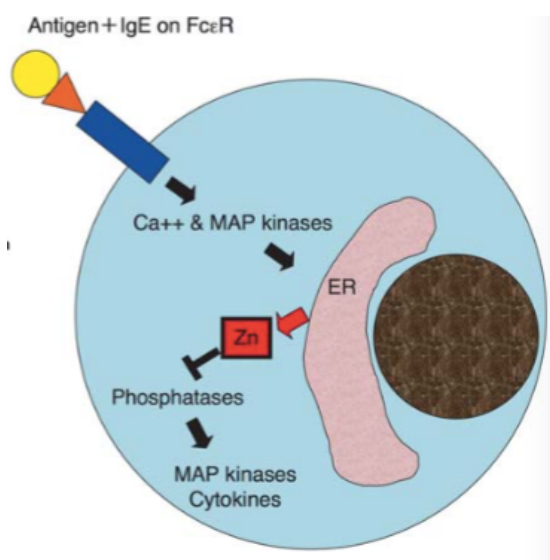


**Figura 3.** Esquema de la transducción al núcleo del factor de transcripción Snail mediante la activación de la cascada de señalización STAT3-ZIP6, que permite la entrada de zinc al interior celular (Murakami y Hirano, 2008).

La estimulación extracelular de los mastocitos produce un aumento en la concentración de zinc intracelular libre pocos minutos después del estímulo. Este fenómeno fue denominado por Yamasaki et al., (2007) como “Ola de zinc”. Este fenómeno se basa en una liberación controlada de zinc desde el retículo endoplasmático, posiblemente mediante el transportador ZIP7 descrito por Taylor et al., (2004), y el área circundante en respuesta a la estimulación del receptor FcεR1. En los mastocitos esta ola de zinc es dependiente de la entrada de calcio y de la activación de las MAP kinasas. En la figura 4 se puede observar un esquema que representa el proceso.

Debido a que se ha demostrado que el zinc extracelular no contribuye al fenómeno generado por la ola de zinc liberada desde el retículo y que esta liberación se da algunos minutos después de la estimulación del receptor, se puede afirmar que el ion actúa como un mensajero secundario en estas condiciones. Las razones que lo justifican son las siguientes:

- Los estímulos extracelulares, como el cross-link del receptor FcεR1, inducen la liberación de la ola de zinc.
- Un compartimento intracelular, posiblemente el retículo endoplasmático, sirve como fuente de zinc.
- El zinc libre a niveles similares a los observados en la ola de zinc puede afectar a moléculas señalizadoras intracelulares, como la tirosina fosfatasa, y por tanto modular en última instancia la señal desencadenada por los estímulos extracelulares.



**Figura 4.** Esquema que muestra la estimulación del receptor FcεR1, que produce la liberación de la ola de zinc dependiente de Ca<sup>2+</sup> y MAP kinasas. Esta ola de zinc inhibe la acción de la tirosina fosfatasa, lo cual produce la activación de las MAP kinasas y la expresión de ciertas citoquinas (Murakami y Hirano, 2008).

Existe una diferencia importante entre la ola de zinc en los mastocitos y la que se ha comentado previamente implicada en EMT en pez cebra. En el caso de la ola de zinc, su efecto es visible algunos minutos después del estímulo, mientras que en pez cebra la liberación del zinc está ligada a la regulación transcripcional de los transportadores de zinc y se detecta, por lo tanto, diversas horas después de la estimulación. Estas observaciones indican que la señalización del zinc presenta dos vertientes, una temprana, directamente inducida por estímulos extracelulares y otra tardía, dependiente de la regulación transcripcional de la expresión de los transportadores.





Debido a que tanto el glutamato como la despolarización de la membrana abren los canales permeables al zinc (Atar et al, 1995), la máxima translocación del mismo entre los diversos compartimentos se producirá durante los momentos de actividad neuronal intensa. También existen indicios de intercambios de cantidades menores de zinc durante la señalización sináptica fisiológica, desencadenando posteriores cascadas de señalización en la neurona postsináptica (Li et al., 2001).

Además del zinc liberado desde terminaciones presinápticas en la hendidura sináptica, existe un pool de zinc en el soma de la neurona. Una de las fuentes de este zinc son las metalotioneínas, proteínas pequeñas de alrededor de unos 3000 Da que presentan abundantes residuos de cisteínas que les permiten unirse a metales (Valle, 1995). Las tioneínas pueden aceptar hasta 7 átomos de zinc formando clusters a través de 20 residuos de cisteína (Maret and Vallee, 1998). Los procesos de oxidación o nitrosilación de estos residuos en el cluster de zinc dan lugar a una liberación del ion (Maret, 2000), por lo que estas proteínas pueden actuar como donadores de zinc a otras proteínas de unión al mismo. La presencia de óxido nítrico puede movilizar este zinc asociado a las metalotioneínas y hacer que aumente la concentración del ion en el soma neuronal, produciéndose un flujo de  $Zn^{2+}$  desde el citoplasma hacia el espacio extracelular.

## 2. OBJETIVOS

El zinc es el segundo oligoelemento más abundante en el organismo, después del hierro, y presenta un gran número de funciones, entre las cuales destaca su papel como mensajero secundario. Asimismo, desempeña un rol esencial en el sistema nervioso.

El presente proyecto se basa en la hipótesis de que entornos celulares con concentraciones no citotóxicas de zinc liberadas de forma controlada pueden tener un efecto positivo sobre la diferenciación de precursores neurales hacia ciertos tipos celulares como son las neuronas. Para evaluar dicha hipótesis se pretende:

- Optimizar el proceso de diferenciación de células madre embrionarias de ratón a precursores neurales mediante el empleo de ácido retinoico en un cultivo en suspensión.
- Determinar las concentraciones citotóxicas de zinc sobre los precursores neurales obtenidos mediante diferenciación de células madre embrionarias de ratón.
- Evaluar el efecto de las concentraciones no citotóxicas sobre la diferenciación neural como estrategia para la regeneración del tejido nervioso.

Por otro lado, con objeto de crear entornos basados en biomateriales que proporcionen soporte estructural a las células con la capacidad de liberar controladamente iones zinc, se prepararán soportes biodegradables de ácido poli-L-láctico (PLLA) cargados con iones zinc a partir de sales de  $ZnCl_2$ . Estos materiales pretenden ser una primera aproximación hacia un vehículo de liberación controlada que puede ser empleado en terapias de regeneración neural, en las que la diferenciación de los precursores hacia neuronas es vital para suplir la baja tasa de diferenciación hacia este tipo celular que se produce en las lesiones neurales.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. CULTIVOS CELULARES

##### 3.1.1. Obtención de precursores neurales mediante cuerpos embrioides

Para la obtención de cuerpos embrioides se partió de células madre embrionarias de ratón (ES-D3, ATCC® CRL-1934™). Se cultivaron en adhesión en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, al que previamente se le había realizado un recubrimiento (*coating*) con gelatina (*Gelatin from porcine skin*, Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0,1% w/v, con medio K.DMEM (consultar la composición de los medios en el anexo 1). Pasadas 24 horas de cultivo, a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>, se disgregaron las células adheridas al fondo del frasco incubando con 1 mL de tripsina-EDTA (Invitrogen, Paisley, Escocia) durante 5 minutos a 37 °C. Se sembraron en suspensión en una placa de cultivo de 6 pocillos no adherente a una densidad de 400.000 células/mL en 2 mL de medio E.DMEM (Anexo 1) por pocillo. Estas células sembradas forman agregados denominados cuerpos embrioides que se mantienen en suspensión y no deben adherirse al fondo de la placa.

Según diversos autores, la agregación de células madre embrionarias de ratón para formar cuerpos embrioides combinada con la exposición al ácido retinoico incrementa la eficiencia de diferenciación de dichas células hacia el fenotipo neural (Brain et al., 1995; Strübing et al., 1995). La simple agregación en presencia de suero favorece la diferenciación hacia tipos celulares no neurales, incluyendo células cardíacas (Brain et al., 1996), mientras que la adición de concentraciones desde 0,5 a 1 µM suprime la diferenciación de células no neurales y resulta en una elevada proporción de precursores neurales (Brain et al., 1995).

Se emplearon dos protocolos distintos para llevar a cabo la diferenciación de los cuerpos embrioides a precursores neurales. El primero basado en el protocolo de Bibel et al. (2004) en el que se empleaba una concentración de ácido retinoico de 5 µM durante 8 días. En este caso se modificó dicha concentración por 0,5 µM, debido al elevado grado de diferenciación que presentaban las células obtenidas en el trabajo de Bibel et al., (2004) a las pocas horas de su siembra en adhesión. Las células sembradas eran positivas para el marcaje con beta-III tubulina, un marcador temprano de neuronas, a las dos horas del inicio del cultivo. Por otro lado, se empleó el protocolo de Kim et al., (2009) en el que el tiempo de cultivo era de 12 días en un medio de cultivo libre en suero y una concentración de ácido retinoico de 0,5 µM.

##### a) Diferenciación en medio E.DMEM + 0,5 µM de ácido retinoico

Para la obtención de precursores neurales se empleó medio E.DMEM (Anexo 1), 2 mL por pocillo de la placa de cultivo de 6 pocillos, pero se modificó la concentración de Knockout Serum replacement (Life technology, Paisley, Escocia) a un 5% v/v y Suero Fetal Bovino (Biowest, Nuaillé, Francia) al 0,5% v/v; además se añadió una concentración de 0,5 µM de ácido retinoico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Desde el momento en el que se realizó este cambio de medio, las células se mantuvieron en cultivo durante 8 días. Se realizaron cambios de medio cada 2 días. Para ello se dejaron precipitar las células en el fondo de un tubo de centrífuga de 15 mL y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en medio fresco, 2 mL por cada pocillo de la placa p6.

## b) Diferenciación en medio SFD

Siguiendo el protocolo de Kim et al. (2009) se cultivaron los cuerpos embrioides durante 12 días. Los cuatro primeros días de cultivo se mantuvieron en medio de diferenciación libre de suero (SFD, Anexo 1), transcurrido este tiempo se suplementó el medio SFD con 0,5  $\mu$ M de ácido retinoico. Por último, los últimos cuatro días del cultivo se eliminó el ácido retinoico y se empleó únicamente el medio SFD.

### 3.1.2. Inmunocitoquímica de cuerpos embrioides en suspensión

Una parte de los cuerpos embrioides diferenciados a precursores neurales que se obtuvieron mediante el empleo del **protocolo a)** se fijó con formaldehído (Panreac, Barcelona, España) al 4% para realizar una inmunocitoquímica que permitiese evaluar la diferenciación. Para ello se emplearon dos anticuerpos contra marcadores de precursores neurales, *mouse monoclonal to Nestin* (Abcam ab 22035) y *mouse monoclonal to NeuN* (Abcam ab 104224). Como control se emplearon precursores neurales de rata procedentes de un cultivo primario.

Posteriormente a su fijación se permeabilizó con DPBS-Triton X-100 al 0,3% v/v (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez permeabilizado, se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (DPBS con BSA 1% w/v (Sigma-Aldrich, Madrid, España), 5% v/v de suero de caballo inactivado (Life technology, Paisley, Escocia) y Triton X-100 al 0,1% v/v). Tras el bloqueo se incubó overnight a 4 °C con los anticuerpos primarios *mouse monoclonal to Nestin* (Abcam ab 22035) a una dilución 1:100, y *mouse monoclonal to NeuN* (Abcam ab 104224) a una dilución 1:300, ambos en tampón de bloqueo. A continuación, se lavó el anticuerpo primario DPBS-Triton X-100 0,1% v/v y se incubó con el anticuerpo secundario, *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse* (Invitrogen A11029) a una dilución 1:500 en tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. En la tabla 2 quedan recogidos los anticuerpos usados y sus diluciones.

Tras una hora se lavó de nuevo con DPBS-Triton X-100 0,1% v/v y se incubó con Hoechst (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una dilución 1:7500 en DPBS-Triton X-100 0, 1% v/v durante 20 minutos a temperatura ambiente.

**Tabla 2.** Anticuerpos y diluciones empleados en la inmunocitoquímica de los cuerpos embrioides en suspensión.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
<i>Mouse monoclonal to neuN</i>	1:100	Alexa Fluor 488	1:500
<i>Mouse monoclonal to nestin</i>	1:300		

Una vez transcurridos los 20 minutos de incubación con Hoechst, se realizó un lavado con DPBS-Triton X-100 0, 1% v/v y las células se resuspendieron en glicerol (Prolabo (VWR), Barcelona, España) al 84% v/v. Se depositó una gota de 30  $\mu$ l sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos de 12 mm de diámetro.

Al tratarse de una inmunocitoquímica de células en suspensión es necesario centrifugar en cada paso a 1000 rpm durante 2 minutos.

Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) y se realizaron capturas de las imágenes a 10X y 20X que fueron analizadas con el software de imagen FIJI.

### 3.1.3. Siembra de precursores neurales en adhesión

Tras 8 días de cultivo se procedió a sembrar los cuerpos embrioides diferenciados mediante el protocolo **a) (Diferenciación en medio E.DMEM + 0,5  $\mu$ M de ácido retinoico)** en adhesión en una placa de cultivo de 96 pocillos, para permitir la diferenciación de estos precursores hacia los distintos tipos celulares, como neurona y glía.

En este punto los cuerpos embrioides se denominan esferoides o *neursphere-like bodies* (NLB), puesto que ya han sido diferenciados. La denominación cuerpos embrioides se emplea cuando los agregados están formados por células madre embrionarias.

Se realizó una disgregación mecánica de los esferoides para llevar a cabo el cultivo celular. Para ello se recogieron los agregados celulares de los pocillos de la placa y se dejaron sedimentar en un tubo de centrifuga de 15 mL. Se retiró parte del sobrenadante, dejando 1 mL de medio en el tubo. La disgregación se realizó manualmente mediante una micropipeta de 100  $\mu$ L. Se hicieron pasar los esferoides a través de la punta de la micropipeta 50 veces, con suavidad y evitando la formación de burbujas. Si después de realizar este proceso todavía se observan a simple vista los agregados celulares es necesario pasarlos a través de una jeringa de 10 mL con una aguja de 0,5 mm de diámetro interno acoplada a la punta. Se pasaron 10 veces los agregados a través de la aguja. No es aconsejable realizar este proceso más veces, ya que es muy agresivo con las células.

Para mejorar la adhesión de los precursores neurales, se realizó un recubrimiento del fondo del pocillo con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, Madrid, España), seguido de un segundo recubrimiento con laminina (Invitrogen, Bleiswijk, Países Bajos) sobre una placa de cultivo de 96 pocillos. El primer *coating* de poli-D-lisina se realizó con una concentración de 20  $\mu$ g/mL durante dos horas a 37  $^{\circ}$ C; transcurrido este tiempo se retiró y se añadió un *coating* de laminina a 0,5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> mínimo media hora a temperatura ambiente (Bibel et al., 2004).

Una vez disgregados los esferoides y con los recubrimientos hechos sobre las placas de cultivo, los precursores neurales se sembraron a una densidad celular de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en medio de diferenciación neural, con 100  $\mu$ L de medio por pocillo (la composición de los medios se encuentra detallada en el anexo 1).

Se sembraron tres placas de cultivo de 96 pocillos con el objetivo de estudiar el efecto citotóxico del zinc a 1, 3 y 7 días del inicio del cultivo. Se emplearon 5 concentraciones diferentes sobre los precursores neurales sembrados en adhesión. Las concentraciones con las que se suplementó el medio de diferenciación fueron 5, 10, 20, 40 y 60  $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Madrid, España); como control se empleó el medio de diferenciación sin zinc. Se sembraron tres réplicas por condición en todas las placas. Las células sembradas en adhesión se mantuvieron durante un día en medio de diferenciación neural (sin adición de Zn), y transcurrido este tiempo se realizó un cambio de medio. Se empleó medio de diferenciación neural suplementado con las concentraciones indicadas de zinc. Se considera el inicio del cultivo cuando se añade el medio suplementado con zinc.

Una vez determinadas las concentraciones citotóxicas del ion (ensayo descrito en el punto 3.1.4.), se sembró otra placa para determinar la el grado de diferenciación de estos precursores. Se emplearon dos concentraciones en este caso, 10 y 20  $\mu$ M, ya que para concentraciones mayores, el ZnCl<sub>2</sub> demostró una alta citotoxicidad. Del mismo modo que en la determinación de las concentraciones citotóxicas, se mantuvieron las células 24 h en medio de diferenciación sin zinc, pasado este tiempo se cambió de medio y añadieron las concentraciones indicadas. La duración del cultivo fue de 8 días, desde el momento en el que se añadió el zinc, y se realizaron cambios de medio cada 2 días, añadiendo medio de diferenciación neural suplementado con zinc en cada uno de los cambios.

### 3.1.4. Ensayo de citotoxicidad

Para determinar el efecto citotóxico del zinc sobre los precursores neurales sembrados en adhesión se emplearon 5 concentraciones del mismo además de una condición control que solo contenía el medio de diferenciación.

Para determinar este efecto citotóxico se realizó un ensayo de *Live-Dead* mediante el kit *Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells* (Invitrogen, Bleiswijk, Países Bajos). Se emplearon dos reactivos, la Calceína AM que es escindida por las esterasas de las células metabólicamente activas y, por tanto, vivas haciendo que adquieran una coloración verde cuando son observadas en el microscopio de fluorescencia. Y por otro lado, el Bromuro de Etidio, que solo penetra en las células muertas que presentan la membrana plasmática dañada adquiriendo el núcleo una coloración roja cuando es excitado.

Se sembró una condición más, empleada como control positivo de muerte, en el que todas las células debían estar muertas para poder comprobar que todas aparecían marcadas de rojo y no existía ninguna marcada de verde, ya que no eran metabólicamente activas y las esterasas celulares eran incapaces de escindir la Calceína AM que da lugar a este marcaje. Las células del control positivo de muerte se incubaron durante 10 minutos a 37 °C en medio de diferenciación neural suplementado con tritón X-100 en DPBS al 0,5% v/v para producir su muerte. Después de lavar todos los pocillos con DPBS se incubó a 37°C con DPBS suplementado con Calceína-AM (dilución 1:4000) y Bromuro de Etidio (dilución 1:1000) durante media hora.

Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Se tomaron 4 imágenes por cada una de las 3 réplicas biológicas de cada condición. Las imágenes fueron analizadas mediante el software de imagen FIJI.

Para determinar la supervivencia celular, en el software de análisis de imagen se ajustó un umbral de intensidad sobre las imágenes, tanto de las células vivas como de las células muertas. Se contabilizaron únicamente las células que estaban marcadas por encima de este umbral mediante una herramienta que presenta el programa para contabilizar partículas; para ello se debe ajustar un número de píxeles mínimo a partir del cual el software detecta una partícula, según las dimensiones de nuestras células. En el caso de que algunas células aparezcan unidas se puede aplicar un algoritmo que las separa, para evitar que se contabilice una en lugar de dos.

Una vez contabilizadas las partículas tanto para el marcaje con Calceína AM como para el bromuro de etidio se calculó la supervivencia celular como:

$$\% \text{ Supervivencia celular} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ de células vivas} + n^{\circ} \text{ de células muertas}} \times 100 \quad (\text{ecuación 1})$$

Se obtuvo una media de la cuantificación de las imágenes de cada condición. A partir de los resultados obtenidos, se realizó un análisis estadístico de la varianza mediante el test de comparación múltiple de Dunn, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas. Se empleó este test ya que la población no seguía una distribución normal, por lo que el análisis de la varianza debía ser no paramétrico.

### 3.1.5. Inmunocitoquímica precursores neurales sembrados en adhesión

Transcurridos 8 días de cultivo, desde el primer cambio de medio con medio de diferenciación suplementado con zinc, se fijaron las células con formaldehído al 4% con objeto de realizar una inmunocitoquímica que permitiera analizar los tipos celulares hacia los cuales se habían diferenciado los precursores neurales en presencia del zinc, y cuál era el porcentaje de los mismos.

Una vez fijadas las células se empleó el mismo protocolo que en la inmunocitoquímica de los esferoides en suspensión (3.1.3), tanto para la permeabilización como para el bloqueo. Una vez bloqueado se incubó con los anticuerpos primarios:

- *chicken policlonal to GFAP* (Abcam ab7260) dilución 1:1000. Anticuerpo contra proteína ácida fibrilar glial, empleado para detectar células de la glía.
- *mouse monoclonal to  $\beta$ III-tubulin* (Abcam ab7751) dilución 1:2000. Anticuerpo contra un microtúbulo presente en neuronas tempranas, expresado casi exclusivamente en este tipo celular que permite diferenciar entre células gliales y neuronas.
- *mouse monoclonal to Nestin* (Abcam, ab22035) dilución 1:300. Anticuerpo contra nestina, proteína involucrada en el crecimiento de los axones por lo que se emplea como marcador de precursores neurales.

A continuación, se lavó el anticuerpo primario DPBS-Triton X-100 0,1% y se incubó con los anticuerpos secundarios, *Alexa Fluor 555 goat anti-chicken* (Invitrogen A21437) y *Alexa Fluor 647 goat anti-mouse* (Invitrogen A21236) ambos a una dilución 1:500 en tampón de bloqueo durante una hora temperatura ambiente. En la tabla 3 quedan recogidos los anticuerpos empleados y sus diluciones.

**Tabla 3.** Anticuerpos y diluciones empleados en la inmunocitoquímica de los precursores neurales sembrados en adhesión.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
<b>Chicken policlonal to GFAP</b>	1:1000	Alexa Fluor 555	1:500
<b>Mouse monoclonal to <math>\beta</math>III-tubulin</b>	1:2000	Alexa Fluor 647	1:500
<b>Mouse monoclonal to nestin</b>	1:300		

Tras una hora se lavó de nuevo con DPBS-Triton X-100 0,1% y se incubó con Hoechst a una dilución 1:7500 en DPBS-Triton X-100 0,1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 20 minutos de incubación con Hoechst, se realizó un lavado con DPBS-Triton X-100 0,1% y se añadieron 40  $\mu$ l de glicerol a los pocillos, pudiendo observar las células directamente en la placa con el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Se realizaron 3 capturas por cada una de las 3 réplicas biológicas de cada condición, que fueron analizadas con el software de imagen FIJI.

Se empleó la misma metodología que para la cuantificación de las imágenes del ensayo de citotoxicidad (3.1.3), pero en este caso la morfología que presentaban las células con el marcaje de  $\beta$ III-tubulina no permitió emplear el algoritmo para separarlas. Por ello se realizó el mismo proceso, pero para analizar las partículas se tuvo en cuenta el área del marcaje y de los núcleos, en lugar del número de células.

$$\text{Intensidad de marcaje relativo al } n^{\circ} \text{ de núcleos} = \frac{\text{Área del marcaje}}{\text{Área de los núcleos}} \quad (\text{ecuación 2})$$

Se empleó la misma ecuación para el marcaje con  $\beta$ III-tubulina, GFAP y con nestina.

Se obtuvo una media de la cuantificación de las imágenes de cada condición. Con los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico de la varianza mediante el test de comparación múltiple de Dunn, para determinar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas. Se empleó este test ya que la población no seguía una distribución normal, por lo que el análisis de la varianza debía ser no paramétrico.

Debido a la presencia de células con una morfología diversa y de gran tamaño en el cultivo, se decidió realizar una inmunocitoquímica con el mismo protocolo previamente mencionado (3.1.5) con el marcador S100 $\beta$ , utilizado para la detección de astrocitos, ya que se trata de una proteína que se encuentra en grandes cantidades en este tipo celular (Gonçalves et al., 2007).

Se empleó el anticuerpo primario *Anti-S-100 antibody produced in rabbit* (s2644 Sigma-Aldrich) a una dilución 1:100 en tampón de bloqueo. Solo se realizó la inmunocitoquímica sobre la condición control (medio de diferenciación neural sin zinc) puesto que se quería comprobar si este marcador era adecuado para la detección de astrocitos. Se empleó el anticuerpo secundario *Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit* (Invitrogen A11008) a una dilución 1:500 en tampón de bloqueo.

Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) y se realizaron capturas de las imágenes a 10X.

## 3.2. SÍNTESIS DE LOS FILMS

### 3.2.1. Disolución de PLLA/Cloroformo

Se preparó una disolución de PLLA (INGEO 4042D, Natureworks, Minnetonka, EEUU) en cloroformo (Scharlab, Barcelona, España) al 6% w/v. Se pesaron 21 g de PLLA en la balanza analítica electrónica (Mettler Toledo AX205) y se introdujeron en una botella de vidrio, añadiendo a continuación 350 mL de cloroformo. Se colocaron en el agitador magnético durante 24 horas, hasta que el PLLA se disolvió completamente. La disolución de PLLA/Cloroformo se usó para realizar una emulsión, a partir de disoluciones de cloruro de zinc en agua miliQ con distinta concentración. El PLLA que no se empleó en el momento para realizar las emulsiones se mantuvo refrigerado a 4°C.

### 3.2.2. Disolución de ZnCl<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O mQ

Se preparó una disolución de ZnCl<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O miliQ al 0,49 M. A partir de esta disolución de stock se preparó una disolución de cloruro de zinc, teniendo en cuenta que la máxima concentración de zinc liberada por pocillo de una placa de cultivo de 48 pocillos con 600  $\mu$ L de medio de cultivo, era de 10  $\mu$ g/mL (100  $\mu$ M) utilizando soportes de PLLA de 9 mm de diámetro. Esta concentración, dentro del rango de no citotoxicidad para los precursores neurales (ensayo de citotoxicidad), se consideró como concentración base (1X), teniendo en cuenta que la total liberación del ZnCl<sub>2</sub> desde los soportes de PLLA no produciría la muerte de las células. Se partió de esta concentración inicial ya que se desconocía el comportamiento de la liberación del material. La disolución base (1X) tenía una concentración de 1240,87  $\mu$ g/mL; asimismo, se prepararon dos disoluciones más 10 y 50 veces más concentradas que la anterior, que se denominaron 10X y 50X.



### **3.2.3. Emulsión PLLA/ZnCl<sub>2</sub> mediante Ultra-turrax®**

Para preparar la emulsión con un ratio de volumen de fase inorgánica del 5% v/v se introdujeron 76 mL de la solución PLLA/CHCl<sub>3</sub> al 6% w/v en un vaso de precipitados. Posteriormente fueron introducidos 4 mL de las diversas disoluciones de ZnCl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O mQ en una jeringa de plástico de 10 mL. Mediante un tubo de plástico se unió por un extremo la boca de la jeringa y por el otro una aguja de 0,5 mm de diámetro interno. La jeringa se colocó en la bomba (New Era Pump Systems Inc, NE-4000) con un caudal de 0,2 mL/min. La disolución de cloruro de zinc goteó en la disolución del polímero mientras que ésta se sometía a agitación ultrarrápida, mezclado con una equipo de dispersión de alto rendimiento (IKA® T25 digital ULTRA-TURRAX®) a 6400 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para preparar los films de control se realizó una emulsión en PLLA-cloroformo con agua miliQ únicamente, que se hizo gotear mediante la jeringa del mismo modo que las disoluciones de ZnCl<sub>2</sub>.

### **3.2.4. Preparación de los films**

Los films se prepararon mediante la técnica del “solvent casting” que consiste en la evaporación del solvente de la disolución (o emulsión) del polímero en un recipiente plano, de manera que se forme un film uniforme y las moléculas de la sal queden retenidas en la estructura del polímero cuando se elimina el disolvente. La evaporación se realizó en una campana de extracción de gases a temperatura ambiente.

Para ello se vertieron 21,4 mL de la emulsión en una placa Petri de 13,4 cm de diámetro. La emulsión debe cubrir de forma uniforme el fondo de la placa Petri. Es necesario asegurarse de que todo el material que se emplee sea de vidrio, debido al uso del cloroformo. Las placas Petri se cubrieron con la tapa y se dejaron dos días en la campana de extracción de gases a temperatura ambiente para que se produjese la extracción del solvente. Posteriormente se colocaron en un desecador a vacío a 30 °C durante una semana, para eliminar los posibles restos de disolvente que pudieran quedar.

## **3.3. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL**

### **3.3.1 Caracterización morfológica**

Se estudió la topografía de los films producidos mediante el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, Ultra 55, Zeiss, Oxford Instruments). Se empleó el detector de electrones secundarios SE2, que permite mostrar una imagen de la topografía de la superficie del material con una gran profundidad de campo. Las imágenes se tomaron a diversos aumentos con un voltaje de 2 kV.

### **3.3.2 Análisis termogravimétrico**

El análisis termogravimétrico se basa en la medida continua del peso en una balanza muy precisa de un material sometido a un programa de temperatura controlado en una atmosfera controlada, que llega a degradar el material térmicamente. El equipo consiste en un plato donde se deposita la muestra colocado encima de una balanza de precisión. El plato está colocado en el interior de un horno, de modo que la muestra puede ser calentada durante el experimento. Un gas de purga, que puede ser un gas inerte o reactivo, controla el entorno de la muestra fluyendo alrededor de ésta y posteriormente saliendo del TGA. Durante el experimento, la masa de la muestra se monitoriza y los datos se recogen como pérdida de peso (Eje Y) vs aumento de temperatura (Eje X) (Perkin Elmer, 2010).

Se sometió al análisis termogravimétrico (Mettler Toledo, TGA/DSC 2 STAR system) a los films de PLLA control, 10X y a PLLA en granza en una atmosfera de nitrógeno desde 30°C hasta 600°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Cuando llegó a 600 °C se determinó el peso de los residuos.

### 3.4 ENSAYO DE LIBERACIÓN

#### 3.4.1 Preparación del ensayo

Los films obtenidos se troquelaron con un diámetro de 9 mm y cada una de las muestras obtenidas se pesó para poder posteriormente normalizar los resultados de la liberación del material respecto al peso, ya que los films no son completamente uniformes y una pequeña diferencia de peso puede suponer una diferencia en la liberación. Se emplearon 5 réplicas por cada una de las condiciones: control, 1X, 10X y 50X, que se colocaron en una placa de cultivo de 48 pocillos. Para evitar que las muestras flotasen en el pocillo se colocó una arandela de teflón de 8 mm de diámetro sobre el film, de modo que cuando se introdujese el medio de cultivo éste se quedase en el fondo del pocillo.

El ensayo de liberación se diseñó de modo que se reprodujesen las condiciones a las que se vería sometido el material en el caso de tratarse de un cultivo *in vitro* real. A la hora de sembrar el tipo celular seleccionado para este ensayo es necesario realizar un doble recubrimiento (*coating*) sobre el fondo del pocillo para mejorar la adherencia de las células, por lo que se realizó este proceso sobre los soportes de PLLA para simular las condiciones del cultivo celular sobre los materiales.

Para simular este proceso se añadieron 300 µL de agua miliQ en los pocillos y se incubó la placa a 37°C durante dos horas, del mismo modo que se haría para realizar el *coating* de poli-D-lisina. Una vez transcurrido el tiempo indicado se retiró el volumen de agua y se guardó para su posterior análisis. Posteriormente, se realizó el mismo proceso para simular el *coating* de laminina, sobre los films donde ya se había realizado el de poli-D-lisina, pero esta vez se dejó 30 minutos a temperatura ambiente y se retiraron los 300 µl de agua miliQ.

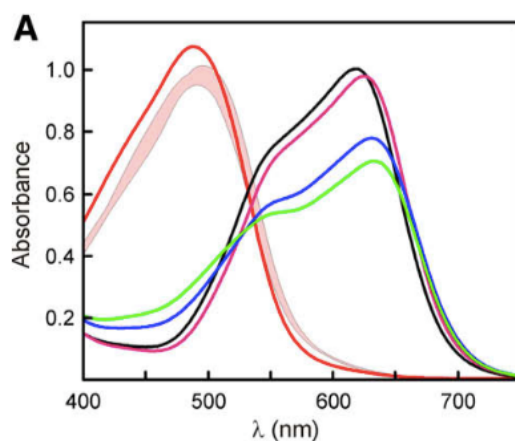
Una vez simulados los *coating* se inició la simulación del cultivo propiamente dicho. Se añadieron 600 µl de agua miliQ (simulando el medio de cultivo) y se tomaron alícuotas de 100 µl a las 2 y 4 horas del inicio del cultivo. A las 24 h se retiró el agua miliQ y se simuló un cambio de medio.

Se realizarón cambios de agua miliQ (simulando los cambios de medio en un cultivo *in vitro*) a los 3, 6 y 8 días del inicio del cultivo. El volumen recogido se guardó para su posterior análisis.

#### 3.4.2 Análisis de la liberación

Para analizar la cantidad de Zn<sup>2+</sup> liberado se empleó una sal denominada Zincon monosodium salt (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se ha demostrado que el Zincon sirve como un cromóforo excelente para la cuantificación tanto de iones de zinc como de cobre en soluciones acuosas (Rush y Yoe, 1954).

El zincon (2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenzeno) es un quelante capaz de retener un ión divalente en su estructura. Cuando esto sucede varía su espectro de absorción (Säbel et al., 2010), como se puede apreciar en la figura 6.



**Figura 6.** Espectro de absorbancia del zincon libre (rojo) y del zincon unido a zinc (negro) en 50 mM de buffer borato (pH 9) a 20°C (Säbel et al., 2010).

Para medir la liberación se empleó una placa de cultivo de 96 pocillos, en la que en cada pocillo se colocó un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , que contenía 92,5  $\mu\text{L}$  de la muestra que se quiere analizar, 100  $\mu\text{L}$  de tampón Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Madrid, España) 0,1 M a pH 9 y 7,5  $\mu\text{L}$  de Zincon. Es importante que la solución de stock de Zincon esté entre 1 y 2 mM, en este caso se empleó a una concentración de 1,6 mM. Para preparar esta concentración de stock se disolvieron 4,85 mg de Zincon en 146  $\mu\text{L}$  de NaOH (Panreac, Barcelona, España) junto con 7,3 ml de agua miliQ.

Es necesario preparar una recta de calibrado con concentraciones conocidas de  $\text{Zn}^{2+}$  (5, 10, 30, 60, 90, 120  $\mu\text{M}$ ) que permita calcular posteriormente las concentraciones presentes en las muestras a analizar. Además, se incluyeron dos pocillos que contenían únicamente agua miliQ en lugar de la muestra para emplearlos como blanco a la hora de la cuantificación.

Una vez que todos los pocillos de la placa estaban llenos con los volúmenes adecuados de los tres componentes se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro de placas (VICTOR<sup>3</sup>, Perkin Elmer 1420) a 570 nm.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

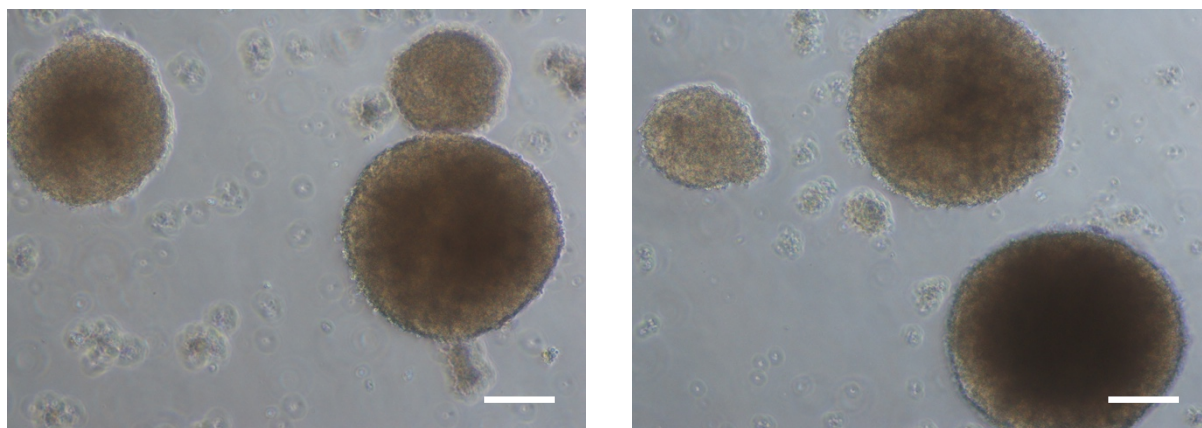
### 4.1 Obtención de precursores neurales

Para la obtención de precursores neurales se emplearon los dos protocolos indicados en la sección (3.1.1).

El protocolo de diferenciación mediante el uso de medio SFD y ácido retinoico (apartado b) de la sección 3.1.1) se descartó debido a la elevada mortalidad celular que se producía cuando se adicionaba el ácido retinoico en el medio a los 4 días del cultivo.

Respecto al protocolo descrito por Bibel et al., (2004) (apartado a) de la sección 3.1.1) se probó una concentración 5  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico durante 8 días, pero la larga exposición al ácido retinoico producía una diferenciación excesiva de los precursores neurales. Estos precursores ya diferenciados a partir de células madre puede ser llamados esferoides o neurosphere-like bodies (NLB), como se ha comentado anteriormente. Esta diferenciación favorecía la adhesión de dichos esferoides al fondo del pocillo, dificultando su disgregación y siembra posterior. Además, según los autores estos precursores eran positivos al marcador  $\beta$ III-tubulina, un marcador temprano de neuronas y por tanto ya diferenciadas, tras 2 horas de cultivo en adhesión, lo cual en nuestro proyecto no resultaba interesante ya que se buscaba un grado de diferenciación adecuado de los precursores para poder testar el efecto del zinc sobre este fenómeno.

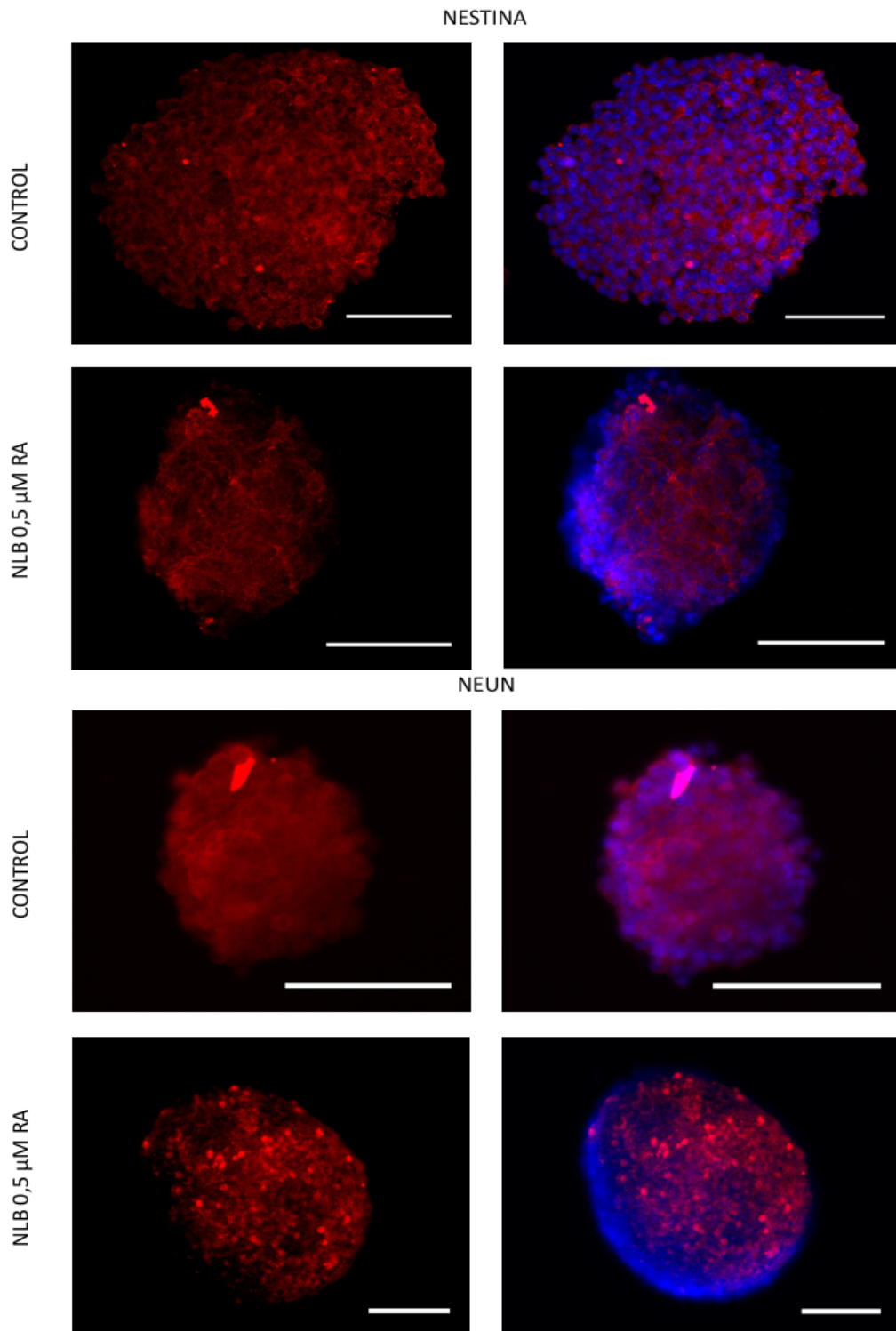
Por ello, se siguió el protocolo descrito por Bibel et al. pero reduciendo la concentración de ácido retinoico a 0,5  $\mu\text{M}$ , para ralentizar el proceso de diferenciación inducido mediante esta molécula. Como se puede observar en la figura 7 las células crecieron formando agregados esféricos, que tras ocho días de cultivo daban lugar a esferoides o NLB.



**Figura 7.** Imágenes de microscopía óptica en campo claro a 10X de esferoides en suspensión tras 8 días de cultivo en medio de cultivo E.DMEM + 0,5  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico. La barra de escala en ambas fotografías corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

La inmunocitoquímica de la figura 8 confirma que los esferoides son positivos para los marcadores de precursores neurales neuN y nestina. Asimismo, la figura 8 incorpora precursores neurales como controles positivos de las inmunocitoquímicas. Se observa que el marcaje de nestina es citoplasmático y aparece alrededor de los núcleos, mientras que el marcaje de neuN es nuclear y coincide con ellos.

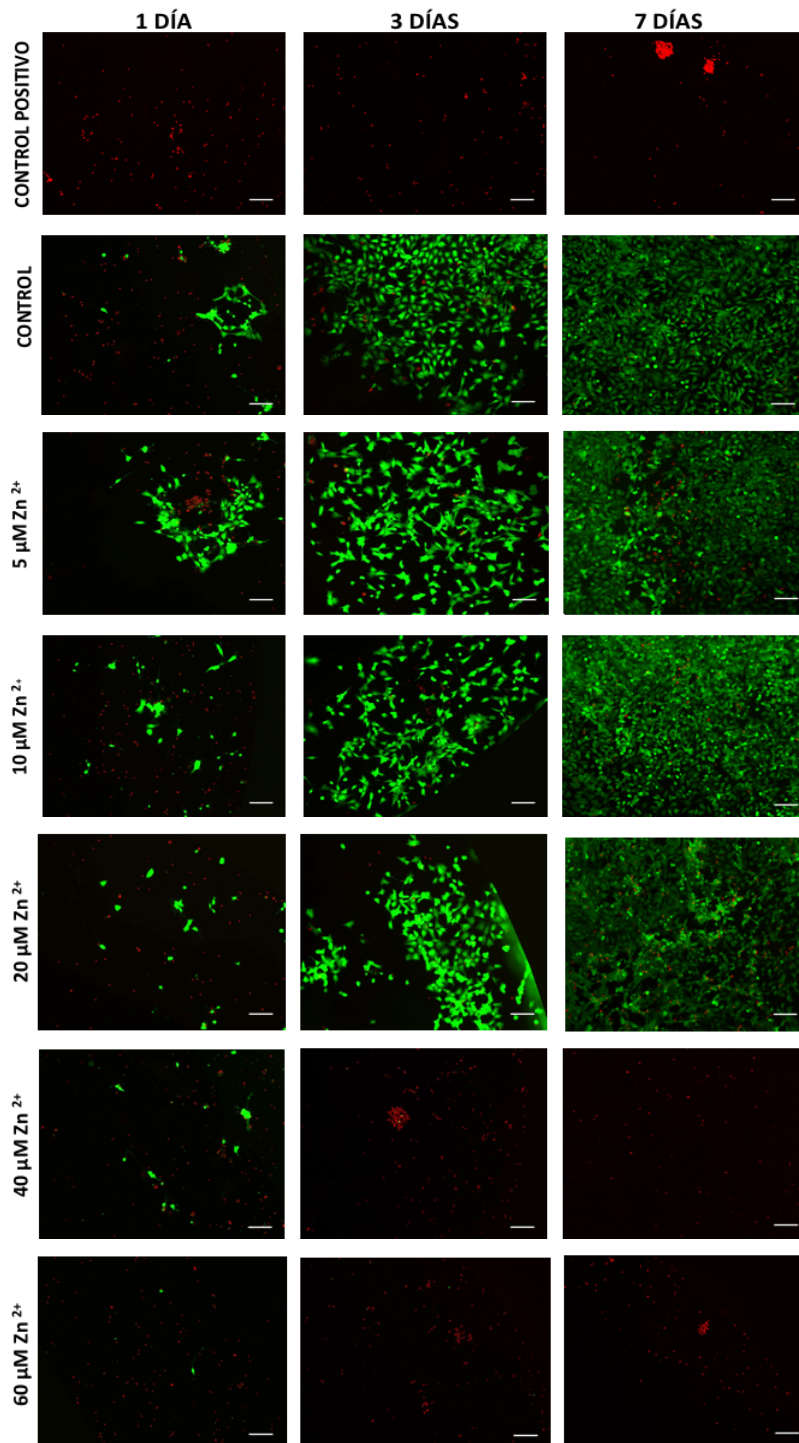
Todos los esferoides aparecían marcados para dichos marcadores, por lo que se puede concluir que el proceso de diferenciación de las células madre embrionarias de ratón hacia precursores del linaje neuroectodérmico se realizó con éxito.



**Figura 8.** Imagen de microscopía de fluorescencia de los esferoides tras 8 días de cultivo en suspensión en medio E.DMEM + 0,5 μM de ácido retinoico. En rojo el marcaje tanto con nestina como neun, en azul los núcleos. Como control se emplearon precursores neurales procedentes de un cultivo primario. La barra de escala corresponde a 100 μm en todas las figuras.

#### 4.2 Determinación de las concentraciones citotóxicas de zinc

En la figura 9 se puede observar cómo la incorporación de  $\text{ZnCl}_2$  al medio de diferenciación neural con concentraciones iguales o superiores a  $40 \mu\text{M}$ , reduce la supervivencia celular a 1 día de cultivo.



**Figura 9.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en adhesión tras 1, 3 y 7 días de cultivo en medio de diferenciación neural con diferentes concentraciones de zinc. En rojo aparecen marcados los núcleos de las células muertas, en verde las células vivas. En el control positivo todas las células están muertas para comprobar que solos se observan núcleos rojos y ninguna célula verde. En la condición control se emplea medio de diferenciación sin zinc. La barra de escala corresponde a  $100 \mu\text{m}$  en todas las imágenes.

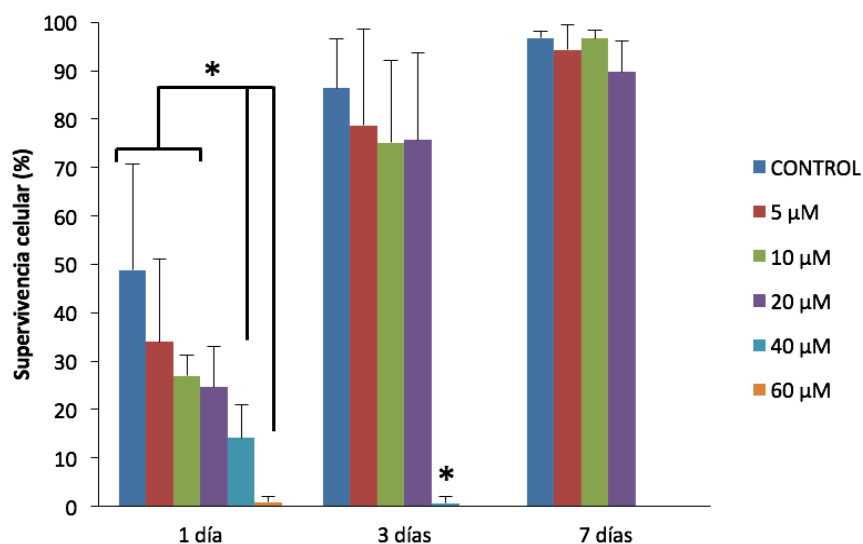
Schranz et al. (2001) demostraron que concentraciones elevadas de zinc (iguales o superiores a 50  $\mu\text{M}$ ) activaban las caspasas 3 y 9, lo que producía una liberación del citocromo C desde la mitocondria dando lugar a la apoptosis celular. Esto podría explicar esta escasa viabilidad celular, sobretudo en el caso de la concentración más elevada, donde apenas se observan células vivas a 1 día de cultivo. A partir de los tres días estas células, sometidas a concentraciones de 40 y 60  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ , no son capaces de tolerar dichas concentraciones y mueren, no observándose células vivas en la figura 9 a 3 y 7 días de cultivo.

En el resto de las concentraciones no citotóxicas, a un día de cultivo la supervivencia celular no supera el 50% en ninguno de los casos. Esta muerte celular inicial puede ser debida al mecanismo de disgregación de los esferoides para su posterior siembra en adhesión. La disgregación manual es un método agresivo que induce estrés en la población celular. Algunas de ellas son incapaces de proliferar y en algunos casos mueren.

Además, la eficiencia de diferenciación mediante ácido retinoico no es del 100% en ninguno de los casos (Bibel et al., 2004). Las células que no se hayan diferenciado a precursores neurales serán incapaces de proliferar en un medio de diferenciación neural, ya que no poseen los receptores adecuados para los factores inductores, con los cuales está suplementado el medio. Por otro lado, algunas de estas células pueden haberse diferenciado en exceso, dando lugar a una población celular heterogénea formada por células ya diferenciadas a células neurales y precursores neurales. Las neuronas serán incapaces de proliferar mientras que los precursores neurales y la glía si lo harán.

A los tres días del inicio del cultivo se puede observar cómo las células han proliferado en las concentraciones no citotóxicas. Duplican, en la mayoría de los casos, la tasa de supervivencia celular. Estas células que proliferan son aquellas que cuentan con un grado de diferenciación adecuado. Por último, a los 7 días, la supervivencia celular es casi del 100%, las células han proliferado cubriendo por completo la superficie del pocillo.

En la figura 10 se puede observar la representación gráfica de los resultados obtenidos mediante el análisis con el software de imagen FIJI y la ecuación 1.



**Figura 10.** Ensayo de citotoxicidad del zinc. Representación gráfica de la supervivencia celular de los precursores neurales sembrados en condiciones de diferenciación (porcentaje de células vivas, calculado de acuerdo a la ecuación 1) a 1, 3 y 7 días de cultivo para el control (células sin aporte de zinc en el medio) y las diferentes concentraciones de zinc aportadas al medio de cultivo. El símbolo \* indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p\text{-value} < 0,05$ ) entre las condiciones señaladas ( $n=12$ ).

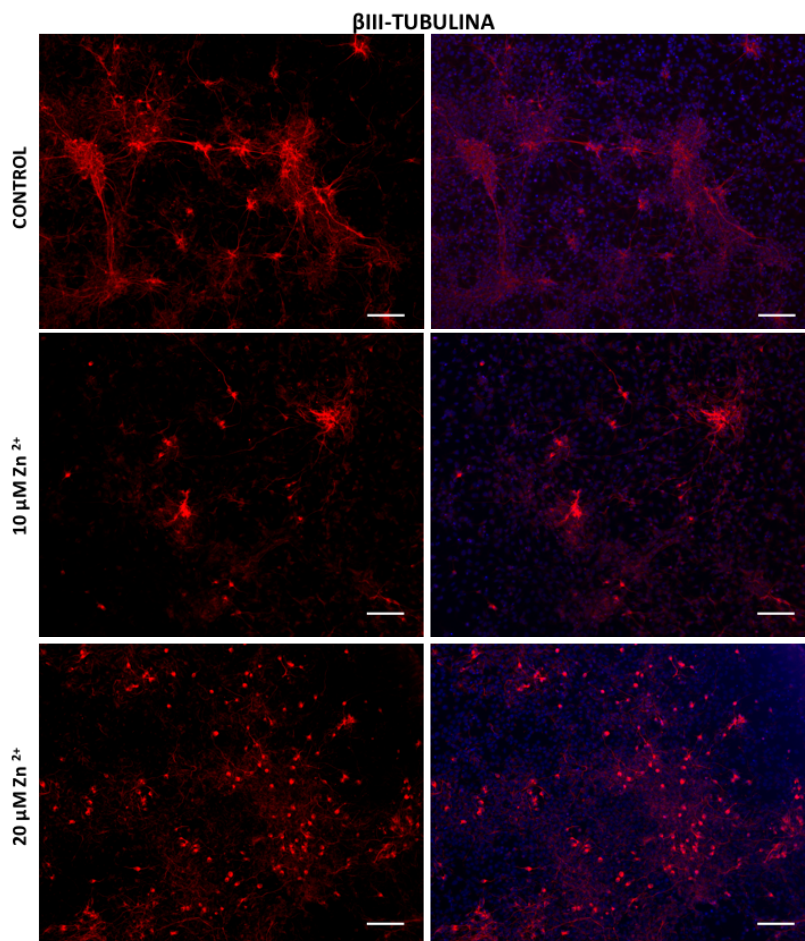
El estudio de las imágenes obtenidas mediante el software de imagen FIJI y el análisis estadístico realizado confirmaron que a 1 día de cultivo existen diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -value $<0,05$ ) en la supervivencia celular entre las dos concentraciones más elevadas, la condición control (sin zinc en el medio) y las concentraciones bajas, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , como se puede observar en la figura 10.

Por otro lado, a 3 y 7 días de cultivo no se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -value $>0,05$ ) entre la supervivencia en la condición control y aquellas que presentan zinc. Mientras que a 3 días si se observan diferencias entre la concentración 40  $\mu\text{M}$  y el resto de condiciones. Todo ello indica que concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  no elevadas (menores a 40  $\mu\text{M}$ ) no son tóxicas en largos periodos de tiempo y no afectan negativamente en términos de proliferación.

#### 4.3 Determinación del porcentaje de diferenciación de los precursores neurales

Para el estudio del efecto del zinc sobre la diferenciación neural se emplearon dos concentraciones del mismo, 10 y 20  $\mu\text{M}$ , que resultaron no citotóxicas en el ensayo de citotoxicidad, además de una condición control que contenía medio de diferenciación sin zinc.

En la figura 11 se puede observar la expresión del marcaje de  $\beta\text{III-tubulina}$ , marcador temprano generalmente identificado con la presencia de neuronas.



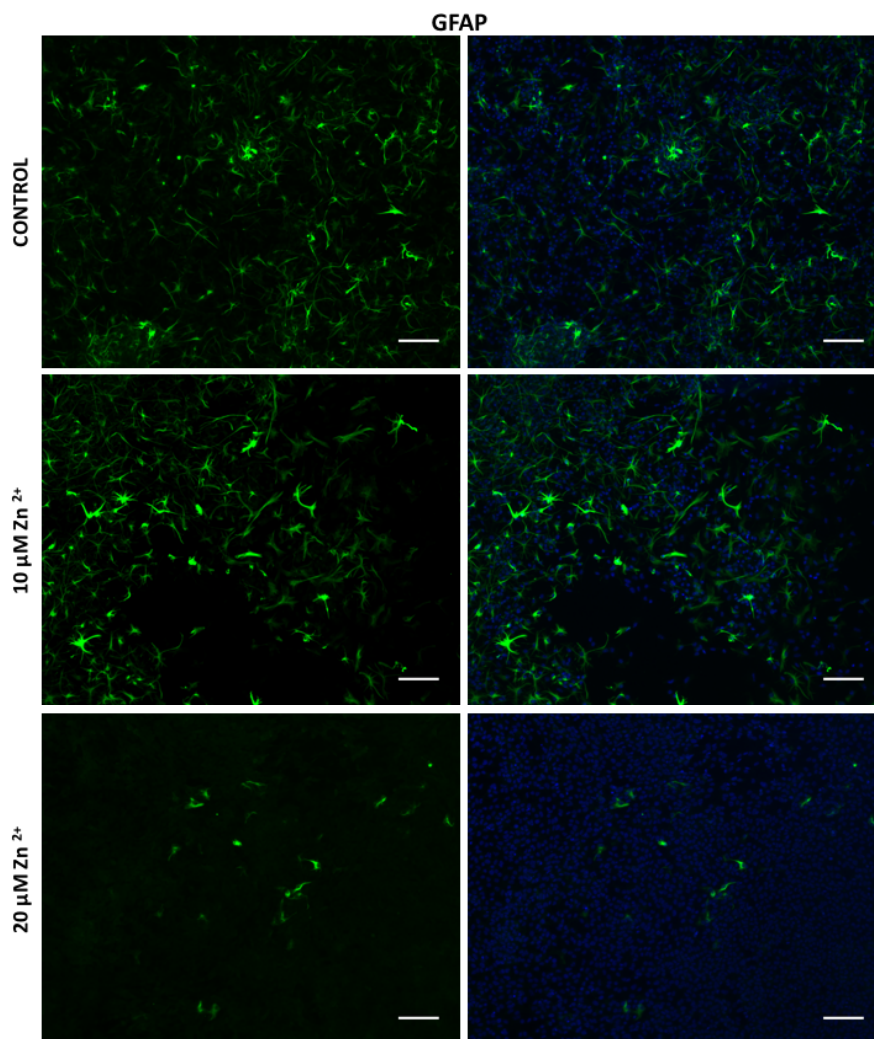
**Figura 11.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en condiciones de diferenciación tras 8 días de cultivo. En la condición control las células se cultivan empleando únicamente medio de diferenciación neural (sin adición de  $\text{Zn}^{2+}$ ). En rojo se puede identificar el marcaje con  $\beta\text{III-tubulina}$  y en azul los núcleos celulares. La barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$  en todas las imágenes.



Como se observa en la figura 11, la presencia de células positivas para la expresión del marcador se ha producido en todas las condiciones del ensayo. La expresión de  $\beta$ III-tubulina en la condición control y en 20  $\mu$ M es muy similar, mientras que para concentraciones de zinc 10  $\mu$ M muestra una menor expresión.

Por otro lado, en la figura 12 queda plasmado como el marcaje glial GFAP en la condición 20  $\mu$ M es muy escaso, representando un número muy reducido de células GFAP positivas por campo. En el caso del control y la concentración 10  $\mu$ M la presencia del marcaje glial es muy similar.

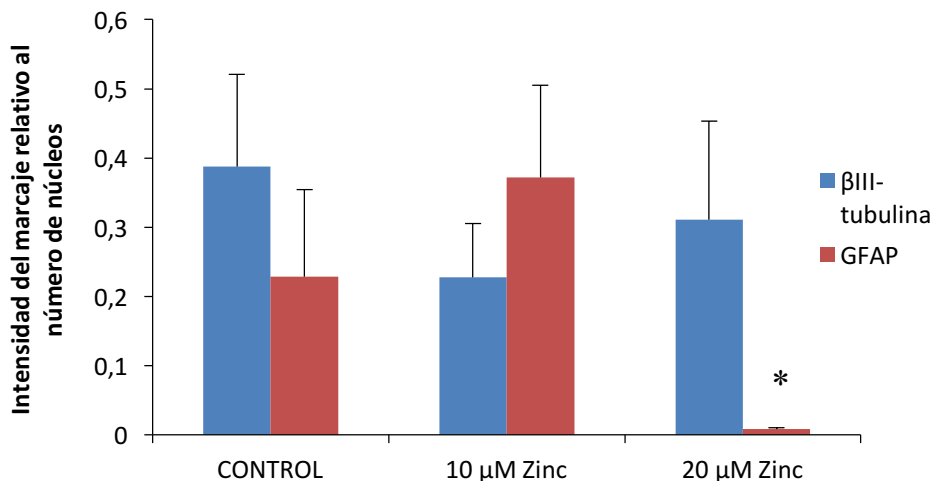
Se aprecia perfectamente la diferencia de morfología entre las células marcadas de la figura 11 con  $\beta$ III-tubulina (marcador neuronal) y las de la figura 12 GFAP (marcador glial). Las células  $\beta$ III-tubulina positivas presentan prolongaciones que se extienden desde un cuerpo celular a otro. Tratándose de un marcaje temprano de neuronas estas prolongaciones pueden identificarse como los axones. Sin embargo, en el caso de las células GFAP positivas éstas presentan una morfología estrellada, característica de gran parte de las células gliales.



**Figura 12.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en condiciones de diferenciación tras 8 días de cultivo. En la condición control las células se cultivan empleando únicamente medio de diferenciación neural (sin adición de Zn<sup>2+</sup>). En verde se puede identificar el marcaje con GFAP y en azul los núcleos celulares. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m en todas las imágenes.

La cuantificación de las imágenes obtenidas en la inmunocitoquímica de las figuras 11 y 12 mediante el uso del software de imagen FIJI y la ecuación 2 aparece representada en la figura 13.

Como se puede observar, la intensidad de marcaje relativo al número de núcleos de  $\beta$ III-tubulina, marcador temprano presente en neuronas, en la condición control (medio de diferenciación sin zinc) es del 0,4. Mientras que la intensidad del marcaje de GFAP, marcador típico de células gliales, es del 0,23.



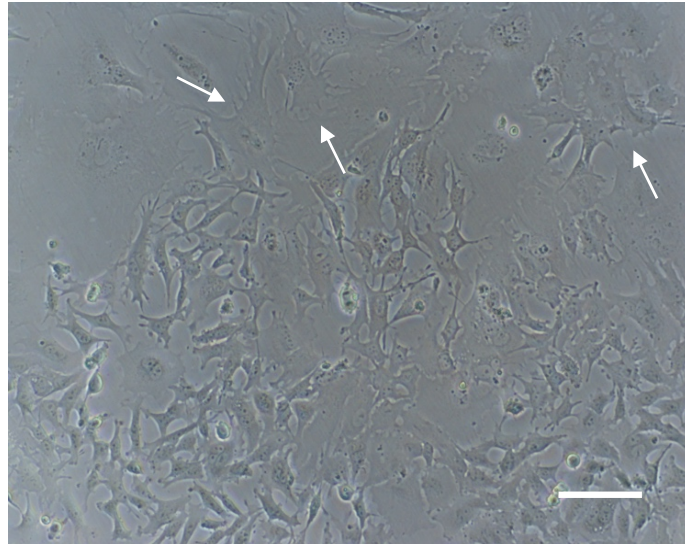
**Figura 13.** Representación gráfica del porcentaje de células que expresan los marcadores  $\beta$ III-tubulina y GFAP tras someter los precursores neurales a un cultivo de diferenciación en medio de diferenciación neural sin zinc (control) o con concentraciones no citotóxicas de zinc (10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M) durante 8 días. El símbolo \* indica que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -value<0,05) en la expresión de GFAP entre las condiciones control y 10  $\mu$ M de  $Zn^{2+}$  y la condición 20  $\mu$ M de  $Zn^{2+}$  ( $n=9$ ).

En el caso de la concentración 10  $\mu$ M de zinc el ratio aparece invertido. Cerca del 0,38 de la intensidad de marcaje relativo presente en esta condición corresponde a GFAP, mientras que el 0,23 corresponde a  $\beta$ III-tubulina. La desviación estándar es elevada debido a que se trata de una población heterogénea de células que, además, crecen mayoritariamente en los bordes del pocillo dificultando su cuantificación y aumentando dicho error. No existen diferencias estadísticamente significativas entre la intensidad del marcaje de GFAP y  $\beta$ III-tubulina relativo al número de núcleos entre la condición control y la concentración 10  $\mu$ M de  $Zn^{2+}$ .

Sin embargo, en el caso de la concentración 20  $\mu$ M la presencia del marcaje con GFAP es muy escasa, apenas un 0,01, mientras que la intensidad del marcador  $\beta$ III-tubulina es muy similar al control, alcanzando un 0,3. Existen diferencias estadísticamente significativas en la intensidad relativa del marcaje con GFAP relativo al número de núcleos entre la condición 20  $\mu$ M y las condiciones control y 10  $\mu$ M de  $Zn^{2+}$ .

Si se considera como el total de la superficie marcada la suma de las células GFAP y  $\beta$ III-tubulina positivas, la condición 20  $\mu$ M presenta una intensidad de marcaje correspondiente al tipo celular neuronal muy elevado. Esta condición podría actuar incrementando el ratio entre células que presentan marcaje neuronal y células con marcaje glial.

Como se observa en el gráfico de la figura 13, apenas un 0,6 de la intensidad del marcaje corresponde a los marcadores  $\beta$ III-tubulina y GFAP. Este hecho podría ser debido a que en las placas de cultivo, además de células  $\beta$ III-tubulina y GFAP positivas, existen células gliales como los astrocitos que no siempre son positivos para el marcaje con GFAP. En la figura 14 se pueden observar células con una morfología similar a este tipo celular y que presentan un tamaño superior respecto al resto de células.



**Figura 14.** Imagen de microscopía óptica en campo claro a 10X de precursores neurales sembrados en adhesión tras 7 días de cultivo en medio de diferenciación neural sin zinc. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

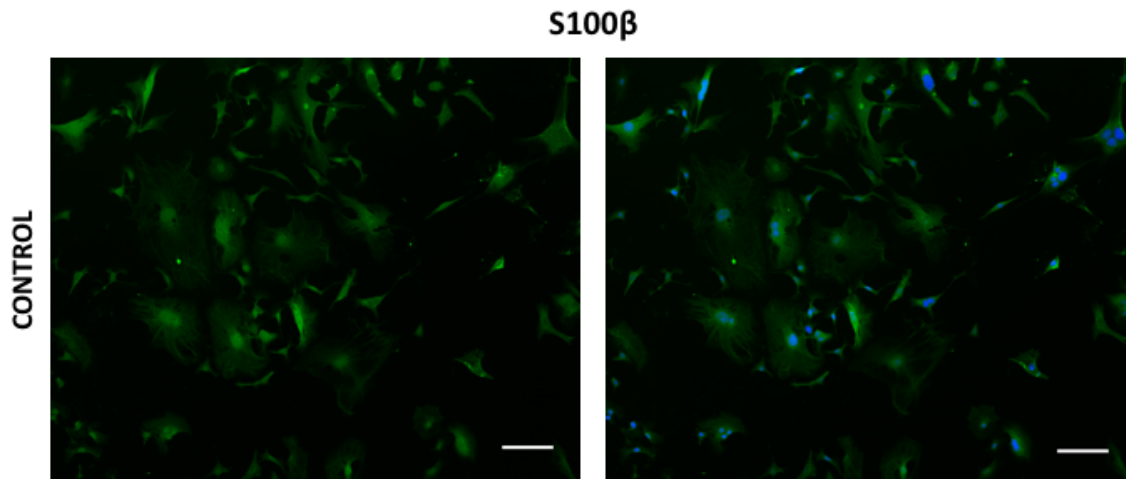
Los astrocitos son células gliales de soporte presentes en el tejido neural. Esta definición implica que se deberían detectar con un marcaje de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), pero en este caso estas células no aparecían marcadas para dicha proteína.

La expresión de GFAP se ha convertido en un marcador prototípico para la identificación inmunohistoquímica de los astrocitos, pero es importante reconocer las limitaciones que presentan GFAP como marcaje para este tipo celular. La expresión de GFAP puede ser un marcador fiable que se une a la mayoría, si no todos, los astrocitos reactivos en las lesiones del sistema nervioso central. Sin embargo, GFAP no es un marcador absoluto para todos los astrocitos no reactivos y habitualmente no es detectado mediante inmunohistoquímica en tejido procedente del sistema nervioso central sano. Estudios en ratones transgénicos han demostrado que la expresión de GFAP no es esencial para la función normal de la mayoría de los astrocitos en el sistema nervioso central sano en ratones transgénicos, pero sí es esencial en la formación de la cicatriz astrogliar durante la reparación de lesiones (Sofroniew y Vinters, 2010). Otros marcadores moleculares han sido empleados en la literatura para la identificación inmunohistoquímica de los astrocitos, tanto reactivos como no reactivos, entre ellos la glutamina sintetasa y S100 $\beta$ , pero estas moléculas no son exclusivas para astrocitos (Gonçalves et al., 2008).

En el sistema nervioso central, los astrocitos son el tipo celular que mayor cantidad de la proteína S100 $\beta$  contiene, de acuerdo a estudios de inmunodetección y expresión de mRNA. Un estudio reciente en el cerebro humano mostró que los astrocitos son las células positivas para S100 $\beta$  predominantes en la materia gris, mientras que los oligodendrocitos son las células S100 $\beta$  positivas predominantes en la materia blanca (Steiner et al., 2007). La microglía es negativa para el marcaje con S100 $\beta$ , sin embargo esta proteína y su mRNA han sido encontrados en cultivos de microglía procedentes de

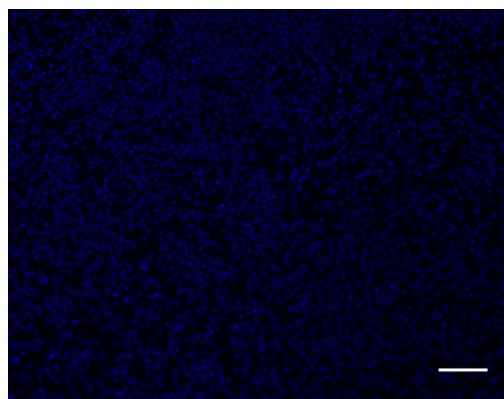
cerebro de roedores (Yang et al., 2001). Por otro lado, confirmando estudios previos en ratón, algunas neuronas en el cerebro humano son positivas para este marcador (Steiner et al., 2007).

Se realizó una inmunocitoquímica sobre la condición control para detectar la presencia de S100 $\beta$  y observar si estas células presentes en la figura 14 aparecían marcadas. Como se puede observar en la figura 15, todas las células presentes en el pocillo aparecen marcadas, por lo que se concluyó que S100 $\beta$  no era un marcador adecuado para la determinación de este tipo celular. Por otro lado, el marcaje de todas las células presentes indica que pueden proceder del linaje neural.



**Figura 15.** Imagen de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en adhesión tras 8 días de cultivo con medio de diferenciación neural. En verde se puede identificar el marcaje con S100 $\beta$  y en azul los núcleos celulares. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

En la inmunocitoquímica de los precursores neurales sembrados en condiciones de diferenciación (3.1.5) se empleó la nestina para determinar el porcentaje de estos precursores sembrados que no se habían diferenciado tras 8 días de cultivo. La prueba reveló que no existían precursores neurales no diferenciados, ya que no se observaron células marcadas con nestina en ninguna de las condiciones estudiadas, como se observa en la figura 16.



**Figura 16.** Imagen de microscopía de fluorescencia de los precursores neurales sembrados en adhesión tras 8 días de cultivo con medio de diferenciación neural. Únicamente se observan los núcleos celulares en azul. No se observa ninguna célula positiva para el marcaje con nestina. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

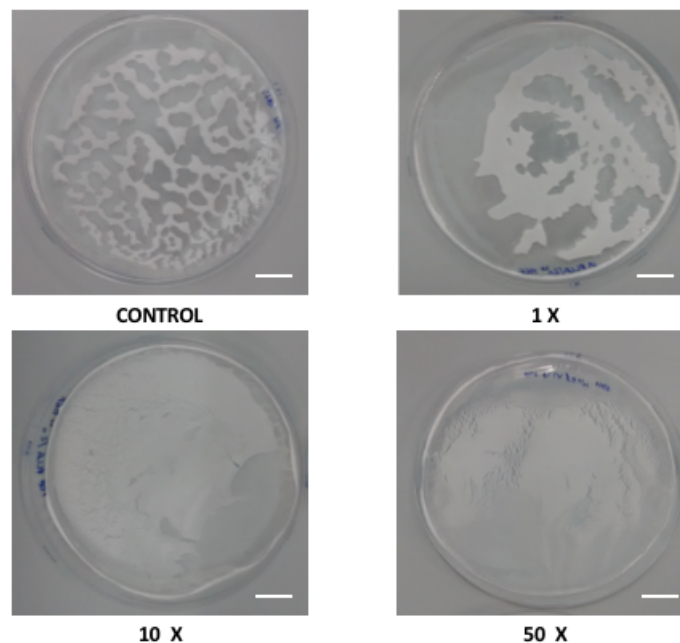
En trabajos futuros sería interesante realizar una inmunocitoquímica combinando los marcajes de S100 $\beta$ ,  $\beta$ III-tubulina y GFAP. El marcaje con S100 $\beta$  es característico de astrocitos pero células como la microglía o las neuronas pueden ser positivas. Un marcaje triple ayudaría dilucidar si las células tanto negativas para  $\beta$ III como para GFAP son positivas para S100, ya que aunque todas las células aparezcan marcadas para S100  $\beta$  se podrían identificar aquellas positivas para  $\beta$ III y GFAP, y determinar si el resto son las células con morfología similar a los astrocitos y gran tamaño.

#### 4.4 Caracterización morfológica del material

Los films obtenidos mediante el método de *solvent casting* (3.2.4) presentaban un aspecto poco uniforme, con agregados opacos y zonas transparentes, como se puede observar en la figura 17.

El motivo por el cual se realizó una emulsión para la producción del material se debe a que el cloroformo, en el cual se disolvió el PLLA, y el agua, donde se disolvió la sal, son inmiscibles y por ello se empleó esta técnica para poder distribuir en pequeñas gotas en el seno de la matriz de PLLA los iones de zinc. En caso de no realizar la emulsión, las sales solubles en agua suelen emerger a la superficie del film, con lo que se obtendría una liberación muy rápida de los iones, al estar depositados en la superficie y no distribuidos dentro del soporte de PLLA (Rico et al., 2015).

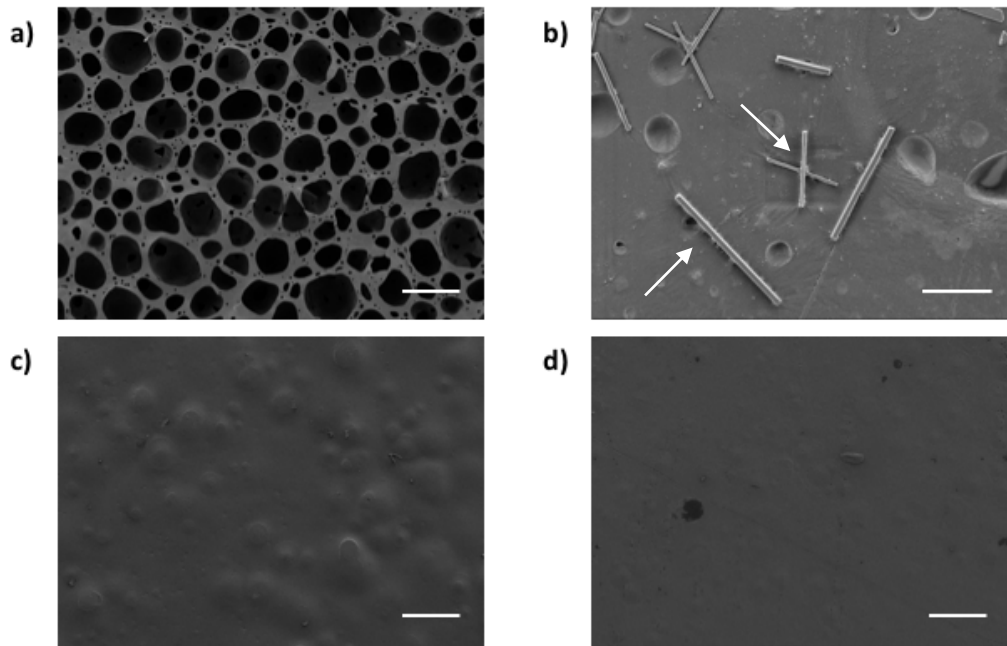
El aspecto macroscópico de los films indica que la emulsión no era estable, y una vez depositada sobre la placa Petri se formó un film no homogéneo, con zonas transparentes y otras donde era opaco, como se ha comentado previamente. Esta falta de uniformidad se comprobó posteriormente mediante el ensayo de liberación.



**Figura 17.** Imágenes macroscópicas de los films de PLLA producidos mediante emulsión de disolución acuosa de sal de zinc a distintas concentraciones (1X, 10X y 50X) y posterior *solvent casting*. La barra de escala corresponde a 2 cm. El control corresponde a una muestra donde se ha emulsionado la misma cantidad de agua que en el resto de muestras, pero sin la sal de zinc.

Esta falta de uniformidad fue comprobada también mediante el análisis topográfico de la superficie de los films. Como se puede observar en la figura 18 el análisis microscópico se corresponde con el aspecto macroscópico de los films. Las imágenes a) y b) corresponden a la zona opaca de los films 10X.

Se puede apreciar la elevada porosidad de la cara superior, debido a la falta de estabilidad de la emulsión. El agua se ha quedado retenida en esta zona, y al evaporarse se han producido grandes poros. Por otro lado, en la cara inferior se observan cristales de cloruro de zinc. La presencia de estos cristales en la cara inferior indica que no están incluidos dentro de la matriz de PLLA. Las imágenes c) y d) corresponden a la cara superior e inferior de las zonas transparentes de los films, respectivamente. La diferencia con la zona opaca es considerable, ya que no se aprecian poros en la superficie.



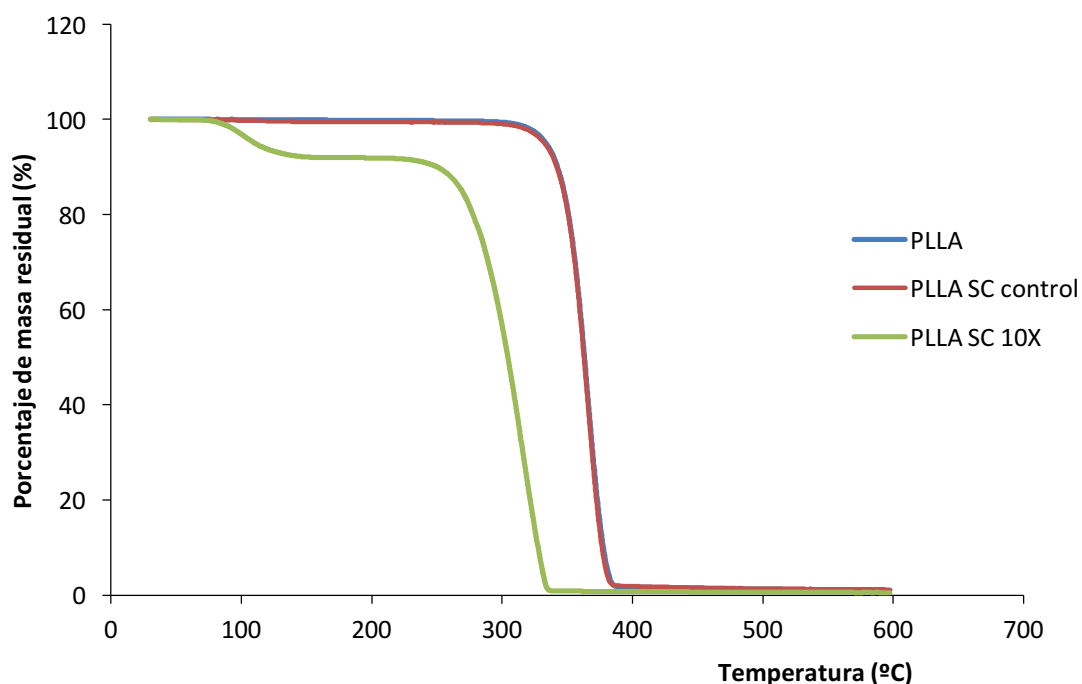
**Figura 18.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de los films preparados con la disolución 10X de cloruro de zinc. **a)** Cara superior de la región opaca del film a 155X. **b)** Cara inferior de la región opaca del film a 3180X. **c)** Cara superior de la región transparente del film a 155X. **d)** Cara inferior de la región transparente del film a 155X. En a),c) y d) la barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ , en b) corresponde a 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó sobre las zonas opacas de los films control y 10X. Además, como control del ensayo se empleó PLLA a granza. El ensayo reveló que la presencia de zinc en los films disminuye la temperatura de descomposición térmica.

En la figura 19 se puede observar la curva del material que contiene zinc, donde se aprecia una disminución de peso inicial, alrededor de los 100 °C. Esta pérdida de peso se corresponde con la temperatura de ebullición del agua. El cloruro de zinc es una sal muy hidróscopica, capaz de absorber gran cantidad de agua del ambiente, por lo que su presencia en el material hace que éste se hidrate, y cuando la temperatura del horno llega a 100°C el agua desaparece, disminuyendo el peso de la muestra.

La curva del TGA de degradación de los films PLLA control (emulsión preparada con la disolución PLLA-cloroformo y un 5% de agua miliQ) y PLLA granza es idéntica, superponiéndose ambas en todo el rango de temperatura (Figura 19).



**Figura 19.** Representación gráfica del porcentaje de masa residual (%) frente a la temperatura (°C) obtenida en el análisis termogravimétrico.

#### 4.6 Ensayo de liberación. Perfil de liberación del material

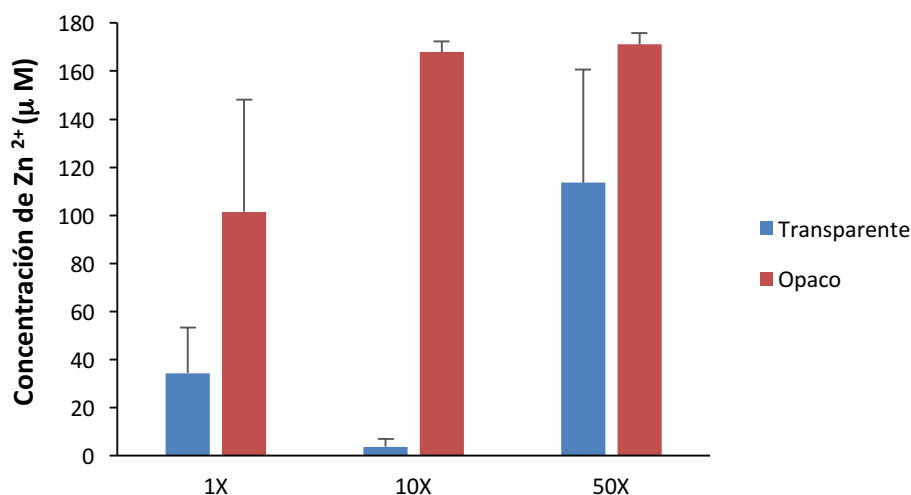
El aspecto poco uniforme de los films hizo necesario el estudio de la liberación tanto de sus partes opacas como de aquellas transparentes para comprobar si, efectivamente, esta falta de homogeneidad afectaba a la liberación del zinc.

Se observó que los films control, que presentan únicamente PLLA con una emulsión de agua miliQ, son capaces de desplazar el espectro de absorción del zinc, dando lugar a un falso positivo (aunque con valores muy bajos de absorción). Esto es debido a que alguno de los productos de la hidrólisis del PLLA reacciona de forma inespecífica con la sal, desplazando su espectro de absorción. Por ello, se emplearon estas concentraciones para corregir la liberación de los films producidos mediante la emulsión de las disoluciones 1X, 10X y 50X.

Como se puede observar en la figura 20, en la que aparece representada la liberación tanto de la parte opaca como de la transparente, durante las etapas que simulan el recubrimiento de las superficies de cultivo para mejorar la adhesión celular (2 horas *coating* poli-D-lisina + 0,5 h *coating* de laminina), ésta presenta una gran variabilidad.

Por un lado, las muestras que corresponden a las regiones opacas del film liberan concentraciones de zinc por encima de 100  $\mu\text{M}$  durante las primeras dos horas y media, cuando tendría lugar el recubrimiento sobre los materiales, indicando que el material presenta una liberación muy rápida al inicio. Como se puede observar en la figura 18 correspondiente a la caracterización morfológica del material indica que los cristales de cloruro de zinc se han depositado en la cara inferior del material,

migrando durante el proceso de *solvent casting*. Esto explicaría la rápida liberación del material, que no se produce a medida que se degrada el PLLA sino cuando estos cristales se disuelven en agua.



**Figura 20.** Representación gráfica de la liberación de zinc tras 2,5 horas en inmersión (simulación de los recubrimientos al material previos al cultivo, 2 horas de coating de poli-D-lisina seguido de media hora de coating de laminina). Se ha incluido la liberación de las zonas opacas y de las zonas transparentes para las disoluciones de zinc 1 X, 10X y 50X.

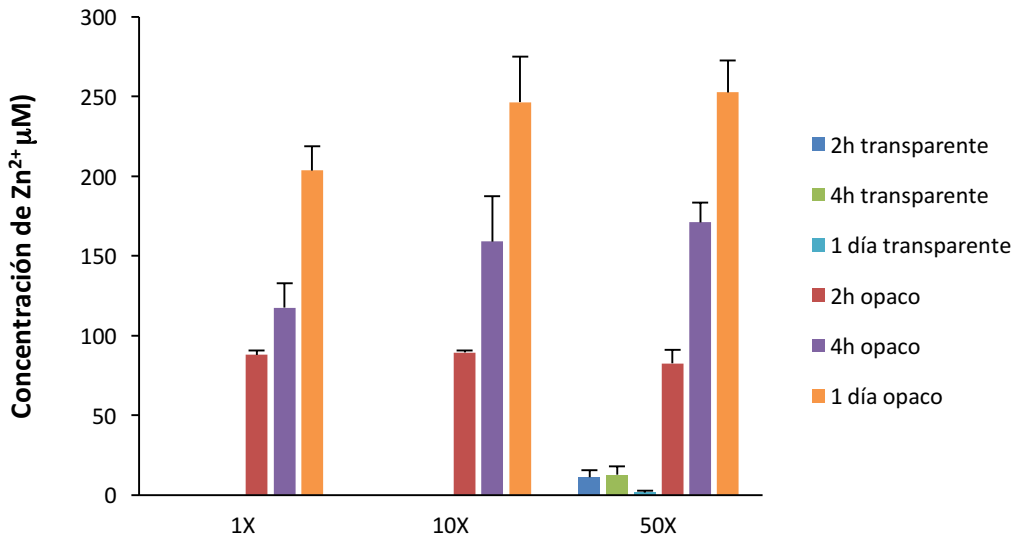
La dispersión entre las diversas réplicas de la misma condición indica la heterogeneidad existente, además, entre la misma zona opaca. Por otro lado, las regiones transparentes presentan una liberación escasa, indicando que la mayoría del zinc contenido en la emulsión se ha depositado en las zonas opacas. Únicamente las muestras que corresponden a la disolución 50X de zinc presentan una liberación por encima de 100 µM

Al tratarse de etapas de acondicionamiento de los materiales para el cultivo, cuando se realiza el recubrimiento de proteínas de adhesión (*coatings*), todo el zinc liberado sería retirado a la hora de sembrar las células, no provocando citotoxicidad en ellas.

En la figura 21, se observa cómo a tiempos de 1 a 3 días, la liberación en las zonas transparentes es nula, excepto por los films producidos mediante la emulsión que contiene la disolución 50X de cloruro de zinc. Tras un día de cultivo, incluso en estos films transparentes con la concentración más elevada de zinc no se observa liberación, lo cual indica que tras 1 día de cultivo se ha liberado todo el zinc que contenían.

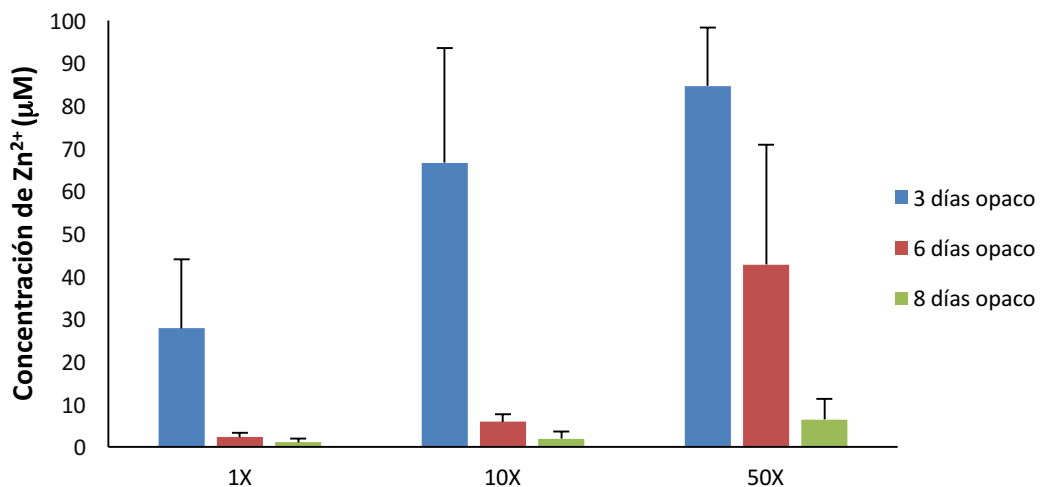
La liberación sigue siendo muy diferente entre las zonas transparentes y las zonas opacas, y la elevada dispersión entre las réplicas de una misma muestra se mantiene, del mismo modo que en el figura 17 durante la simulación del recubrimiento del material. Esto confirma la hipótesis de la falta de homogeneidad de la emulsión.





**Figura 21.** Representación gráfica de la liberación de zinc a 2 h, 4 h y 1 día de inmersión. Se ha incluido la liberación de las zonas opacas y de las zonas transparentes para las disoluciones de zinc 1X, 10X y 50 X.

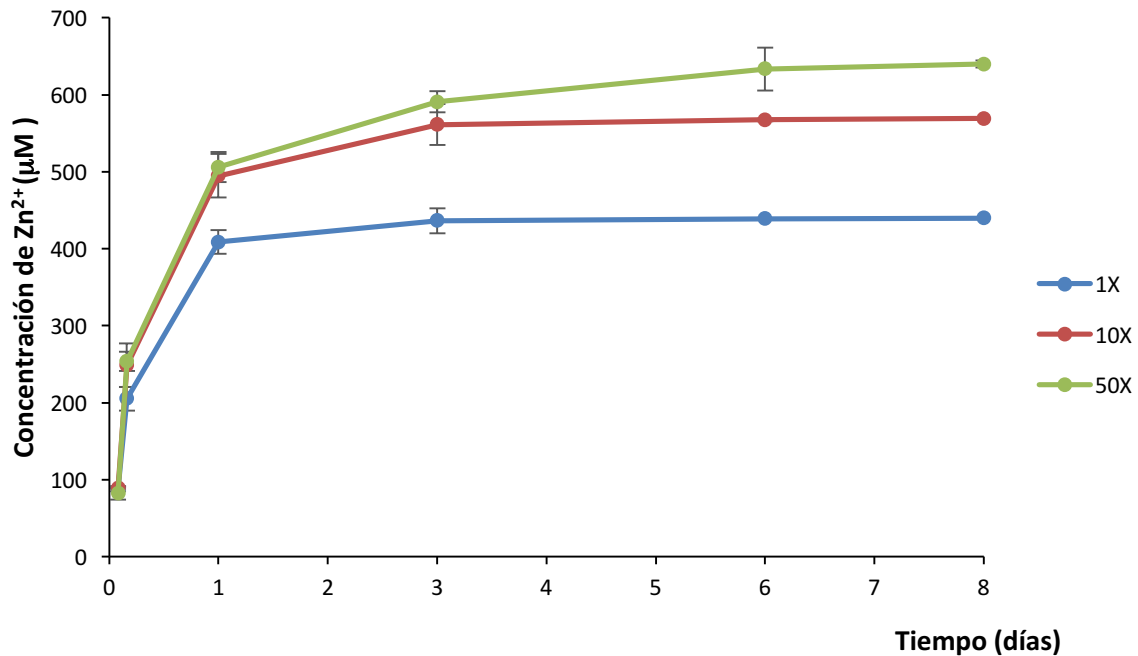
La liberación a tiempos más largos (3 a 8 días), puede observarse en la figura 22. No hay liberación de las regiones transparentes de los films, por lo que únicamente se han representado los valores correspondientes a las zonas opacas.



**Figura 22.** Representación gráfica de la liberación de zinc a 1, 3 y 8 días de inmersión, correspondiente a las zonas opacas de los films para las disoluciones de zinc 1X, 10X y 50X.

En las zonas opacas, el máximo de la liberación se alcanza a los 3 días, como se puede observar en la figura 23 donde se ha representado un gráfico acumulativo de la cantidad de zinc liberado durante los 8 días en los que se simula el cultivo. Hasta llegar a los 3 días la liberación es rápida y se liberan grandes cantidades de zinc alcanzando concentraciones superiores a 400 µM. Cuando se alcanza este punto, la velocidad de liberación disminuye, manteniéndose prácticamente constante hasta alcanzar los 8 días.

Estas altas concentraciones de zinc, que son citotóxicas para los precursores neurales obtenidos mediante la diferenciación de células madre embrionarias de ratón, son debidas a que todo el zinc se encuentra en la zona opaca. Por tanto, la liberación es mucho mayor de la esperada en una emulsión homogénea, donde los valores no serían tan elevados. Incluso los films con la emulsión realizada con la menor concentración de zinc (1X) liberarían una concentración tóxica para las células.



**Figura 23.** Representación gráfica de la liberación de zinc acumulativa de las zonas opacas durante los 8 días de la simulación del cultivo.

En conclusión, el sistema de liberación no es adecuado para el cultivo celular, debido a su falta de uniformidad que dificulta la predicción de su comportamiento como vehículo de liberación. Esta falta de homogeneidad es debida a la inestabilidad de la emulsión entre el agua y el cloroformo.

En trabajos posteriores sería interesante emplear disolventes diferentes u otro tipo de técnicas. Por un lado, podría disolverse el PLLA en un solvente como el dioxano, que es miscible en agua (donde se habrían disuelto las sales de  $ZnCl_2$ ) con la mezcla posterior de ambas disoluciones, dando lugar a una mezcla estable. Por otro lado, se podría emplear etanol para disolver la sal de cloruro de zinc, ya que el etanol y el cloroformo también son miscibles y ambos se evaporarían durante la extracción del disolvente.

## 5. CONCLUSIONES

Se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El protocolo empleado para la de diferenciación de los cuerpos embrioides a neurosphere-like bodies basado en el empleo de medio E.DMEM + 0,5  $\mu\text{M}$  de ácido retinoico durante 8 días resulta óptimo para la obtención de precursores neurales con un grado de diferenciación adecuado para testar el posterior efecto del zinc sobre la diferenciación neural.
2. Concentraciones iguales o superiores a 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  presentan un efecto citotóxico sobre los precursores neurales sembrados en condiciones de diferenciación con medio de diferenciación neural. Las concentraciones iguales o inferiores a 20  $\mu\text{M}$  de dicho ion no son tóxicas en periodos largos de tiempo (7 días) y no afectan negativamente en términos de proliferación.
3. Respecto a la diferenciación de los precursores neurales en presencia de iones zinc, los resultados preliminares indican que la concentración 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición control en cuanto a la expresión de los marcadores GFAP y  $\beta\text{III}$ -tubulina. Sin embargo, la concentración 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  aumenta el ratio entre células  $\beta\text{III}$ -tubulina y GFAP positivas.
4. Los films producidos por *solvent casting* mediante la emulsión no son adecuados para el cultivo celular debido a su falta de homogeneidad, lo que dificulta la predicción de su comportamiento como vehículo de liberación de iones zinc. Es necesario realizar nuevos ensayos con nuevos disolventes para conseguir una emulsión más estable que dé lugar a films uniformes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

ANDREINI, C., BANCI, L., BERTINI, I. AND ROSATO, A. (2006). Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. *J. Proteome Res.*, 5(1): 196-201.

ASSUNÇÃO-SILVA, R., GOMES, E., SOUSA, N., SILVA, N. AND SALGADO, A. (2015). Hydrogels and Cell Based Therapies in Spinal Cord Injury Regeneration. *Stem Cells International*, 2015: 1-24.

ATAR, D., BACKX, P., APPEL, M., GAO, W. AND MARBAN, E. (1995). Excitation-Transcription Coupling Mediated by Zinc Influx through Voltage-dependent Calcium Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 270(6): 2473-2477.

BAIN, G., KITCHENS, D., YAO, M., HUETTNER, J. AND GOTTLIEB, D. (1995). Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. *Developmental Biology*, 168(2): 342-357.

BAIN, G., RAY, W., YAO, M. AND GOTTLIEB, D. (1996). Retinoic Acid Promotes Neural and Represses Mesodermal Gene Expression in Mouse Embryonic Stem Cells in Culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223(3): 691-694.

BARNABÉ-HEIDER, F., GÖRITZ, C., SABELSTRÖM, H., TAKEBAYASHI, H., PFRIEGER, F., MELETIS, K. AND FRISÉN, J. (2010). Origin of New Glial Cells in Intact and Injured Adult Spinal Cord. *Cell Stem Cell*, 7(4): 470-482.

BETTGER, W. AND O'DELL, B. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences*, 28(13): 1425-1438.

BIBEL, M., RICHTER, J., SCHRENK, K., TUCKER, K., STAIGER, V., KORTE, M., GOETZ, M. AND BARDE, Y. (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nature Neuroscience*, 7(9): 1003-1009.

BROWN, H., PEERSON, J., ALLEN, L., RIVERA, J. (2002). Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of pre-pubertal children: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *J. Nutrition*, 7: 1062-71.

CUAJUNGCO, M. AND LEES, G. (1997). Zinc Metabolism in the Brain: Relevance to Human Neurodegenerative Disorders. *Neurobiology of Disease*, 4(3-4): 137-169.

FITCH, M. AND SILVER, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental Neurology*, 209(2): 294-301.

FORTUNATI, E., LATTERINI, L., RINALDI, S., KENNY, J. AND ARMENTANO, I. (2011). PLGA/Ag nanocomposites: in vitro degradation study and silver ion release. *J Mater Sci: Mater Med*, 22(12): 2735-2744.

FREDERICKSON, C., KOH, J. AND BUSH, A. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6): 449-462.

FREDERICKSON, C., MARET, W. AND CUAJUNGCO, M. (2004). Zinc and Excitotoxic Brain Injury: A New Model. *The Neuroscientist*, 10(1): 18-25.

GAGE, F. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457): 1433-1438.

- GAO, Y., YANG, Z. AND LI, X. (2016). Regeneration strategies after the adult mammalian central nervous system injury—biomaterials. *Regenerative Biomaterials*, 3(2): 115-122.
- GARLOTTA, D. (2002). A literature Review of Poly (Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2): 63-84.
- GOLDEN, B. E. (1989) Zinc in cell division and tissue growth: Physiological aspects. In: Zinc in Human Biology, (C. F. Mills, Ed.), pp. 119–128. Springer-Verlag, London.
- GONÇALVES, C., CONCLI LEITE. M. AND NARDIN, P.(2008). Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry*, 41(10-11):755-763.
- HAASE H, MARET W (2005) Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals*, 18: 333–338
- HARTMANN, M.H. AND KAPLAN, D.L. (1998), *Biopolymers from Renewable Resources*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 367–411.
- HO, E., LOWMAN, A. AND MARCOLONGO, M. (2006). Synthesis and Characterization of an Injectable Hydrogel with Tunable Mechanical Properties for Soft Tissue Repair. *Biomacromolecules*, 7(11): 3223-3228.
- HOPPE, A., GÜLDAL, N. AND BOCCACCINI, A. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11): 2757-2774.
- HUANG, L., HU, J., LANG, L., WANG, X., ZHANG, P., JING, X., WANG, X., CHEN, X., LELKES, P. AND MACDIARMID, A. (2007). Synthesis and characterization of electroactive and biodegradable ABA block copolymer of polylactide and aniline pentamer. *Biomaterials*, 28(10): 1741-1751.
- JAIN, A., KIM, Y., MCKEON, R. AND BELLAMKONDA, R. (2006). In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury. *Biomaterials*, 27(3): 497-504.
- KIM, M., HABIBA, A., DOHERTY, J., MILLS, J., MERCER, R. AND HUETTNER, J. (2009). Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. *Developmental Biology*, 328(2): 456-471.
- KODE, J., MUKHERJEE, S., JOGLEKAR, M. AND HARDIKAR, A. (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 11: 377–391.
- KOKAIA, Z., MARTINO, G., SCHWARTZ, M. AND LINDVALL, O. (2012). Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? *Nat Neurosci.*, 15: 1078–1087.
- LEROU, P. AND DALEY, G. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev.*, 19: 321–331.
- LI, X., YANG, Z., ZHANG, A., WANG, T. AND CHEN, W. (2009). Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats. *Biomaterials*, 30(6): 1121-1132.

LI, Y., HOUGH, C. J., FREDERICKSON, C. J. & SARVEY, J. M. (2001). Induction of mossy fiber Ca<sup>3</sup> long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn<sup>2+</sup>. *Journal of Neuroscience*. 21: 8015–8025

LIN, H., SUNG, K. AND VONG, W. (2004). In Situ Gelling of Alginate/Pluronic Solutions for Ophthalmic Delivery of Pilocarpine. *Biomacromolecules*, 5(6): 2358-2365.

MARET, W. AND VALLEE, B. (1998). Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7): 3478-3482.

MARET, W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *Nutrition*, 130 (5): 145–148.

MARET, W., JACOB, C., VALLEE, B. AND FISCHER, E. (1999). Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5): 1936-1940.

MASKE, H. (1955). Über den topochemischen Nachweis von Zink im Ammonshorn verschiedener Säugetiere. *Die Naturwissenschaften*, 42(14): 424-424.

MOTHE, A. AND TATOR, C. (2005). Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience*, 57(12): 583-587.

ORIVE, G., ANITUA, E., PEDRAZ, J. AND EMERICH, D. (2009). Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9): 682-692.

PALMITER, R. AND HUANG, L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5): 744-751.

Perkin Elmer. (2010). Thermogravimetric Analysis (TGA ) A Beginner's Guide. Analysis, 1–19. Retrieved from [www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)

PIANTINO, J., BURDICK, J., GOLDBERG, D., LANGER, R. AND BENWITZ, L. (2006). An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 201(2): 359-367.

PRASAD, A.S. 1995. Zinc: an overview. *J. Nutrition*, 11: 93–99.

REYNOLDS, B. AND WEISS, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052): 1707-1710.

RICO, P., RODRIGO-NAVARRO, A. AND SALMERÓN-SÁNCHEZ, M. (2015) Borax-loaded PLLA for promotion of myogenic differentiation. *Tissue Engineering Part A*, 21(21-22): 2662-2672.

RONEY, C., KULKARNI, P., ARORA, V., ANTICH, P., BONTE, F., WU, A., MALLIKARJUANA, N., MANOHAR, S., LIANG, H., KULKARNI, A., SUNG, H., SAIRAM, M. AND AMINABHAVI, T. (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood–brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 108(2-3): 193-214.

RUSH, R. AND YOE, J. (1954). Colorimetric Determination of Zinc and Copper with 2-Carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzene. *Analytical Chemistry*, 26(8): 1345-1347.

- SÄBEL, C., NEUREUTHER, J. AND SIEMANN, S. (2010). A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Analytical Biochemistry*, 397(2): 218-226.
- SCHRANTZ, N., AUFFREDOU, N., BOURGEADE, M., BESNAULT, L., LECA, G. AND VAZQUEZ, A. (2001). Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in the human Burkitt lymphoma B cells (Ramos). *Cell Death Differ.*, 8(2):152-161.
- SOFRONIEW, M. AND VINTERS, H. (2009). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1):7-35.
- SPAHL, D., BERENDJI-GRUN, D., SUSCHEK, C., KOLB-BACHOFEN, V. AND KRONCKE, K. (2003). Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: Nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn<sup>2+</sup> release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24): 13952-13957.
- SETEINER, J., BERNSTEIN. H., BIELAU. H., MAWRIN. C., KEILHOFF. G. AND BOGERTS. G. (2007). Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *Akt Neurol.*, 34 (2): 537-539
- STRÜBING, C., AHNERT-HILGER, G., SHAN, J., WIEDENMANN, B., HESCHELER, J. AND WOBUS, A. (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mechanisms of Development*, 53(2): 275-287.
- TAM, R., FUEHRMANN, T., MITROUSIS, N. AND SHOICHET, M. (2013). Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases: a Biomaterials Approach. *Neuropsychopharmacology*, 39(1): 169-188.
- TAYLOR, K. (2008). A distinct role in breast cancer for two LIV-1 family zinc transporters. *Biochim. Soc. Trans.*, 36(6): 1247-1251.
- TAYLOR, K. AND NICHOLSON, R. (2003). The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1-2): 16-30.
- TAYLOR, K., MORGAN, H., JOHNSON, A. AND NICHOLSON, R. (2004). Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochem. J.*, 377(1): 131-139.
- TORCHILIN, V. (2006). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(14): 1532-1555.
- VALLEE, B. (1995). The function of metallothionein. *Neurochemistry International*, 27(1): 23-33.
- VALLEE, B. AND FALCHUK, K. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73:79–118.
- VALLEE, B., COLEMAN, J. AND AULD, D. (1991). Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(3): 999-1003.
- VON BULOW, V., RINK, L. AND HAASE, H. (2005). Zinc-Mediated Inhibition of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity and Expression Suppresses TNF- and IL-1 Production in Monocytes by Elevation of Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate. *The Journal of Immunology*, 175(7): 4697-4705.

WILLERTH, S.M. (2011). Neural tissue engineering using embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.*, 2: 17.

WILLIAMS, R. J. P. (1989) An introduction to the biochemistry of zinc. In: Zinc in Human Biology (C. F. Mills, Ed.), pp. 15–31. Springer- Verlag, London.

XIAO, L., WANG, B., YANG, G. AND GAUTHIER, M. (2012). Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, 123: 433-435.

XIE, X. AND SMART, T. (1994). Modulation of long-term potentiation in rat hippocampal pyramidal neurons by zinc. *Pflugers Arch.*, 427(5-6): 481-486.

YAMASAKI, S., SAKATA-SOGAWA, K., HASEGAWA, A., SUZUKI, T., KABU, K., SATO, E., KUROSAKI, T., YAMASHITA, S., TOKUNAGA, M., NISHIDA, K. AND HIRANO, T. (2007). Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol*, 177(4): 637-645.

YAMASHITA, S., MIYAGI, C., FUKADA, T., KAGARA, N., CHE, Y. AND HIRANO, T. (2004). Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*, 429(6989): 298-302.

YANG, Q., HOU, X., HAMBERGER, A., DAHLSTRÖM A. AND HAGLID. K. S-100 $\beta$  immunoreactivity in neurones of the rat peripheral sensory ganglia (1995). *NeuroReport.*, 6(15): 2005-2009.



## 7. ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO

- **K.DMEM:** Knockout DMEM (Life technology, Paisley, Escocia)
  - 10% Knockout Serum Replacement (life technology, Paisley, Escocia)
  - Suero Fetal Bovino (Biowest, Nuaille, Francia)
  - Nucleosidos 100X (Millipore, Darmstadt, Alemania)
  - Penicilina/Estreptomicina (life technology, Bleiswijk, Países Bajos)
  - Aminoácidos no esenciales (Millipore, Darmstadt, Alemania)
  - L-glutamina (Millipore, Darmstadt, Alemania)
  - Factor inhibidor de leucemia (Millipore, Darmstadt, Alemania)
  - 0,2% 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España)

} 1% v/v
- **E.DMEM:** DMEM with 4,5 g/L glucose, w/o L-Glutamin (Lonza, Madrid, España)
  - 10% Knockout Serum Replacement
  - 1% Suero Fetal bovino
  - Nucleosidos 100X
  - Penicilina/Estreptomicina
  - Aminoácidos no esenciales
  - L-glutamina
  - 0,2 % v/v Beta-mercaptoetanol

} 1% v/v
- **Medio libre de suero (SFD):** DMEM/F12 (1:1) w/o L-glutamina (Fisher, Madrid, España)
  - Suplemento N2 a 1X (Invitrogen, Paisley, Escocia)
  - Albúmina de suero bovino a 10 ug/mL (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
  - Hidrocortisona 20 nM (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
  - Penicilina/Estreptomicina al 1% v/v
  - L-glutamina al 1% v/v
  - Embryomax Nucleosidos 100X al 1% v/v
- **Medio de diferenciación (DF)**
  - Medio control: DMEM/F12 (1:1) w/o L-glutamina
    - Glucosa al 30% w/v (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
    - Bicarbonato Sódico (NaHCO<sub>3</sub>) al 7,5% w/v (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
    - HEPES 1M (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
    - L-Glutamina 100X
    - Hormone Mix 10X
    - Penicilina/Estreptomicina al 2% v/v
  - 0,2% v/v Heparina (*Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa*, Sigma-Aldrich, Madrid, España)
  - Suero Fetal Bovino al 1% v/v
  - FGF 10 ng/mL (Eurobio, Courtaboeuf, Francia)