

Trabajo Final de Grado

Valencia, junio de 2017

DESARROLLO DE UN SCAFFOLD CELULAR PARA UN MODELO DE LESIÓN MEDULAR.

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural.

Universitat Politècnica de València

Curso 2016-2017

Tamara Lapeña Luzón



Tutor:

Rafael Sirera Pérez

Tutor externo:

Manuel Monleón Pradas

Cotutor externo:

Cristina Martínez Ramos



RESUMEN

Datos del Trabajo Final de Grado:

Título del TFG:	“Desarrollo de un <i>scaffold</i> celular para un modelo de lesión medular”
Autor:	Tamara Lapeña Luzón
Lugar de realización:	Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT)
Titulación:	Grado en Biotecnología
Tutor académico:	Dr. Rafael Sirera Pérez
Tutor externo:	Dr. Manuel Monleón Pradas
Cotutor externo:	Dra. Cristina Martínez Ramos
Lugar y fecha:	Valencia, Junio 2017

Resumen:

Las lesiones de la médula espinal son un problema que presenta múltiples consecuencias a nivel sanitario, social y económico. Estas alteraciones provocan una pérdida de la función motora y sensorial por debajo de la zona donde se ha producido el daño, ocasionando una disminución de la calidad de vida de las personas que la padecen. Además, el sistema nervioso presenta escasa capacidad de reparación, siendo la misma incluso inferior en el caso del sistema nervioso central, de manera que la función de la médula espinal no se recuperará a lo largo de la vida del paciente.

Durante muchos años, se han desarrollado distintas aproximaciones que han intentado solucionar este problema. Sin embargo, ninguna ha conseguido reestablecer por completo la función neural, debido a los complejos procesos que intervienen en esta patología impidiendo la regeneración.

Por tanto, con el objetivo de regenerar las vías axonales dañadas tras una lesión medular aguda o crónica, se propone el desarrollo de un *scaffold* de ácido hialurónico o quitosano, que presente una estructura tubular capaz de vehicular y proteger a las células que puedan ser sembradas en su interior, y que esté adaptado a las características anatómicas de un modelo animal de la lesión. El material será caracterizado desde una perspectiva morfológica y biológica para comprobar su validez.

Palabras clave:

Ingeniería tisular, lesión medular, *scaffold*.

Abstract:

Spinal cord injury is a problem with multiple health, social and economic consequences. These alterations cause a loss of motor and sensory function below the area where the damage occurred, causing a decrease in the quality of life of the people who suffer it. Besides, the nervous system has little repair capacity, which is even more palpable in central nervous system, so spinal cord function won't be recovered throughout the patient's life.

For many years, different approaches have been developed to solve this problem. However, none of them have been successful, due to the complex processes involved in this pathology preventing regeneration.

Therefore, with the aim of solving acute or cronic spinal cord injury, it is proposed the development of a scaffold of hyaluronic acid or chitosan, which has a tubular structure where cells can live inside. This scaffold must be adapted to the anatomical characteristics of an animal model of the lesion. The material will be characterized from a morphological and biological perspective to check its validity.

Key words:

Tissue engineering, spinal cord injury, scaffold.

“Era el mejor de los tiempos, era el peor de los tiempos; la edad de la sabiduría, y también de la locura; la época de las creencias y de la incredulidad; la era de la luz y de las tinieblas; la primavera de la esperanza y el invierno de la desesperación”

Charles Dickens

AGRADECIMIENTOS

No puedo terminar esta etapa de mi vida sin agradecer a todas las personas que me han acompañado a lo largo de estos cuatro años y, en especial, a los que lo han hecho durante la realización de este trabajo.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Manolo por permitirme ser partícipe de este apasionante proyecto, y a Cristina por su dedicación con los alumnos y, sobre todo, por su tiempo. También, a Rafael Sirera por su disponibilidad, así como al resto de personas que se han encargado de formarnos en lo profesional y, a veces, en lo personal.

En segundo lugar, agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la concesión de la Beca de Colaboración con la que he podido realizar este trabajo, y a los proyectos *MINECO (MAT2015-66666-C3-1-R) "Biohíbridos para la promoción del crecimiento axonal y la regeneración en el sistema nervioso central y periférico"*, y *EXPLORA, MINECO (DPI2015-72863-EXP) "Neurocables modulares: multiplicando conexiones neurales"*.

Quisiera también agradecerse a todos los compañeros del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular porque nunca faltaba alguien dispuesto a echarme una mano cuando hacía falta.

Por otra parte, esto no hubiera sido lo mismo sin mis compañeros de clase con los que he compartido buenos y malos momentos. Mención aparte merecen Javi, Andrés y David por tener que soportarme en los interminables trabajos y escuchar sin protestar todas mis quejas. En especial gracias a ti, que me contagias tu espíritu soñador, no podía haber elegido mejor compañero de camino.

No puedo olvidarme tampoco de mis amigas de siempre, Inés y Ana Rus, por escuchar mis pequeños problemas cada día, además del resto de personas de ese gran grupo de amigos que formamos hace ya tantos años.

Por último, agradecer a mi familia todo el esfuerzo realizado durante estos cuatro años para que yo cumpliera mis sueños, por darme ánimos cuando las ganas decaían, y por ilusionaros, incluso más que yo, con mis proyectos y mis logros.

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de la varianza.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.

CHT: Quitosano.

CN: Control positivo.

CP: Control negativo.

DVS: Divinil sulfona.

DMEM: Medio *Eagle* modificado por Dulbecco.

DPBS: Tampón fosfato salino de Dulbecco.

FBS: Suero fetal bovino.

GDNF: Factor neurotrófico derivado de las células gliales.

HA: Ácido hialurónico.

NAG: Glicoproteína asociada a la mielina.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NGR1: Receptor neuronal Nogo-66 de tipo 1.

NSC: Células madre neurales.

OMGP: Glicoproteína mielina-oligodendrocito.

PB: Tampón fosfato.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCL: Policaprolactona.

PFA: Paraformaldehído.

PTFE: Politetrafluoroetileno.

RHOA: Miembro A de la familia génica Ras-homóloga.

ROCK2: Proteína kinasa 2 asociada a Rho.

SD: Desviación típica.

SEM: Microscopio electrónico de barrido.

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Organización del Sistema Nervioso.....	1
1.2. Daño y reparación en el Sistema Nervioso.....	1
1.3. Lesión medular.....	3
1.3.1. Patofisiología.....	3
1.3.2. Consecuencias socio-sanitarias de una lesión medular.....	4
1.4. Estrategias en la reparación de la lesión medular.....	4
1.4.1. Moléculas bioactivas.....	4
1.4.2. Trasplante celular.....	5
1.4.3. Ingeniería tisular.....	6
1.5. Biomateriales.....	7
1.5.1. Ácido hialurónico.....	7
1.5.2. Quitosano.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Diseño experimental.....	10
3.2. Diseño de los moldes.....	11
3.3. Desarrollo del <i>scaffold</i>.....	12
3.3.1. <i>Scaffold</i> de ácido hialurónico.....	12
3.3.2. <i>Scaffold</i> de quitosano.....	13
3.4. Caracterización morfológica del <i>scaffold</i>.....	14
3.4.1. Dimensiones de las estructuras tubulares.....	14
3.4.2. Ensayo de hinchado.....	14
3.4.3. Microscopio electrónico.....	15
3.5. Cultivos celulares.....	15
3.5.1. Preparación de los materiales.....	15
3.5.2. Ensayo de citotoxicidad.....	15
3.5.3. Ensayo de adhesión.....	17
3.6. Análisis estadístico.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Obtención de los moldes.....	19
4.2. Caracterización morfológica.....	19
4.3. Cultivos celulares.....	25

4.3.1. Ensayo de citotoxicidad.....	25
4.3.2. Ensayo de adhesión.....	27
5. CONCLUSIONES.....	31
6. BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Respuesta ante un daño en el sistema nervioso periférico y central	2
Figura 2 Características que debería presentar el conducto para la regeneración nerviosa	7
Figura 3 Estructura química del ácido hialurónico.....	7
Figura 4 Estructura química del quitosano	8
Figura 5 Esquema del abordaje a seguir para la regeneración de la lesión medular.	11
Figura 6 Prototipos de los distintos tipos de moldes.....	12
Figura 7 Estructura química del genipin	14
Figura 8 Moldes empleados para la fabricación de los conductos tubulares.....	19
Figura 9 Estructuras tubulares obtenidas a partir de ácido hialurónico o quitosano.....	20
Figura 10 Dimensiones de los tubos de quitosano y ácido hialurónico para modelo animal de rata y perro.....	21
Figura 11 Comparación de estructuras tubulares en seco y tras someterlas al ensayo de hinchado.....	22
Figura 12 Imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido de la sección transversal y la superficie interna de los tubos fabricados a partir de ácido hialurónico y quitosano	24
Figura 13 Células cultivadas durante 72 horas en el extracto correspondiente del ensayo de citotoxicidad observadas al microscopio.	25
Figura 14 Resultado del ensayo de citotoxicidad MTT <i>in vitro</i> de conductos y films de quitosano según se especifica en la norma ISO 10993-5.....	26
Figura 15 Imágenes obtenidas en el microscopio confocal del lumen de los conductos tubulares fabricados para perro y para rata tras 10 días de cultivo con células de Schwann....	28
Figura 16 Imágenes obtenidas en el microscopio confocal del lumen de los conductos tubulares de quitosano fabricados para rata y para perro en los cuales se cultivaron células de Schwann de rata durante 10 días.....	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Organización del Sistema Nervioso.

El sistema nervioso se encarga de recibir estímulos sensitivos tanto del exterior como del interior del organismo, procesarlos y transmitir una respuesta a los órganos efectores.

Desde el punto de vista estructural, el sistema nervioso se divide fundamentalmente en dos partes: El Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC se encarga de procesar la información procedente de estímulos sensitivos y elaborar una respuesta. Está formado por el encéfalo y la médula espinal, que se encuentran protegidos por los huesos del cráneo y la columna vertebral, respectivamente. Además, se protegen también mediante membranas (meninges) y una solución amortiguadora (líquido cefalorraquídeo). Por su parte, el SNP se encarga de transportar los impulsos desde los receptores sensitivos hasta el SNC y, desde el SNC hasta las glándulas o los músculos efectores. Está formado por los nervios craneales, raquídeos, los ganglios relacionados con los nervios craneales y raquídeos, y los órganos receptores periféricos.

El sistema nervioso está compuesto de dos tipos celulares: neuronas y células de la glía. Las neuronas son el elemento funcional y estructural básico del sistema nervioso y consiste en un cuerpo celular, llamado soma, y sus extensiones, denominadas axón y dendritas. Respecto a las células de la glía, son células de soporte que ayudan a las neuronas e incluyen, entre otras, a las células de Schwann en el SNP, y a los astrocitos y oligodendrocitos en el SNC.

Las células de la glía son las encargadas de formar la vaina de mielina. La mielina protege y aísla las fibras y aumenta la velocidad de transmisión de los impulsos nerviosos. Los axones del SNP están mielinizados por las células de Schwann que se envuelven alrededor del axón formando una espiral apretada de membranas superpuestas. La última de estas membranas y la parte de citoplasma que envuelve se denomina neurilema ("cáscara neuronal"). En el sistema nervioso central, los oligodendrocitos son los encargados de formar las vainas de mielina. Sin embargo, en lugar de que cada célula rodee una porción de fibra nerviosa como hacen las células de Schwann, los oligodendrocitos se enrollan alrededor de múltiples fibras distintas a la vez, dando lugar a una vaina carente de neurilema. Este neurilema desempeña un papel importante en la regeneración de la fibra en el SNP (Marieb, 2009). Por otra parte, en el SNC encontramos la barrera hematoencefálica, que provoca que el SNC se encuentre más aislado que el SNP, ya que la barrera hematoencefálica no permite el paso de la mayor parte de sustancias que circulan por la sangre. Debido a esto, el SNC cuenta con sus propios macrófagos, llamados microglía (Perry & Teeling, 2013).

Las diferencias entre SNC y SNP son clave para entender la forma de actuar de ambos sistemas ante una lesión (Toy & Namgung, 2013).

1.2. Daño y reparación en el sistema nervioso.

La regeneración tras una lesión en el SNC es limitada, por lo que los déficits funcionales ocasionados por daños en la médula espinal, traumatismos craneoencefálicos, etc., persisten en

el tiempo. Sin embargo, en el SNP ocurre algo diferente, ya que en algunos casos es posible la regeneración de los nervios adultos y la recuperación de la función, pero está restringida a la regeneración de cortas distancias (Huebner & Strittmatter, 2009).

Ante una lesión en el SNP, el axón se fragmenta quedando un extremo distal (más lejano al soma), y un extremo proximal (más cercano al soma). El extremo distal comienza a degenerarse debido a la actividad proteasa y a la separación de las fuentes metabólicas del cuerpo celular, en un proceso conocido como degradación *walleriana* (Rotshenker, 2011). El citoesqueleto se fragmenta y, a continuación, se desintegra la membrana celular, seguido de la degradación de la mielina. Las células de Schwann comienzan a fagocitar la mielina y los desechos axonales, antes de que se recluten los macrófagos, gracias a las citocinas, que completarán la fagocitosis de todos los desechos (Sulaiman & Gordon, 2003).

En el extremo proximal del axón, el neurilema, membrana que envuelve a la mielina, no se degenera y es capaz de constituir un tubo hueco de regeneración que guía el crecimiento del axón (Verdú & Navarro, 1998). Los axones brotarán del extremo proximal y crecerán dentro del tubo a un ritmo aproximado de 1 mm al día, por lo que la recuperación puede durar meses. A medida que los axones se regeneren, las células de Schwann progresivamente irán remielinizando estos axones. La regeneración será completa cuando se restaure la funcionalidad fisiológica del nervio, lo que ocurrirá solo en los casos en los que la zona de contacto con el músculo no haya sufrido excesiva degeneración, o la lesión no sea demasiado grande (Gordon & Gordon, 2010)(Schmidt & Leach, 2003).

En el SNC de mamíferos, la regeneración es mínima o prácticamente inexistente (Horner & Gage, 2000). Esto se debe a que la respuesta fisiológica tras un daño en el SNC es diferente comparada con la respuesta del SNP, tal como se representa en la figura 1, existiendo varias causas que impiden la regeneración axonal y el restablecimiento de la función en el SNC.

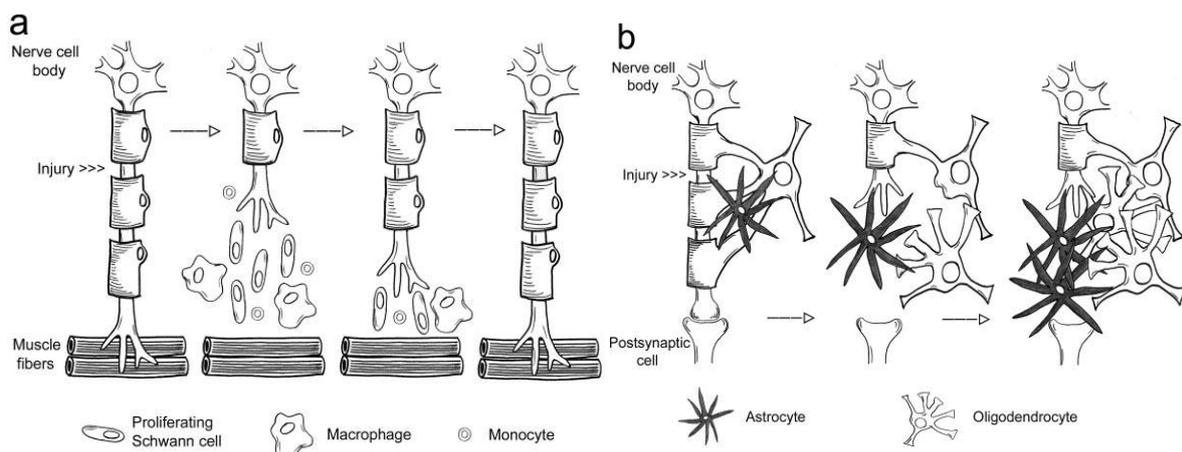


Figura 1 Respuesta ante un daño en el sistema nervioso periférico (a) y central (b) (Huang & Huang, 2006).

Una de las causas que impide la regeneración es la presencia de moléculas inhibitoras asociadas a la mielina. Esto se debe a que la microglía, encargada de realizar la fagocitosis en el SNC es demasiado lenta en eliminar la mielina del medio. Además, no se pueden reclutar a otras células fagocíticas debido a la barrera hematoencefálica. Debido a esto, la mielina se acumula

inhibiendo el crecimiento axonal (Mukhopadhyay et al., 1994). Por otra parte, los oligodendrocitos tratan de generar más mielina para envolver de nuevo a los axones agravando el problema. Entre las moléculas inhibitoras asociadas a la mielina se encuentran: Nogo-A, la glicoproteína asociada a la mielina (NAG), o la glicoproteína mielina-oligodendrocito (OMgp), que interactúan con el receptor neuronal Nogo-66 de tipo 1 (NgR1) impidiendo el crecimiento axonal (Cafferty et al., 2010).

Por otra parte, los astrocitos del SNC comienzan a proliferar, modifican su fenotipo y se convierten en “astrocitos reactivos”, que expresan una serie de factores inhibitorios y proteoglicanos que dan lugar a la cicatriz glial, que tiene como objetivo evitar que el daño se propague, aunque inhibe la regeneración del axón como efecto colateral. Entre estos proteoglicanos se encuentran los de condroitín sulfato, como el neurocano, el brevicano o el agrecano (Fawcett & Asher, 1999).

Además, existen otros inhibidores de la regeneración de los axones, que no están presentes en la mielina ni en la cicatriz glial. Parte de estos inhibidores activan a RhoA (miembro A de la familia génica Ras homóloga), que es una pequeña GTPasa, que permite la activación de ROCK2 (proteína quinasa 2 asociada a Rho), que regula la dinámica de la actina del citoesqueleto, cesando el crecimiento neural (Huebner & Strittmatter, 2009).

Por último, existen genes asociados a la regeneración, como GAP-43 y CAP-43, que se sobreexpresan cuando se produce una lesión en el SNC, lo que no ocurre tras una lesión en el SNC donde la sobreexpresión es mínima. Este hecho también podría ser responsable de la incapacidad del SNC para regenerarse (Huebner & Strittmatter, 2009).

1.3. Lesión medular.

1.3.1. Patofisiología.

La médula espinal está situada dentro del conducto vertebral de la columna vertebral, rodeada por tres membranas: la duramadre, la aracnoides y la piamadre, y bañada por el líquido cefalorraquídeo. Por tanto, la médula espinal se encuentra bien protegida, aunque no está exenta de daño si se ejerce la suficiente fuerza como para dañar las estructuras protectoras.

La lesión medular por traumatismo se produce cuando las vértebras se dañan y fragmentos rotos de hueso inciden en la médula espinal, que es muy blanda. También puede ocurrir por un desplazamiento del hueso o de los ligamentos. En este momento, los vasos sanguíneos y las membranas celulares de las neuronas se rompen y queda interrumpida la conexión axonal. A continuación, se produce una inflamación de la médula, que ocupará todo el diámetro del canal espinal a nivel de la lesión. Por consiguiente, se produce una reducción del flujo sanguíneo venoso, provocando una isquemia (McDonald et al., 2014). Esta situación inicia una cascada de eventos secundarios que dañan el tejido e incrementan el tamaño de la lesión. Las células dañadas liberan sustancias químicas nocivas que afectan a las células vecinas sanas, en un proceso conocido como necrosis excitotóxica, en el que el glutamato presenta un papel importante al acumularse tras el daño medular y sobreexcitar a las neuronas. Las células sobreexcitadas dejan entrar grandes cantidades de iones calcio, que desencadenan una serie de eventos destructivos para las células, como la formación de radicales libres. De esta forma se

produce la apoptosis de las células, que provoca la formación de un agujero en el centro de la médula espinal, que da lugar a una cavidad quística. A lo largo de las siguientes semanas, se produce la pérdida de oligodendrocitos, provocando que los axones se desmielinicen y pierdan su función al no poder conducir el impulso nervioso (Sadowsky et al., 2002).

1.3.2. Consecuencias socio-sanitarias de una lesión medular.

Según la Organización Mundial de la Salud, entre 250.000 y 500.000 personas sufren cada año en todo el mundo lesiones medulares, siendo hasta el 90% de las mismas producidas por traumatismos, generalmente accidentes de tráfico, caídas o actos de violencia; mientras que el resto se deben a enfermedades, o a degeneración de la función nerviosa, que puede ocurrir, por ejemplo, a causa de un tumor.

Las consecuencias a nivel sintomático de una lesión medular dependen del nivel al que esté dañada la médula. Por ejemplo, las lesiones que suceden en el cuello producen tetraplejía, mientras que las lesiones ocurridas en la zona torácica o lumbar pueden causar paraplejía. En su forma más grave, la lesión medular puede ocasionar parálisis completa y problemas para controlar la función del intestino, la vejiga, la respiración, el ritmo cardiaco y la tensión arterial. Además, la mayoría de personas con lesiones medulares sufren dolor crónico y un mayor riesgo de padecer otras enfermedades, por ejemplo, espasmos musculares, infecciones urinarias, trombosis venosas, etc.

Por otra parte, las lesiones medulares tienen consecuencias también a nivel económico y social. La solución de este problema, por tanto, resulta de gran interés socio-sanitario (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

1.4. Estrategias en la reparación de la lesión medular.

Actualmente, el tratamiento para las lesiones medulares incluye dosis altas de metilprednisolona, intervenciones quirúrgicas que permiten estabilizar y descomprimir la médula, y rehabilitación. Sin embargo, no hay ningún tratamiento existente que demuestre una recuperación significativa de la función neuronal en los pacientes, aunque sí existen multitud de estudios y ensayos que parecen poder poner una solución a este problema. Dada la complejidad del proceso que ocurre tras una lesión medular, los abordajes para tratar este daño han sido diversos.

1.4.1. Moléculas bioactivas.

La terapia molecular se centra principalmente en modular la respuesta inflamatoria, bloquear los inhibidores que impiden la regeneración axonal y administrar los factores necesarios para estimular el crecimiento (Silva et al., 2014).

La metilprednisolona es un corticoesteroide que fue propuesto para inhibir la respuesta inflamatoria producida tras una lesión medular. Sin embargo, su uso ha generado controversia, y se ha puesto en duda su efectividad y su seguridad (Evaniew *et al.*, 2015). En la misma línea,

han surgido otros fármacos como la minociclina, que es un antibiótico antiinflamatorio y antiapoptótico (Aras *et al.*, 2015). Otras aproximaciones terapéuticas han sido el uso de citocinas antiinflamatorias como la interleucina 10 (Bethea *et al.*, 1999), o el uso de antiinflamatorios no esteroideos capaces de reducir la actividad de RhoA, como el ibuprofeno (Xingxing Wang *et al.*, 2009).

Respecto a los fármacos capaces de bloquear a los inhibidores que impiden la regeneración axonal, se encuentran el anticuerpo anti-Nogo-A (Fouad *et al.*, 2004), el péptido antagonista de Nogo (GrandPré *et al.*, 2002), o la condroitinasa ABC, que permite degradar los proteoglicanos condroitín sulfato (Bradbury *et al.*, 2002).

Por otra parte, también se ha propuesto la administración externa de factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), o neurotrofinas (NT3, NT4 y NT5) (Awad *et al.*, 2015).

Sin embargo, ninguna de estas terapias ha sido capaz de regenerar la función neural.

1.4.2. Trasplante celular.

Otra de las estrategias utilizadas para el tratamiento de la lesión medular es el trasplante celular, que pretende reemplazar las células muertas, permitir la reconexión de los circuitos nerviosos, y crear un ambiente favorable para la regeneración axonal (Thuret *et al.*, 2006).

Las células de Schwann se plantearon como candidatas para el trasplante celular, ya que juegan un papel muy importante en la reparación de daños en el SNP. Estas células remielinizan los axones dañados, además de ser capaces de secretar factores de crecimiento, como el NGF, y componentes de la matriz extracelular, lo cual contribuye a la regeneración axonal. Sin embargo, se ha observado que, en el SNC, los axones no terminan de regenerarse debido a la naturaleza inhibitoria de la cicatriz glial (Oudega & Xu, 2006).

También, se han realizado estudios con células olfativas envainadas autólogas (Mackay-Sim, 2005). Estas células son una población de macroglía encontrada en la mucosa olfativa, que parecen ser capaces de estimular el crecimiento de los axones. En humanos, se han realizado ya ensayos utilizando este tipo de células y, aunque se han conseguido mejoras, no se ha logrado recuperar la función neurológica (Tabakow *et al.*, 2013).

Otra estrategia estudiada ha sido la de trasplantar macrófagos activados por exposición a fragmentos de nervio periférico, con resultados similares a los descritos con otros tipos celulares (Rapalino *et al.*, 1998).

El trasplante de células madre también ha sido propuesto como tratamiento. Las células madre neurales (NSC) son capaces de diferenciarse a neuronas y a células de la glía, de manera que podrían regenerar la población celular perdida a causa de la lesión. Una de las limitaciones de esta terapia es conseguir que las células madre se diferencien y que, además, lo hagan a neuronas y no al linaje glial. En ratones tratados con NSC y ácido valproico, para conseguir la diferenciación de las NSC a neuronas, se ha observado una gran mejora funcional de los miembros posteriores, pero sin conseguir una recuperación total (Abematsu *et al.*, 2010). También se ha planteado el uso de células madre embrionarias. Sin embargo, el uso de estas

células plantea un debate ético en la sociedad. Además, tampoco son totalmente seguras puesto que pueden dar lugar a teratomas, y, desde el punto de vista técnico, habría que preferenciarlas en el laboratorio. Otro posible tipo celular a utilizar serían las células madre pluripotenciales inducidas (iPS), aunque todavía no existen estudios suficientes que confirmen la viabilidad de su uso y la seguridad (Silva *et al.*, 2014).

Debido al fracaso de las técnicas de trasplante celular, que no han conseguido reestablecer la función nerviosa, se han desarrollado estrategias combinatorias como terapia.

1.4.3. Ingeniería tisular.

Una alternativa prometedora en este ámbito es la ingeniería tisular, que fue definida por primera vez como “un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan, o mejoren la función del tejido” (Langer & Vacanti, 1993). Lo que se pretende es, por tanto, regenerar el tejido dañado usando tres principales componentes: *scaffold* o estructura soporte, células y factores de crecimiento.

El *scaffold* aporta una estructura que debe poder ser invadida por las células, de manera que a partir de ahí comience a regenerarse el tejido, ayudado por los factores de crecimiento o moléculas que estimulen dicha regeneración (Chan & Leong, 2008). Para que esto ocurra en el sistema nervioso, el *scaffold* tiene que presentar unas características concretas (Hutmacher, 2000)(Schmidt & Leach, 2003):

- a) Poseer unas propiedades mecánicas adecuadas, de manera que sea posible la realización de una estructura tubular, que se adapte al tracto nervioso, de las dimensiones requeridas.
- b) Ser esterilizable.
- c) Presentar una estructura porosa con poros interconectados entre sí para permitir el paso de nutrientes y metabolitos, sin comprometer la estabilidad mecánica del *scaffold*. Sin embargo, los poros no deben permitir la salida de las células al exterior.
- d) Ser biocompatible, y biodegradable, aunque debe mantener la estructura hasta ser sustituido por el nuevo tejido.
- e) Ser capaz de albergar células en su interior y permitir su crecimiento.

En la figura 2 se muestran alguna de estas y otras características que debería presentar el conducto tubular ideal que promoviera la recuperación tras una lesión medular.

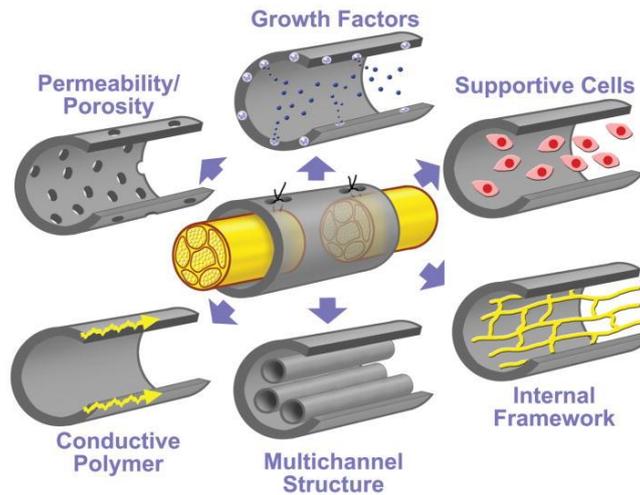


Figura 2 Características que debería presentar el conducto para la regeneración nerviosa (de Ruiter et al., 2009).

Los materiales que se han utilizado para fabricar los *scaffolds* y conseguir la regeneración nerviosa han sido variados. Por una parte, se encuentran los naturales, por ejemplo, laminina, fibronectina, colágeno, ácido hialurónico, agarosa, alginato, o quitosano (Q. Zhang *et al.*, 2016)(Han *et al.*, 2014)(Stokols & Tuszynski, 2004)(Rao *et al.*, 2015). También, se ha intentado promover la regeneración neural con *scaffolds* construidos a partir de materiales sintéticos, como la policaprolactona, el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico, el ácido poli-láctico-glicólico, o el polietilenglicol (Donoghue *et al.*, 2013)(Teng *et al.*, 2002).

1.5. Biomateriales.

1.5.1. Ácido hialurónico.

El ácido hialurónico (HA) es un glucosaminoglucano natural lineal formado por disacáridos repetidos de β -1,4-D-ácido glucurónico y β -1,3-N-acetil-D-glucosamina, tal como se muestra en la figura 3. El HA se encuentra presente en todos los vertebrados, siendo uno de los principales componentes de la matriz extracelular, aunque también se puede obtener de bacterias a través de la fermentación (Collins & Birkinshaw, 2013). Debido a sus propiedades, se ha convertido en

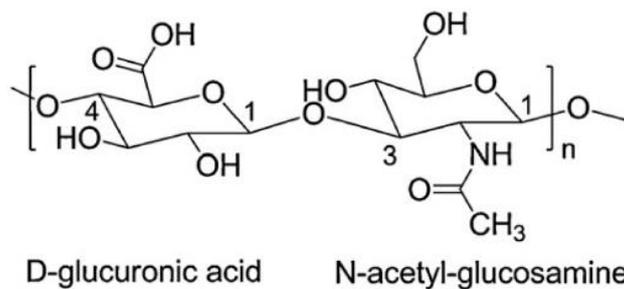


Figura 3 Estructura química del ácido hialurónico. Los números indican los sitios susceptibles de modificación química (Schanté *et al.*, 2011).

uno de los principales polímeros utilizados en ingeniería tisular y medicina regenerativa en los últimos años (Allison & Grande-Allen, 2006).

En solución acuosa, forma disoluciones viscosas sin llegar a formar un gel, a pesar de que presenta gran capacidad de formar puentes de hidrógeno con el agua. Sin embargo, se puede modificar fácilmente, lo que permite aumentar la viscosidad y formar redes tridimensionales (hidrogeles), de manera que puede dar lugar a estructuras sólidas (Z. Zhang et al., 2014). Por otra parte, el HA presenta una alta biocompatibilidad y una baja inmunogenicidad. Además, los geles de HA tienen un efecto antiinflamatorio e inhibitorio de la activación de astrocitos, por lo que reducen la formación de la cicatriz glial (X. Wang et al., 2012).

1.5.2. Quitosano.

El quitosano (CHT) es un polímero lineal, formado por unidades de D-glucosamina unidas mediante enlaces β -(1-4), que se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, que se encuentra de manera natural en el exoesqueleto de los crustáceos, aunque también puede ser generado por fermentación fúngica. Generalmente, el grado de desacetilación que presenta no es del 100%, por lo que quedan algunos residuos de N-acetil-D-glucosamina, como se observa en la figura 4.

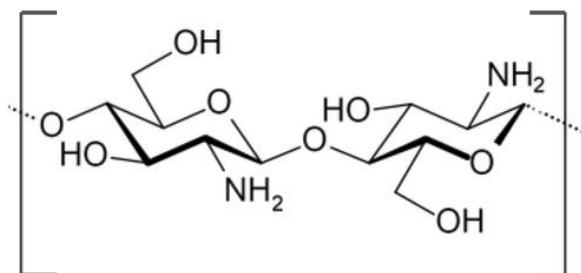


Figura 4 Estructura química del quitosano (Younes & Rinaudo, 2015).

El quitosano es soluble en disolventes ácidos ($\text{pH} < 6$), debido a la protonación de los grupos amino, lo que, por otra parte, le permite formar complejos iónicos con aquellas moléculas cargadas negativamente, como pueden ser el DNA o las proteínas. Además, presenta baja inmunogenicidad, es biodegradable y no presenta toxicidad, por lo que ha sido utilizado en otras aplicaciones como biomaterial, por ejemplo, para crear lentes de contacto, o piel artificial (Li et al., 1992). Por otra parte, el quitosano tiene efectos analgésicos, y actividad antimicrobiana, posiblemente por la unión del mismo a la superficie celular de los microorganismos, lo que alteraría su permeabilidad (H. M. Ibrahim & El- Zairy, 2015). Respecto al daño en el sistema nervioso, se ha comprobado que el quitosano es capaz de restaurar la integridad de las membranas dañadas como consecuencia del traumatismo, además de actuar como agente neuroprotector bloqueando la generación de especies reactivas del oxígeno (Cho et al., 2010).

2. OBJETIVOS

En este Trabajo Final de Grado se pretende la fabricación de un conducto tubular poroso capaz de albergar células en su interior, que permita la regeneración de la función neural tras una lesión medular, sobreponiéndose a aquellos factores que la limitan, y que presente unas dimensiones adecuadas para ser adaptado a modelos animales de rata y perro.

Para ello, se persiguen los siguientes objetivos:

- Obtención de estructuras tubulares adaptables a la médula espinal de rata y perro, a partir de moldes de un material inerte, empleando para ello ácido hialurónico o quitosano.
- Caracterización morfológica del material obtenido para comprobar si presenta los requisitos necesarios, en cuanto a morfología y porosidad, para llevar a cabo la regeneración nerviosa.
- Estudio de la citotoxicidad del material con el objetivo de demostrar su inocuidad para poder ser implantado en los modelos animales de rata y perro.
- Evaluación biológica de la adhesión de células de Schwann en el interior del conducto tubular, con el objetivo de poder cultivarlas en el mismo para que promuevan la regeneración nerviosa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental.

En el trabajo se presentan una serie de experimentos que tienen como fin la producción de estructuras tubulares con células sembradas en su interior que ayuden en la recuperación de una lesión medular, como ya se ha mencionado.

Para ello, el primer paso realizado fue el diseño de los moldes, ya que estos debían presentar una forma y tamaño adecuados para producir un material que se adaptara el máximo posible a las características anatómicas de la médula espinal de rata y perro. Según los datos cedidos por la Dra. Victoria Moreno Manzano (Centro de Investigación Príncipe Felipe), el ancho de la médula espinal de rata está en torno a 3 mm, mientras que el ancho de la médula espinal de perro se encuentra alrededor de los 6 mm. Por tanto, los conductos producidos debían presentar unas dimensiones similares a las medidas mencionadas.

A continuación, se fabricaron los conductos a partir de dos biomateriales diferentes: quitosano y ácido hialurónico, para evaluar cuál de ellos presentaba mejores propiedades para el abordaje a realizar. Los conductos se fabricaron mediante la técnica de *solvent casting*, y fueron caracterizados para comprobar que las dimensiones y la estructura porosa era la adecuada. Además, se evaluó que los tubos no fueran citotóxicos según se especifica en la Norma ISO 10993, y se sembraron células de Schwann en su lumen para estudiar el crecimiento y la adhesión de las células al material fabricado.

El fin de estas estructuras tubulares fabricadas sería implantarlas en modelos animales de perro y rata para conseguir regenerar la función nerviosa tras una lesión medular, para lo cual los tubos serían cortados longitudinalmente por la mitad, de manera que presentarían una forma de semicircunferencia.

La estrategia a seguir para solucionar el problema de la lesión medular se muestra en la figura 5, donde se recoge el proceso que empezaría con la creación de la estructura tubular, continuando con el cultivo de las células de Schwann en el interior del lumen del tubo para su posterior corte e implantación sobre la zona lesionada, donde se prevé que las células de Schwann proliferen y se encarguen de reparar la región dañada.

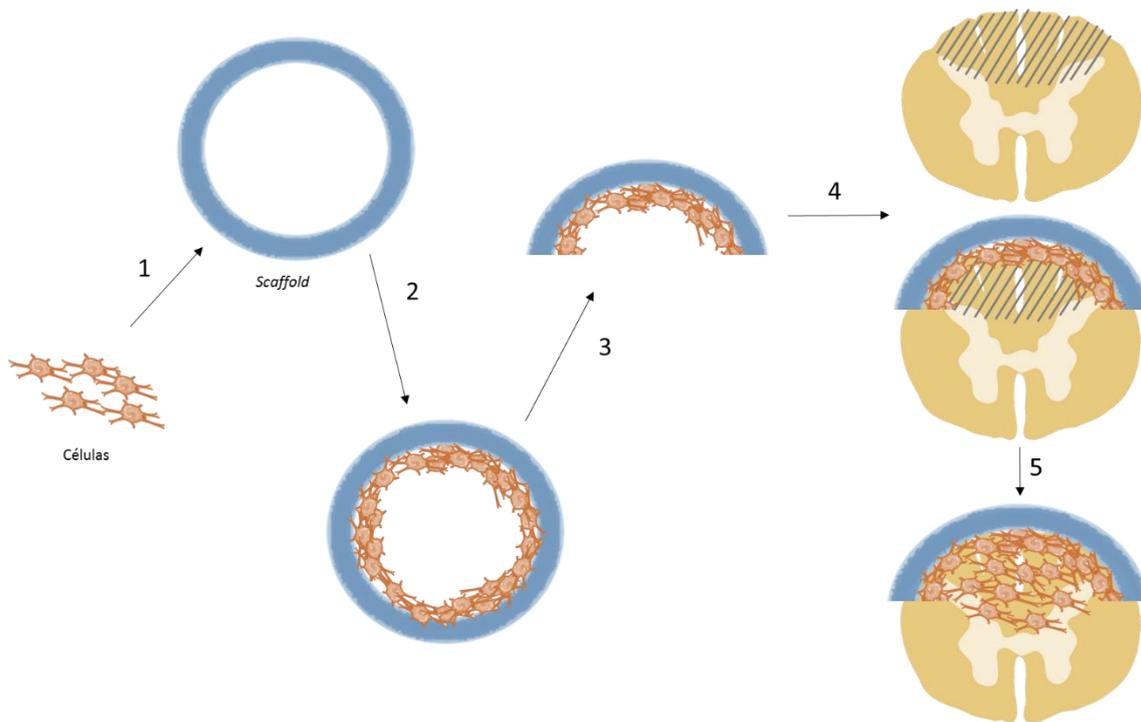


Figura 5 Esquema del abordaje a seguir para la regeneración de la lesión medular. 1) Cultivo de las células en el lumen de la estructura tubular. 2) Proliferación celular en el interior del conducto. 3) Corte de la estructura tubular. 4) Implante del *scaffold* en la zona dañada de la médula espinal (marcada con líneas paralelas). 5) Proliferación y migración de las células por la región dañada regenerando el tejido.

3.2. Diseño de los moldes.

El primer paso a realizar fue el diseño de los moldes utilizados para fabricar el *scaffold*. El *scaffold* debía presentar una morfología similar a un tubo o un cilindro hueco, de manera que emulara a las vías axonales. Para ello, los moldes tenían que presentar un canal en el cual se pudiera inyectar la disolución polimérica con una micropipeta, y en cuyo centro presentase una pieza circular que actuara como contramolde, y que permitiría la formación del agujero central del tubo. Además, el *scaffold* producido tenía que mostrar unas características morfológicas que se adaptasen lo máximo posible a la anatomía de la médula espinal de los modelos animales a utilizar. Por otra parte, el material del molde tenía que ser inerte para que no reaccionara con el biomaterial, y antiadherente para permitir extraer el tubo fácilmente una vez que este se hubiera formado.

Para satisfacer estos requisitos, se diseñaron dos tipos de moldes de politetrafluoroetileno (PTFE; teflón), representados en la figura 6.

El primero de ellos (en adelante, molde tipo I) presentaba una serie de canales de 3 mm x 3 mm en los cuales se introdujo un capilar de vidrio de 1,23 mm de diámetro. Los extremos del capilar se recubrieron con cinta de PTFE, de manera que hicieran la función de topes y permitieran encajar a presión el capilar en los conductos de los moldes para que quedaran centrados en el mismo. También se diseñó un molde similar al mencionado pero con unas

dimensiones de 2 mm x 2 mm, en cuyo interior se situó una fibra de policaprolactona (PCL) de 1 mm de diámetro que hacía la función de contramolde.

El segundo tipo de molde (en adelante, molde tipo II) contaba con dos piezas. La primera de ellas era una pieza de PTFE a la que se le habían realizado agujeros circulares de las dimensiones deseadas. La segunda, constaba de una base de la que sobresalían dos cilindros macizos que actuarían como contramolde permitiendo la formación de la parte central hueca de la estructura tubular. Ambas piezas se encajaban entre sí gracias a unos tornillos, lo que posibilitaba que el cilindro macizo quedara situado totalmente en el centro del agujero de la primera pieza. Dicho molde se realizó en dos medidas, según se fuese a utilizar para modelo animal de perro o rata. El canal del molde utilizado para modelo animal de perro medía 7 mm de diámetro, mientras que la pieza central contaba con 4 mm de diámetro. Por otra parte, el molde utilizado para modelo animal de rata presentaba unas medidas de 5 mm para el canal y 3 mm para la pieza central.

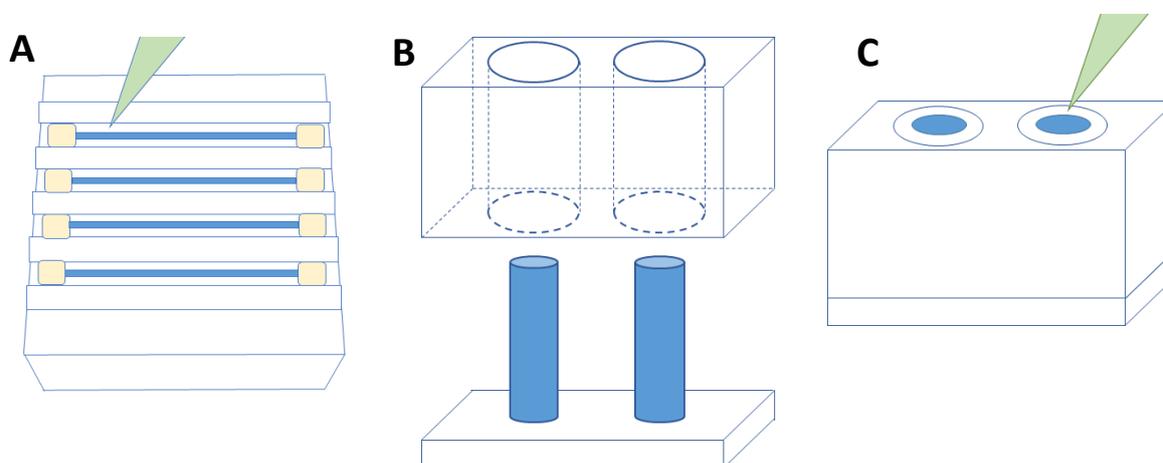


Figura 6 Prototipos de los distintos tipos de moldes. A) Molde tipo I. Se muestra la fibra de policaprolactona (PCL) o el capilar de vidrio en el centro del canal (azul), las arandelas o topes (amarillo), y la punta de la micropipeta que simula la inyección de la disolución (verde). B) Detalle de las dos piezas que conforman el molde tipo II. C) Molde tipo II una vez montadas las dos piezas que lo conforman. Se muestra la punta de la micropipeta inyectando la disolución (verde).

3.3. Desarrollo del *scaffold*.

Se fabricaron estructuras tubulares de dos polímeros distintos, ácido hialurónico y quitosano. Para ello, se utilizaron los moldes descritos en el apartado anterior.

3.3.1. *Scaffold* de ácido hialurónico.

Para la obtención de este *scaffold*, se preparó una disolución de ácido hialurónico de origen bacteriano (HA; *Streptococcus equi*; 9067-85-2, Sigma-Aldrich) al 5% en masa en NaOH 0.2 M,

que se dejó agitando en vaivén 24 horas, para evitar la hidrólisis de las cadenas poliméricas del HA por el NaOH. Tras ello, se dispuso la disolución en agitación vigorosa durante media hora para conseguir una mezcla homogénea. A continuación, se añadió a la disolución divinilsulfona (DVS; 77-77-0, Sigma Aldrich), en una proporción de 9 moles de DVS por 10 unidades monoméricas de HA, que actuaría como agente reticulante permitiendo el entrecruzamiento y, pasados 10 segundos en los que se agitó la disolución a máxima potencia, se inyectó la misma en los moldes de PTFE con una micropipeta. Tras una espera de 11 minutos para que se produjera la reacción de entrecruzamiento, se introdujeron los moldes en un recipiente cerrado para evitar la evaporación y se congelaron a -20°C durante un tiempo mínimo de 3 horas, tras lo cual se liofilizaron durante 24 horas (LyoQuest, Telstar Life Science).

3.3.1.1. Modificaciones del protocolo.

Además de las estructuras tubulares fabricadas con el protocolo descrito en el apartado anterior, se realizaron también distintas variaciones del protocolo con el objetivo de endurecer los tubos creados.

Por una parte, se fabricaron estructuras tubulares de HA y nanotubos. Para ello, se añadieron nanotubos de carbono (308068-56-6, Sigma-Aldrich) al 0,25% (w/w) a la disolución de HA y NaOH.

También se realizó una prueba aumentando el tiempo de reticulación de 11 minutos a 30 minutos, tras el cual los materiales se congelaron directamente a -80°C.

Otra de las modificaciones consistió en tratar los moldes con gas plasma (Plasma-Electronic Piccolo) antes de inyectar la disolución polimérica. La tecnología aplicada fue el plasma por descarga luminiscente, que trabaja con presiones reducidas.

Además, se probó a fabricar los tubos duplicando la cantidad de agente reticulante (DVS) respecto al protocolo original.

Por último, se intentó que en el proceso de producción de los tubos hubiese en todo momento un ambiente húmedo desde la inyección de la disolución polimérica hasta la congelación del material a -80°C para su liofilización.

3.3.2. *Scaffold* de quitosano.

El primer paso para la obtención del *scaffold* consistió en preparar una disolución de quitosano, obtenido a partir de la desacetilación de la quitina procedente del exoesqueleto de cangrejos (CHT; 9012-76-4, Sigma-Aldrich) al 2% en peso en agua. A continuación, se puso en agitación y se añadió gota a gota el ácido acético (64-19-7, Scharlab) hasta llegar al 1.7% del volumen total de la disolución. Después, se dejó en agitación vigorosa durante 24 horas para conseguir la disolución completa del quitosano. Pasado este tiempo, se añadió a la disolución genipin (Wako Chemicals) al 7.5% (peso genipin/peso del CHT) y se agitó vigorosamente durante 20 minutos para permitir que tuviera lugar la reacción de entrecruzamiento. La estructura química del genipin se muestra en la figura 7. Tras ello, se inyectó la disolución con una micropipeta en los moldes de PTFE, que se introdujeron en un recipiente cerrado en cuyo interior se creó un ambiente húmedo para evitar la evaporación y se dejaron a temperatura

ambiente durante 24 horas. Por último, se introdujeron en el congelador a -20°C manteniendo el ambiente húmedo, y se liofilizaron.

Siguiendo este mismo protocolo, se prepararon también *films* de CHT, para comprobar si la morfología afectaba a las características del material.

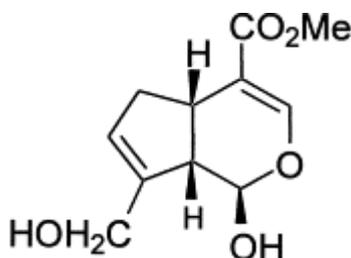


Figura 7 Estructura química del genipin (C.-Y. Zhang et al., 2017).

3.4. Caracterización morfológica del *scaffold*.

Se llevó a cabo la caracterización morfológica de los tubos obtenidos, para comprobar que presentaban unas propiedades adecuadas para poder implantarlos en los modelos animales elegidos.

3.4.1. Dimensiones de las estructuras tubulares.

En primer lugar, se midieron las dimensiones de los tubos. Para ello, se tomaron imágenes en la lupa (Leica, Mz Apo) de los tubos dispuestos de manera longitudinal, y de cortes transversales de los mismos. A continuación, se procesaron las imágenes con el programa ImageJ/Fiji para obtener las medidas. De las imágenes de los tubos dispuestos de manera longitudinal se obtuvo el largo, y de las imágenes de los cortes transversales se adquirieron las medidas de los diámetros externos e internos. En total, se realizaron cuatro medidas para cada uno de los parámetros analizados y para cada tipo de tubo.

3.4.2. Ensayo de hinchado.

Con el objetivo de conocer si los materiales producidos tenían más o menos capacidad de absorber agua, se realizó un ensayo de hinchado, estudiando las diferencias de tamaño entre los tubos en seco y en mojado. Para ello, se realizaron cortes transversales de aproximadamente 1 mm de longitud de los tubos obtenidos, y se introdujeron durante 2 horas en agua destilada. Pasado este tiempo, se tomaron fotografías en la lupa y, con el programa ImageJ/Fiji, se midieron de nuevo las dimensiones de los diámetros externo e interno a partir de dichas fotografías, y se calculó el *ratio* de hinchado, con la ecuación 1.

$$\text{Ratio hinchado} = \frac{(D_{ext.h.} - D_{int.h.})}{(D_{ext.s.} - D_{int.s.})} \quad (1)$$

donde la letra D hace referencia al diámetro, externo (ext) o interno (int) de los tubos, que se midió en seco (s) y en hinchado (h).

3.4.3. Microscopio electrónico.

Para observar la estructura microscópica porosa, se observaron las muestras liofilizadas en el microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM6300). Para ello, se realizaron cortes longitudinales y transversales de los conductos, que se recubrieron con una capa fina de oro y se observaron al microscopio con un voltaje de 2.00 kV.

3.5. Cultivos celulares.

3.5.1. Preparación de los materiales.

En primer lugar, se esterilizaron los materiales bajo campana de flujo laminar, utilizando disoluciones y recipientes estériles para evitar la contaminación de los mismos. Esto fue necesario, ya que las condiciones de fabricación de los tubos no fueron asépticas. Para llevar a cabo la esterilización, se realizaron 4 lavados de 45 minutos cada uno en etanol de 70°, en cuya presencia no pueden sobrevivir los microorganismos. Después, se realizaron dos lavados en etanol de 50° y 30° de 10 minutos cada uno, y 4 lavados más de 10 minutos con tampón fosfato salino (PBS). Estos lavados se llevaron a cabo para eliminar completamente el etanol de los materiales, ya que podría afectar a las células si quedan restos del mismo. Los materiales ya esterilizados se sumergieron en medio de cultivo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para acondicionarlos.

3.5.2. Ensayo de citotoxicidad.

Se realizó un ensayo de citotoxicidad en los *scaffolds* fabricados a partir de quitosano reticulado con genipin para demostrar la inocuidad del material, ya que es necesario estar totalmente seguros de que el material no va a resultar tóxico cuando se implante. Para ello, se siguió el protocolo presente en la Norma UNE-EN ISO 10993-5, que describe los métodos de ensayo para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los productos sanitarios. Básicamente, intenta determinar los efectos que tiene el producto sobre el crecimiento de un cultivo celular tras 24, 48 y 72 horas en contacto, intentando simular lo que ocurriría si se implantara el material en un paciente. En este caso, se decidió realizar un ensayo de tipo indirecto, que se basa en cultivar las células con extractos de las muestras de ensayo.

El primer paso a realizar fue la preparación y selección de los materiales, de acuerdo a la Norma UNE-EN ISO 10993-12, en la cual se especifica la cantidad de material por volumen necesaria para la extracción. Dicha cantidad se puede calcular en función de la superficie, o en función de la masa. Con el objetivo de comparar si se obtenían los mismos resultados por cualquiera de los dos métodos mencionados, se seleccionaron para ensayar tubos para modelo animal de rata según su peso, tubos para modelo animal de perro según su superficie y films.

A continuación, se prepararon los materiales según se especifica en el apartado 3.5.1. *Preparación de los materiales.* Además, se utilizaron discos de polietileno (covers) como control negativo (CN), ya que el polietileno no es citotóxico, y trozos de látex como control positivo (CP), debido a que el látex no permite el crecimiento celular por su toxicidad.

La línea celular utilizada para el ensayo fueron fibroblastos de ratón L929 (C34/An connective tissue, Sigma-Aldrich) en pase 9, que crecieron en medio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) rico en glucosa (Sigma-Aldrich), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Fisher) y un 1% de penicilina-estreptomocina (Fisher). Paralelamente a la incubación de los materiales con el medio, estas células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos (P96) con una densidad celular de 10.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, en un ambiente con 5% de CO₂ y humedad superior al 90%, hasta formar una monocapa semiconfluente.

Pasadas las 24 horas, 100 µL del medio donde habían estado los materiales y los controles (extracto), se transfirieron a cada uno de los pocillos con células. Se realizaron cuatro réplicas de cada uno de los grupos: films, tubos para modelo de rata, tubos para modelo de perro, control negativo, y control positivo, más un último grupo que se denominó blanco, en el que se cultivaron las células con el medio de cultivo sin extracto y que representaría el 100% de viabilidad celular. Esto se realizó para tres tiempos de incubación distintos: 24, 48 y 72 horas. Al término de cada tiempo, se observaron las placas al microscopio y se realizó el ensayo de viabilidad celular.

La determinación de la viabilidad celular se determinó a través del metabolismo del MTT (bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; Roche). Solamente las células vivas pueden reducir el MTT a formazán, generándose un color azulado si se produce la reacción, lo que permite cuantificar el porcentaje de células vivas mediante la medida de la absorbancia. Para dicha determinación, se eliminó el medio de cultivo de las células y se añadieron 100 µL de una disolución preparada previamente que contenía el 10% de MTT y el 90% de DMEM sin rojo fenol (Fisher). Tras esto, se incubó la placa correspondiente durante 2,5 horas a 37 °C, se eliminó la disolución de MTT y se añadieron 100 µL por pocillo de una disolución de isopropanol (67-63-0, Scharlab), que contenía Nonidet P-40 (9016-45-9, Sigma) al 0,1% y 4mM de HCl (Sigma-Aldrich). La placa se transfirió al espectrofotómetro (Victor de Perkin Elmer modelo 1420) donde se midió la absorbancia a 570 nm.

A partir de los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de viabilidad celular entendida como la absorbancia de las muestras con respecto a la absorbancia de los blancos, que representan el 100% de viabilidad. Para el cálculo se utilizó la ecuación 2.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{100 \cdot OD_{570e}}{OD_{570b}} \quad (2)$$

donde OD_{570e} es el valor medio de la densidad óptica de los extractos de las muestras de ensayo, y OD_{570b} es el valor medio de la densidad óptica de los blancos.

Para considerar una muestra como no citotóxica, la viabilidad de las células sembradas en el extracto de dicha muestra debe ser superior al 70% de la viabilidad de los blancos a los 3 tiempos medidos: 24 h, 48 h y 72 h.

Además de calcular la viabilidad celular para cada tiempo, se tomaron fotografías de las células en el microscopio invertido (Nikon Eclipse ts100) para observar su morfología y comprobar que no existían errores experimentales.

3.5.3. Ensayo de adhesión.

3.5.3.1. Cultivo de células de Schwann.

Con el objetivo de evaluar si las células eran capaces de proliferar en el tubo de CHT entrecruzado con genipin para poder generar un implante biohíbrido, se sembraron células de Schwann en las estructuras tubulares. Se eligieron estas células porque sus condiciones de cultivo son bien conocidas y, además, porque tienen un papel importante en la regeneración del SNP, por lo que se piensa que el trasplante de las mismas al SNC podría contribuir a su regeneración.

Las células de Schwann utilizadas para el cultivo fueron extraídas de nervios espinales de rata (Innoprot, Derio, España). Dichas células se cultivaron en un frasco de cultivo con *Schwann Cell Medium* (Innoprot) y fueron incubadas a 37 °C y con un 5% de CO². Tras alcanzar el 4º pase celular, se lavaron con solución tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS) para eliminar las células muertas y las proteínas solubles y se cultivaron 2 minutos a 37 °C con una mezcla de tripsina al 0.25% w/v y 1x EDTA (Thermo Fisher Scientific) para que las células se despegaran del frasco donde habían sido cultivadas. A continuación, se añadió DMEM (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) con suero fetal bovino (FBS; Fisher Scientific, Pittsburgh, EE.UU.) al 10% v/v para inhibir la tripsina. Se introdujo toda la mezcla en un frasco de centrifuga y se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos. A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* que contenía a las células de Schwann en *Schwann Cell Medium* para obtener una concentración de 5·10⁴ células/μl y se procedió a la siembra.

Las células se sembraron en los tubos para modelo animal de rata y de perro, de CHT entrecruzado con genipin, fabricados con el molde tipo II, a razón de 250.000 células por cada cm² de superficie de la estructura tubular, y se incubaron a 37 °C. Los materiales fueron esterilizados previamente según se describe en el apartado 3.4.1. *Preparación de los materiales.*

3.5.3.2. Fijación de las muestras celulares.

Tras 10 días de cultivo, se fijaron las células a los biomateriales con el objetivo de preservar la ultraestructura biológica. El fijador tiene como función detener el proceso de degradación autolítico y proteger la muestra de alteraciones que puedan ocurrir durante los distintos procesos a los que puede verse sometida la muestra.

La fijación para la posterior caracterización inmunocitoquímica y observación en el microscopio confocal, se realizó con paraformaldehído al 4% (PFA; 47608, Sigma-Aldrich) en tampón fosfato (PB) 0.1M (dilución 1:1 de PB 0,2M/agua destilada), durante 20 minutos. A

continuación, se realizaron dos incubaciones de 5 minutos en PB 0.1 M para eliminar los posibles restos de fijador.

3.5.3.3. Caracterización celular in vitro.

Se realizaron ensayos inmunocitoquímicos con el objetivo de localizar antígenos en las células sembradas en el interior de los materiales, y así poder determinar si dichas células habían sido capaces de expandirse y proliferar.

Para las técnicas inmunocitoquímicas, las muestras, previamente fijadas, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en solución bloqueo. La solución bloqueo estaba compuesta por PB 0.1 M, suero fetal bovino al 10% (10108-157, Life Technologies) y Triton X-100 al 1% (T8787, Sigma Aldrich). Pasadas las 2 horas, se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios *overnight*, y tras esto, se realizaron varios lavados con PB 0.1 M para eliminar los posibles restos de anticuerpos que hubieran quedado sin unir. A continuación, se incubaron las muestras durante 2 horas con los anticuerpos secundarios.

Las tinciones inmunocitoquímicas se realizaron con vimentina (Mouse monoclonal anti-vimentin clone V9; 26628-22-8; Sigma-Aldrich) a una concentración de 1/100 y posteriormente Goat anti-mouse Alexa 488 (Jackson Immunoresearch); faloidina (Alexa fluor 633, Anti mouse; Invitrogen) a una concentración 1/200; y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, dilactato; Sigma-Aldrich) a una concentración 1/1000.

Las muestras se observaron con el microscopio confocal (Leica DMI8) generando imágenes tridimensionales de las células. Para ello, se fue barriando toda la muestra utilizando un láser como fuente luminosa, y se generaron imágenes bidimensionales que el ordenador unió creando una imagen tridimensional.

3.6. **Análisis estadístico.**

Los resultados de las diferentes réplicas de los ensayos fueron expresados como la media \pm SD (desviación estándar). Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba *t-Student* y el análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias estadísticamente significativas entre medias se indicaron con un asterisco en las figuras. Para considerar una diferencia entre las medias como estadísticamente significativa, se tomó como referencia un p-value inferior a 0,05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de los moldes.

A partir de los dos tipos de moldes fabricados (figura 8), se consiguieron fabricar estructuras que presentaban un orificio central, donde podrían ser albergadas las células. Sin embargo, se decidió descartar los dos moldes del tipo I (C y D), es decir, los que presentaban canales donde se introducía o bien un capilar de vidrio o bien una fibra de PCL. Esta decisión se tomó debido a que en estos moldes los *scaffolds* obtenidos no eran cilíndricos, sino cuadrados, lo que requeriría un procesamiento posterior en el que se eliminaran las esquinas del cuadrado para conseguir la forma cilíndrica. Por otra parte, los conductos obtenidos a partir del molde que presentaba en su interior la fibra de PCL no eran homogéneos, ya que la fibra, a pesar de ajustarla con los topes, no siempre quedaba en el centro del canal, dando lugar a tubos que mostraban en algunas partes una pared más fina que en el resto del conducto, apreciándose, incluso, zonas donde había ausencia del material. En el caso de los moldes que utilizaban el capilar de vidrio este problema no era tan acusado, sin embargo, se hacía complicado extraer el *scaffold* del molde una vez este había sido sintetizado, deformándose en varias ocasiones la estructura tubular al intentar sacarlo. Este problema logró corregirse, en parte, rociando los capilares de vidrio con un spray lubricante. No obstante, aunque se logró mejorar este punto, se decidió seguir con el estudio con los moldes tipo II, ya que, en resumen, las estructuras fabricadas eran más homogéneas, se adaptaban mejor al modelo anatómico de médula espinal, y el resultado final, respecto al éxito de la producción, y la obtención de unas dimensiones adecuadas, dependía menos de las condiciones de inyección, debido a la sencillez de las mismas.

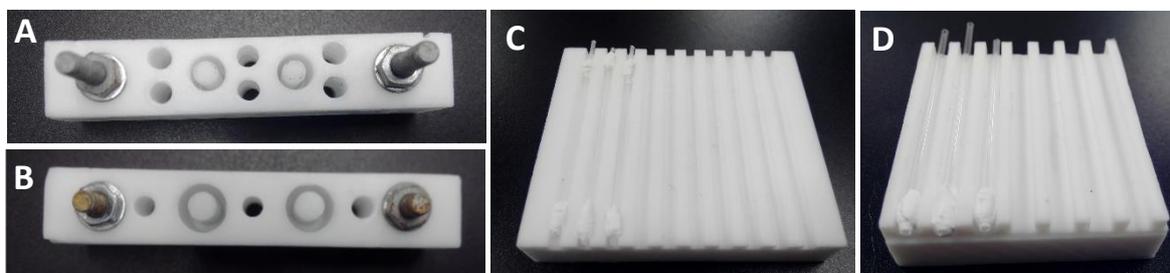


Figura 8 Moldes empleados para la fabricación de los conductos tubulares. A) Molde de politetrafluoroetileno (PTFE) para modelo animal de rata (tipo II). B) Molde de PTFE para modelo animal de perro (tipo II). C) Molde de PTFE con fibra de PCL en su interior para modelo animal de rata (tipo I, descartado). D) Molde de PTFE con capilar de vidrio en su interior para modelo animal de perro (tipo I, descartado).

4.2. Caracterización morfológica.

Con los moldes seleccionados en el apartado anterior, se fabricaron los conductos tubulares de HA y CHT, cuyas imágenes se muestran en la figura 9, que fueron caracterizados morfológicamente, tal como se ha descrito en 3.3. *Caracterización morfológica del scaffold.*

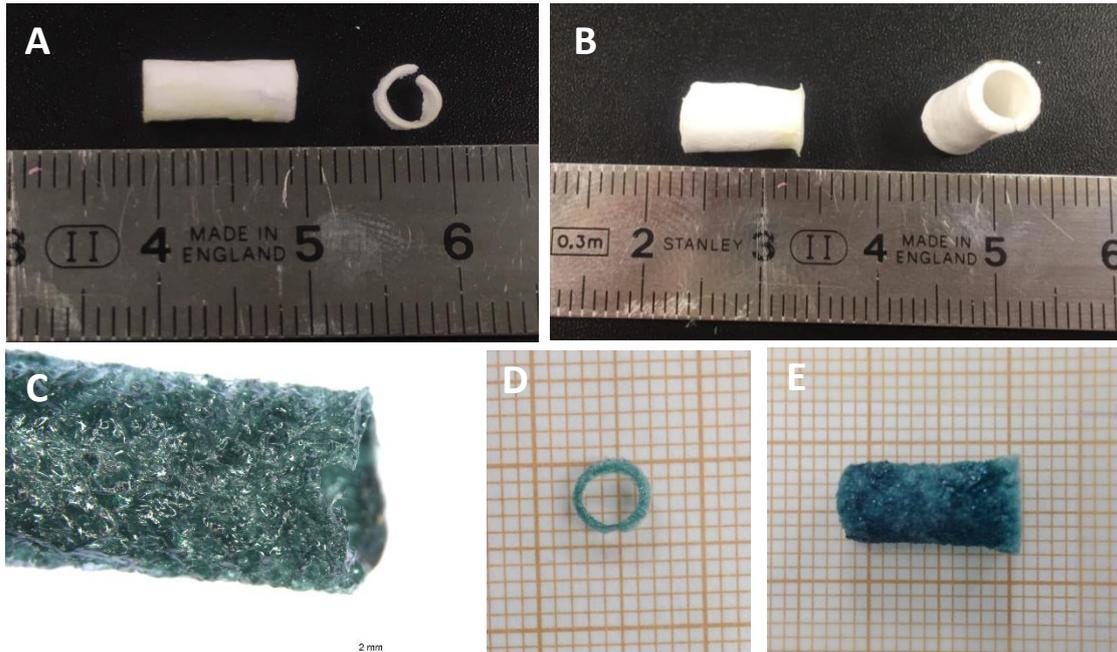


Figura 9 Estructuras tubulares obtenidas a partir de ácido hialurónico (HA) o quitosano (CHT). A) Vista lateral y corte transversal del tubo de HA para modelo animal de rata. B) Vista lateral y transversal del tubo de HA para modelo animal de perro. C) Tubo de CHT para modelo animal de perro visto a la lupa. D) Corte transversal del tubo de CHT para modelo animal de rata. E) Vista lateral del tubo de CHT para modelo animal de perro.

Las dimensiones obtenidas a partir de los distintos tipos de tubos quedan recogidas en la figura 10. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los diámetros externos de los tubos de HA y CHT para modelo animal de rata, y entre las medias de las longitudes de los tubos de HA y CHT para modelo animal de perro. Sin embargo, se puede afirmar que las estructuras tubulares fabricadas son, en general, homogéneas, ya que las diferencias en tamaño de tubos procedentes del mismo material, así como de diferentes materiales, no son excesivamente grandes.

Las dimensiones aproximadas obtenidas fueron de 10.45 ± 0.27 mm de longitud, 4.39 ± 0.34 mm de diámetro externo, y 3.31 ± 0.12 mm de diámetro interno, para el modelo animal de rata. Para el modelo animal de perro, las dimensiones aproximadas fueron de 10.88 ± 0.50 mm de longitud, 5.60 ± 0.20 mm de diámetro externo, y 4.06 ± 0.15 mm de diámetro interno.

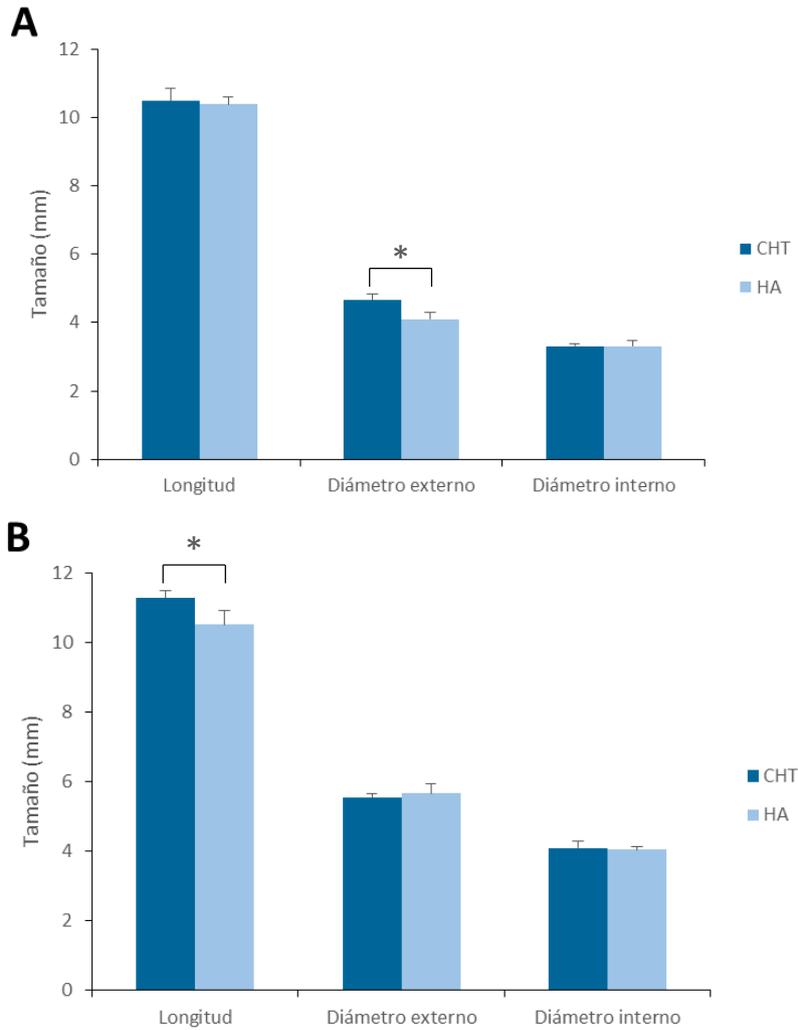


Figura 10 Dimensiones de los tubos de quitosano y ácido hialurónico para modelo animal de rata (A) y perro (B). Se muestran con un asterisco (*) las diferencias estadísticamente significativas (p -value < 0,05) entre las medidas, según el estadístico t de Student.

Respecto al ensayo de hinchado, se observó que los tubos fabricados a partir de HA presentaban una mayor capacidad de absorber agua que los conductos tubulares de CHT. Los *ratios* de hinchado obtenidos fueron aproximadamente de 1.03 ± 0.02 para el tubo de CHT para modelo animal de rata; 1.38 ± 0.13 para el tubo de CHT para modelo animal de perro; 2.94 ± 0.45 para el tubo de HA para modelo animal de rata; y 2.57 ± 0.11 para el tubo de HA para modelo animal de perro. Estos resultados indican que los conductos tubulares de CHT no son capaces de absorber grandes cantidades de agua, comparado con los tubos de HA, como se puede observar también en la figura 11. Los conductos tubulares de CHT para modelo animal de rata, por ejemplo, presentan un *ratio* de aproximadamente 1, lo que quiere decir que no son capaces de aumentar, en absoluto, el tamaño de su pared cuando se hinchan. Por otra parte, aunque los tubos de CHT para modelo animal de perro consiguen aumentar el tamaño de su pared en torno a un 38%, esto no parece demasiado cuando se compara con los datos obtenidos para los tubos de HA, que logran duplicar y triplicar el tamaño de su pared en hinchado.

Tanto el CHT como el HA presentan en su estructura grupos capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua, como son el $-OH$ y el $-NH_2$, gracias a los cuales estos polímeros son capaces de absorber grandes cantidades de agua. Sin embargo, al entrecruzar el material, la capacidad para absorber agua depende en gran medida del grado de dicho entrecruzamiento (S. Ibrahim *et al.*, 2011). Esto es debido a que en el *scaffold* entrecruzado las cadenas del polímero se encuentran unidas covalentemente, presentando una estructura más compacta que dificulta la separación de las cadenas por el agua. Sin embargo, en el material sin entrecruzar o con un menor grado de entrecruzamiento, las cadenas se encuentran unidas por enlaces más débiles formando un entramado tridimensional desordenado que puede albergar moléculas de líquido (Berger *et al.*, 2004). Con esto, se quiere remarcar la posibilidad existente de modificar el *ratio* de hinchado variando el grado de agente entrecruzante, siempre que no se vea comprometida la estabilidad del material. De esta forma, se podrían conseguir estructuras tubulares de CHT con una mayor capacidad de retener moléculas de agua, con el fin de facilitar el transporte de nutrientes y metabolitos a través de la estructura tubular.

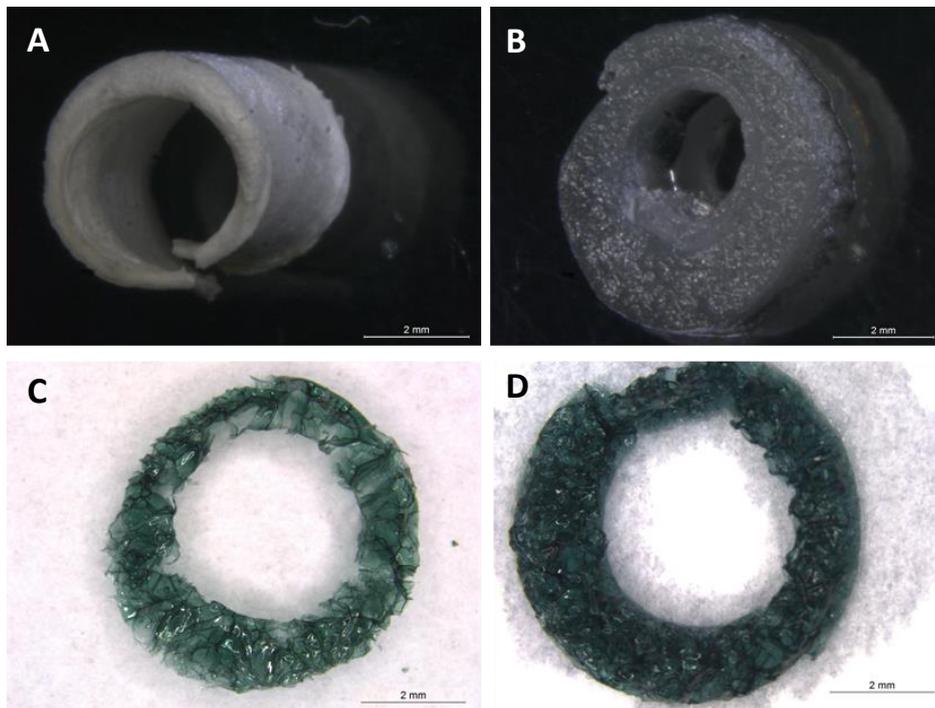


Figura 11 Comparación de estructuras tubulares en seco y tras someterlas al ensayo de hinchado. A) Tubo de ácido hialurónico (HA) para modelo animal de rata en seco. B) Tubo de HA para modelo animal de rata en hinchado. C) Tubo de quitosano (CHT) para modelo animal de perro en seco. D) Tubo de CHT para modelo animal de perro en hinchado. Barra de escala: 2 mm.

Como ya se ha mencionado, el ancho de la región torácica de la médula espinal de rata estaría en torno a unos 3 mm, mientras que el ancho para la misma región en el perro se situaría alrededor de 6 mm. Estas medidas deben coincidir aproximadamente con el diámetro interno de las estructuras tubulares para que puedan ser acopladas correctamente. En hinchado, el

diámetro interno de los tubos para modelo animal de rata está entre 3 mm y 3.40 mm para ambos materiales, de manera que las medidas serían adecuadas. En el caso de los tubos fabricados para modelo animal de perro, el diámetro interno de los tubos de CHT está entre 4 mm y 4.20 mm, mientras que el diámetro interno de los tubos de HA se encuentra comprendido entre 5 mm y 5.20 mm. Si bien es cierto que el diámetro de los tubos es más pequeño que el ancho de la médula espinal, esto no representa un gran problema ya que los tubos se van a cortar en dos mitades que presentarán una forma de semicircunferencia, no siendo necesario que cubran exactamente la mitad del perímetro de la médula, ya que es suficiente con que cubran la región dañada, con lo que se puede ser menos estricto a la hora de seleccionar los tubos según sus dimensiones. Además, el material presenta flexibilidad, con lo que podría adaptarse hasta cierto punto al tamaño de la médula espinal. Asimismo, se pueden fabricar nuevos moldes con los que producir tubos de las dimensiones deseadas, también para solucionar problemas en otras zonas de la médula que presenten un tamaño diferente, o para la implantación en otras especies.

Por otra parte, las imágenes tomadas en el SEM, mostradas en la figura 12, permitieron observar la estructura microscópica porosa que presentan las estructuras tubulares. En las imágenes de la sección transversal de cualquiera de los dos biomateriales se puede reconocer la presencia de poros, que son mayores en el caso de los tubos de CHT. Sin embargo, en las imágenes pertenecientes a la superficie interna de la pared, lo que sería el lumen del conducto, existe una ausencia total de poros. Estas diferencias entre ambas estructuras porosas beneficia al propósito que se quiere conseguir con este trabajo, ya que la pared lisa, sin poros, podría actuar como una barrera evitando que las células sembradas en el interior de la estructura tubular estuvieran en contacto físico con células del exterior del conducto, previniendo también que las células sembradas en el lumen del tubo escaparan.

Mientras se realizaba la caracterización, se observó que las estructuras tubulares fabricadas con los moldes elegidos a partir de HA presentaban grietas que atravesaban el largo del conducto. Se barajaron varias hipótesis que pudieran explicar la formación de dichas grietas y se realizaron modificaciones del protocolo, con el objetivo de intentar solucionar el problema para producir conductos tubulares íntegros.

En primer lugar, se intentó endurecer el material con nanotubos de carbono, suponiendo que añadirían estabilidad y robustez y permitirían que se formara un *scaffold* íntegro. Sin embargo, los resultados no fueron exitosos.

Tampoco tuvo éxito el tratamiento del molde de PTFE con gas plasma, que se realizó con el objetivo de reducir la hidrofobicidad del material, ya que se creía que esto podría ocasionar una retracción del material al estar compuesto éste de una disolución acuosa. Sería esta retracción la que provocaría la formación de la grieta. El tratamiento con gas plasma genera grupos hidroxilo, carbonilo y carboxilo, entre otros, que son capaces de modificar las propiedades de la superficie de hidrofóbica a hidrofílica, incrementando la adhesión y la humectación. Sin embargo, a pesar de este tratamiento se siguieron generando grietas, por lo que se descartó este motivo como causa de las mismas.

El resto de variaciones del protocolo, por ejemplo, duplicar la cantidad de DVS o aumentar el tiempo de reticulación, con el objetivo de conseguir un polímero más reticulado, tampoco dieron lugar a estructuras tubulares íntegras. El mismo resultado se obtuvo al mantener el ambiente húmedo durante el procedimiento de fabricación de los tubos, con lo que también se descartó que fuera una cuestión de evaporación del disolvente.

Como ninguna de las pruebas generó resultados satisfactorios, se decidió seguir adelante con los tubos fabricados a partir de CHT, ya que para el cultivo de las células es mejor que el tubo sea íntegro para evitar que las células escapen del interior del lumen.

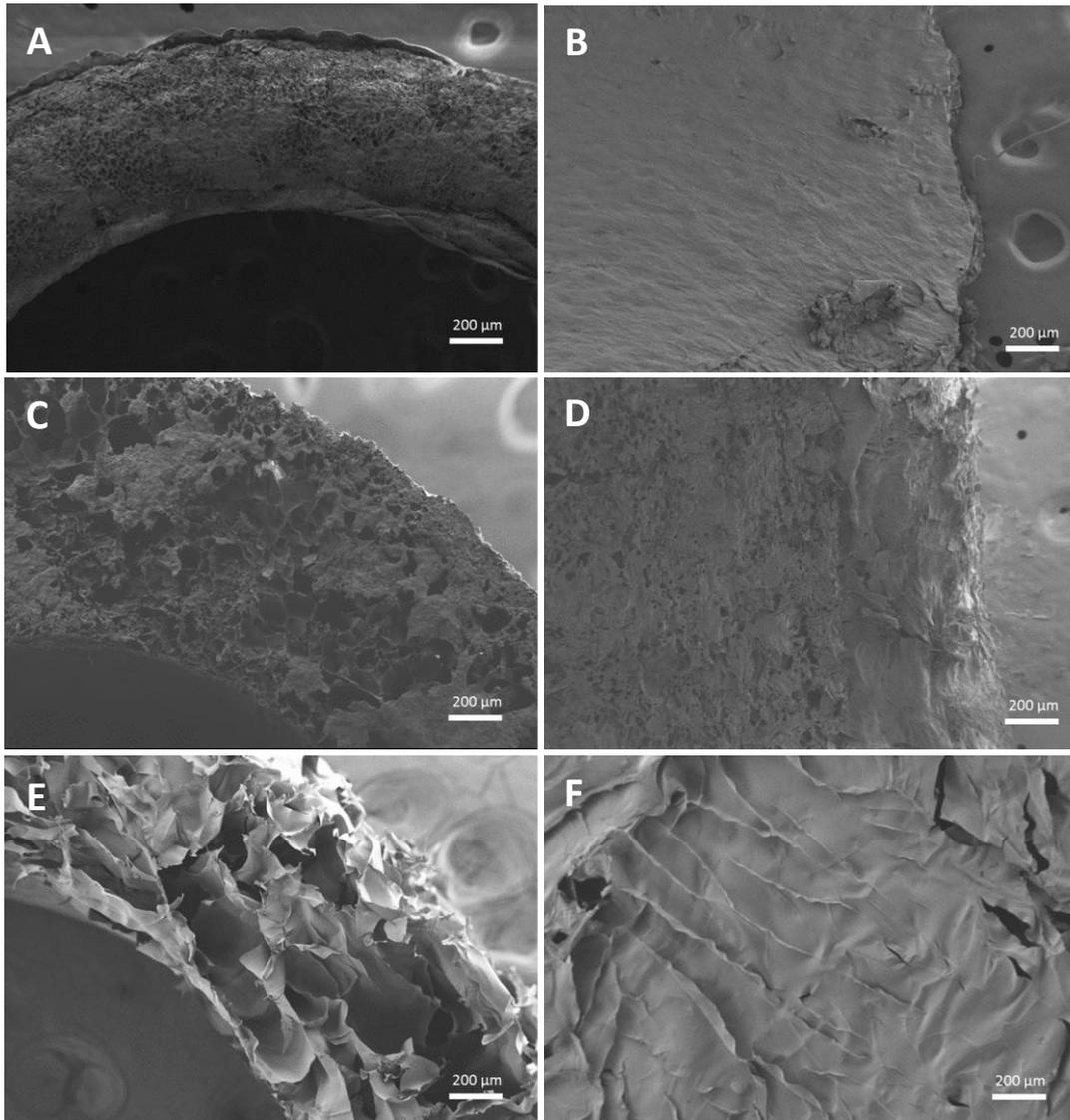


Figura 12 Imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido de la sección transversal y la superficie interna de los tubos fabricados a partir de ácido hialurónico (HA) y quitosano (CHT). A) Sección transversal del tubo de HA para modelo animal de rata. B) Superficie interna del tubo de HA para modelo animal de rata. C) Sección transversal del tubo de HA para modelo animal de perro. D) Superficie interna del tubo de HA para modelo animal de perro. E) Sección transversal del tubo de CHT. F) Superficie interna del tubo de CHT. Barra de escala: 200 µm.

4.3. Cultivos celulares.

4.3.1. Ensayo de citotoxicidad.

El ensayo de citotoxicidad realizado (MTT) era necesario para comprobar la inocuidad del material, ya que los residuos del proceso de fabricación de las estructuras tubulares de quitosano, por ejemplo, unidades de genipin sin reticular o restos de ácido acético, podrían suponer un problema a la hora de implantar el *scaffold*, desencadenando procesos de muerte celular e inflamación que podrían acarrear serias consecuencias para el modelo animal de elección.

Durante el ensayo de citotoxicidad, se realizaron fotografías en el microscopio invertido para comprobar que el número de células presentes y la morfología de las mismas eran las adecuadas, y no se habían producido errores durante el ensayo. Las imágenes a las 72 horas de cultivo se presentan en la figura 13. Como se puede observar, en todas las fotografías existe una gran proliferación celular, a excepción del control positivo (A), lo que parece indicar que el material es inocuo.

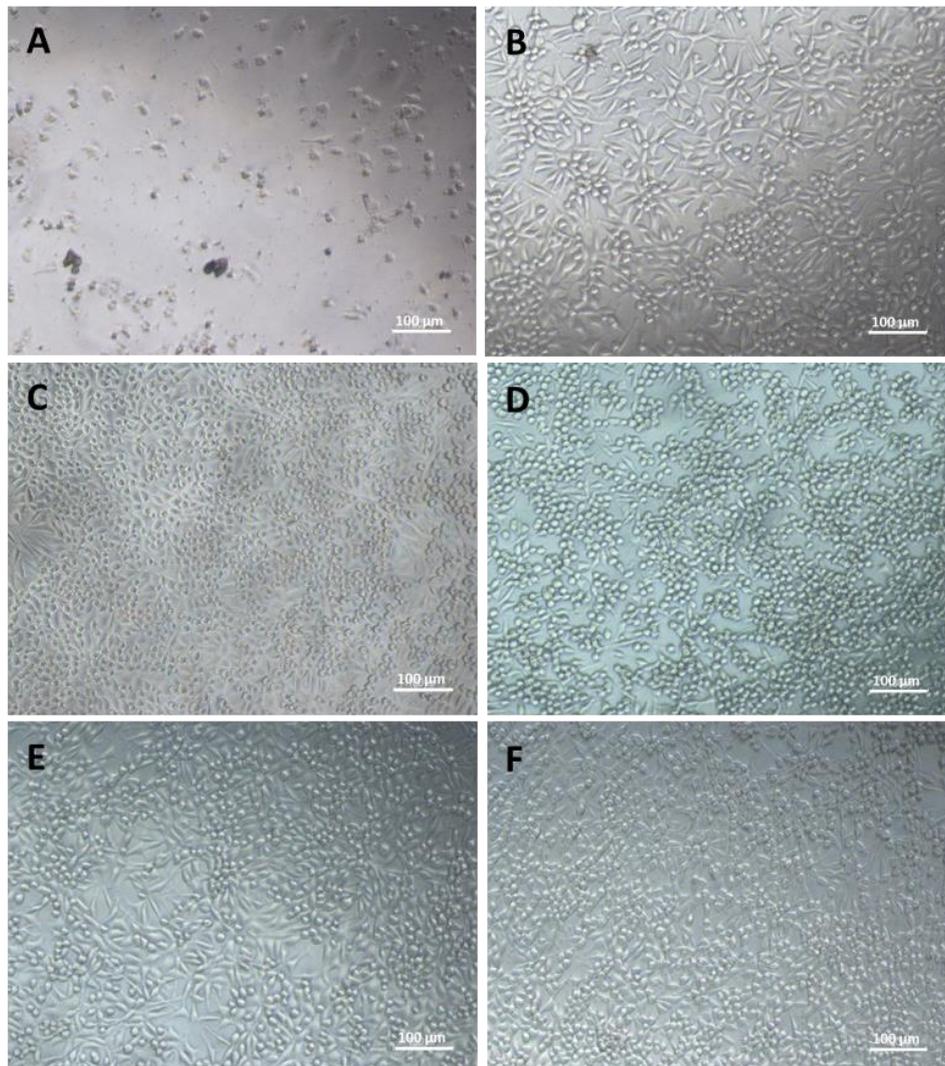


Figura 13 Células cultivadas durante 72 horas en el extracto correspondiente del ensayo de citotoxicidad observadas al microscopio. A) Control positivo (látex). B) Blanco. C) Control negativo. D) Films de quitosano (CHT). E) Tubos de CHT para perro. F) Tubos de CHT para rata.

Los resultados del ensayo de citotoxicidad se muestran en la figura 14. Se puede observar que no existen diferencias significativas entre las distintas condiciones ensayadas, a excepción del control positivo (CP) o citotóxico que presenta diferencias significativas con todos los grupos. Por otra parte, también existen diferencias significativas entre el blanco, que representa el 100% de la viabilidad celular y el tubo fabricado para modelo animal de perro y para un tiempo de incubación de 48 horas. En cualquier caso, los tres grupos ensayados que son: tubos de CHT para modelo animal de perro, tubos de CHT para modelo animal de rata y films de CHT, no presentaron citotoxicidad para ninguno de los tiempos ensayados, ya que la viabilidad era superior al 70% de la viabilidad del blanco, que representa el 100% de la viabilidad celular, por lo que se puede afirmar que el material no es citotóxico, al menos a corto a plazo.

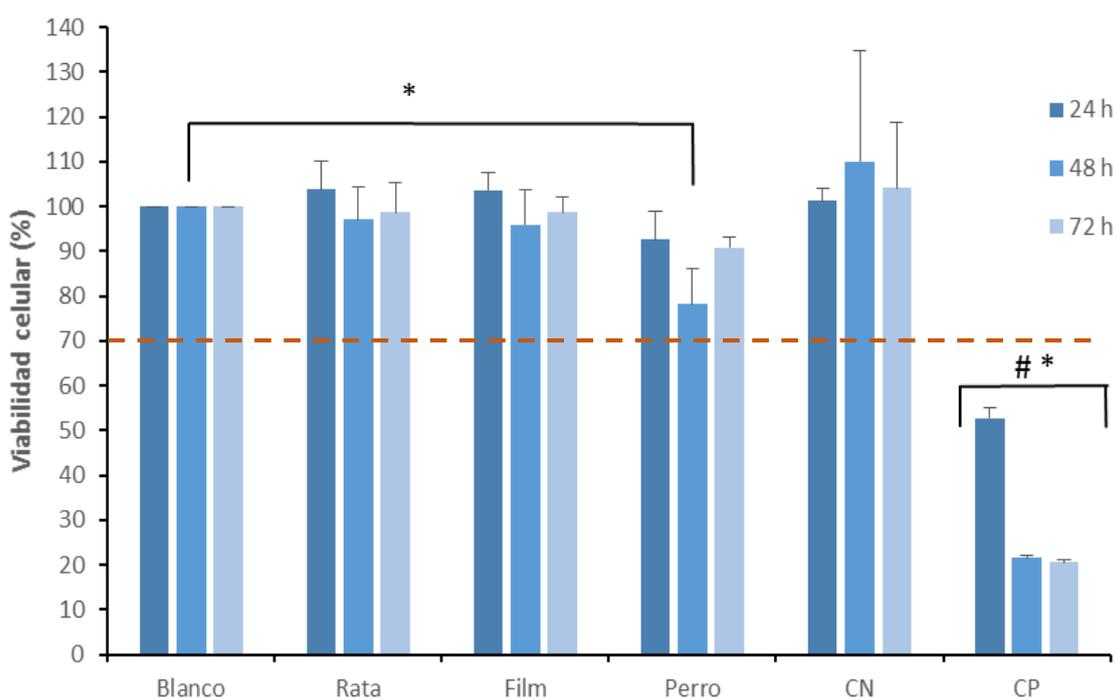


Figura 14 Resultado del ensayo de citotoxicidad MTT in vitro de conductos y films de quitosano según se especifica en la norma ISO 10993-5. La línea discontinua naranja indica el límite de citotoxicidad. Las diferencias significativas se expresan con un asterisco (*), mientras que la almohadilla y el asterisco (#*) indica que existen diferencias significativas entre ese grupo y el resto para todos los tiempos estudiados. Se ha tomado como diferencia estadísticamente significativa un p-value < 0,05, según el estadístico ANOVA.

El quitosano es un biopolímero que presenta un interés creciente en aplicaciones farmacéuticas y médicas, debido a su compatibilidad y a sus propiedades bacteriostáticas, entre otras (Berger et al., 2004). Concretamente, en ingeniería tisular también se han desarrollado aplicaciones basadas en CHT para regenerar diversos tejidos (Venkatesan & Kim, 2010)(Francis Suh & Matthew, 2000). Además, en un estudio se implantaron *scaffolds* de quitosano en ratones, que fueron sacrificados a diferentes semanas para comprobar si se habían producido respuestas inflamatorias o patológicas como consecuencia del implante, observándose signos

mínimos de reacciones inflamatorias al material, concluyendo que éste es adecuado para la implantación (Vandevord et al., 2002).

Por su parte, el genipin es un compuesto natural derivado de la planta *Gardenia jasminoides*. Se han realizado diversos estudios que evalúan la toxicidad del genipin, concluyendo que éste presenta una toxicidad dependiente de la dosis, ocasionando la apoptosis de las células a dosis altas (Fessel et al., 2014)(C. Wang et al., 2011). En principio, no debería haber problema al estar entrecruzado con el quitosano, sin embargo, sí que resultaría tóxico si quedaran restos del mismo sin entrecruzar o si, al descomponerse la estructura tubular una vez implantada, se liberaran restos de genipin. Por este motivo, aunque el resultado del ensayo haya sido que las estructuras tubulares no son citotóxicas, se deberían realizar más ensayos para comprobar la inocuidad del material. También podría optimizarse el proceso, de manera que se intentara reducir al mínimo la cantidad de genipin presente en los tubos creados.

Por último, hay que tener precaución en que no queden restos de ácido acético que puedan acidificar el medio.

4.3.2. Ensayo de adhesión.

Con el ensayo de adhesión se pretendía comprobar si las células eran capaces de adherirse al material de los conductos tubulares y proliferar en él, con el objetivo de poder sembrar células de Schwann en el interior del conducto previamente a su implantación.

En las figuras 15 y 16 se muestran las imágenes obtenidas en el microscopio confocal de cortes longitudinales de los conductos tubulares de CHT sembrados y cultivados con células de Schwann de rata durante 10 días. Las tinciones inmunocitoquímicas usadas sobre el cultivo de células de Schwann fueron DAPI (azul) para marcar los núcleos de las células, faloidina (verde) que marca los filamentos de actina del citoesqueleto celular, y vimentina (rojo), que marca los filamentos intermedios del citoesqueleto.

Como se puede observar en la figura 15, las células han recubierto la superficie interna del material proliferando de forma correcta, lo que queda patente con la gran cantidad de núcleos que se pueden visualizar en las imágenes. También, se muestra cómo los filamentos de actina del citoesqueleto, marcados en verde, se encuentran extendidos, lo que significa que las células se encuentran adheridas sobre el material, por lo que el CHT se presenta como un biomaterial capaz de favorecer la adhesión celular.

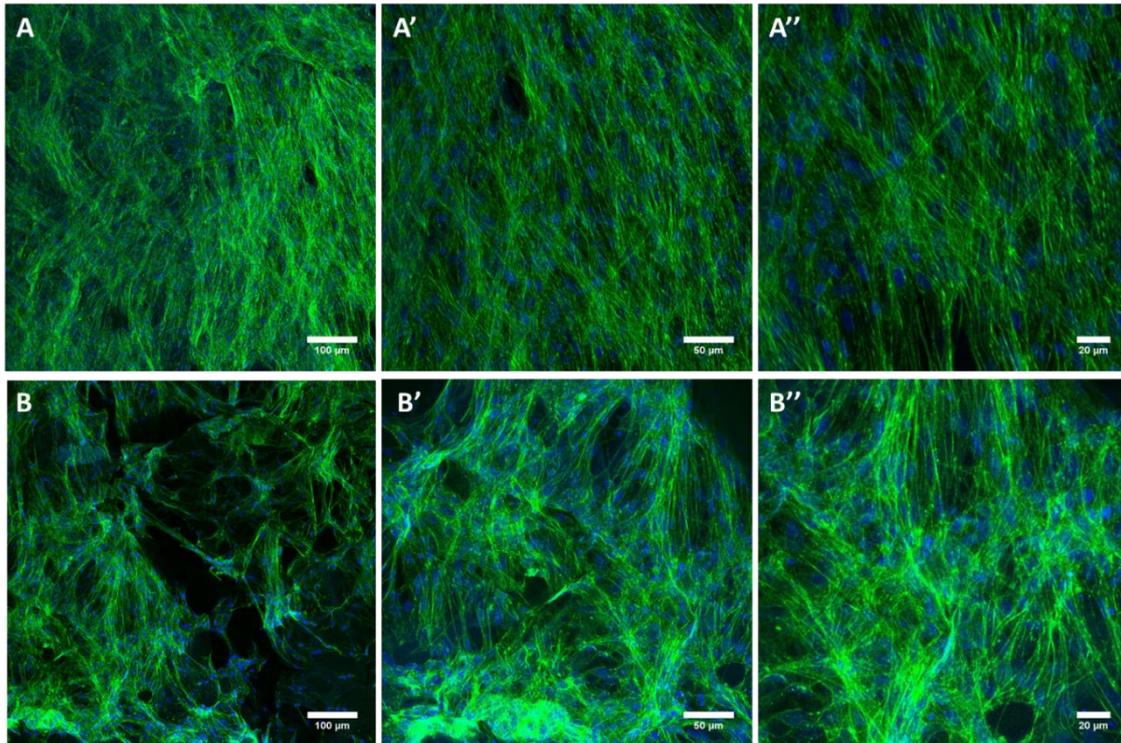


Figura 15 Imágenes obtenidas en el microscopio confocal del lumen de los conductos tubulares fabricados para perro (A, A', A'') y para rata (B, B', B'') tras 10 días de cultivo con células de Schwann de rata. Los filamentos de actina del citoesqueleto están marcados con faloidina (verde) y los núcleos celulares con DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm (A y B), 50 μm (A' y B') y 20 μm (A'' y B'').

En la figura 16, se muestran los filamentos intermedios de las células marcados con vimentina (color rojo) y los núcleos marcados con DAPI (color azul). Los resultados son similares al caso anterior, ya que se pueden observar una gran cantidad de células con el citoesqueleto expandido, lo que indica que hay proliferación en el material y que las células han conseguido adherirse correctamente.

Por otra parte, la proliferación celular observada en el material sostiene los resultados del ensayo de citotoxicidad, ya que si el conducto tubular fuese citotóxico, las células de Schwann no habrían conseguido proliferar en su interior.

Asimismo, la presencia de un gran número de células indica que el soporte creado permite la entrada de nutrientes del exterior y la salida de las sustancias de desecho, posibilitando la vida en el interior del lumen del tubo. La estructura que presenta el *scaffold* fabricado dificultaría la entrada de otros tipos celulares del animal en el que se implante la estructura tubular, como podrían ser astrocitos reactivos o células de la microglía, que podrían dificultar la regeneración.

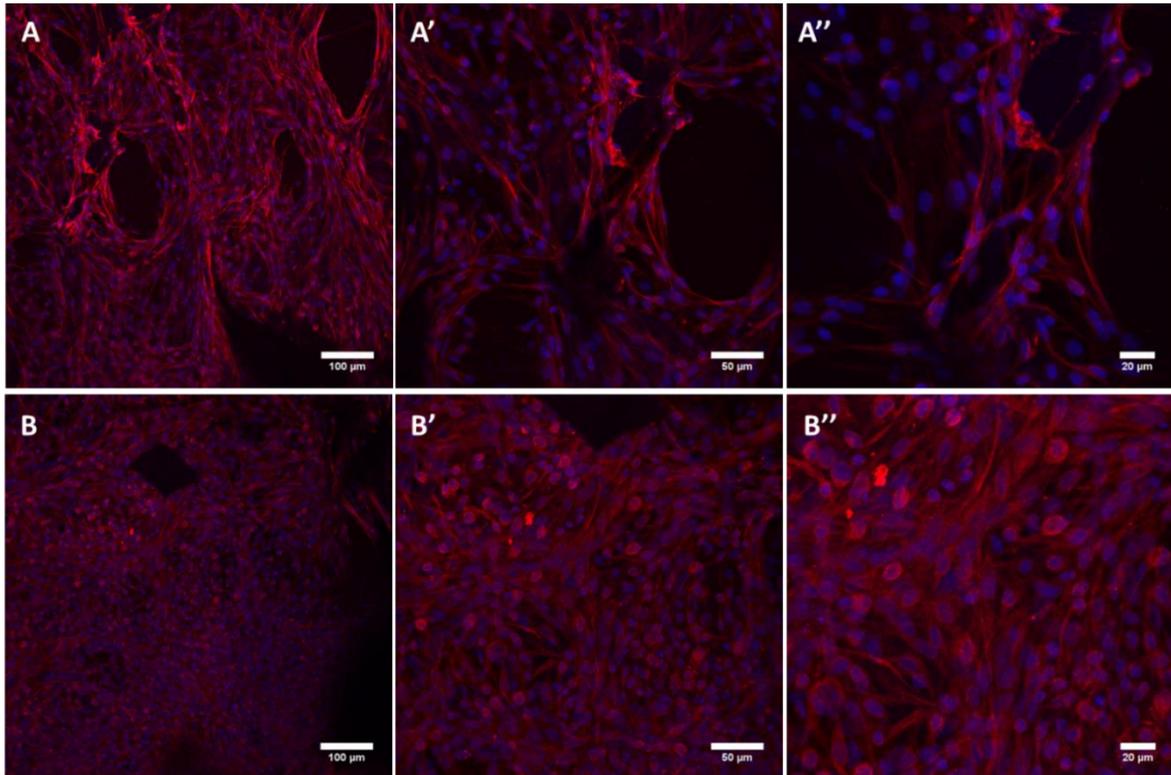


Figura 16 Imágenes obtenidas con el microscopio confocal del lumen de los conductos tubulares de CHT fabricados para rata (A, A' y A'') y para perro (B, B', B'') en los cuales se cultivaron células de Schwann de rata durante 10 días. Los filamentos intermedios del citoesqueleto están marcados con vimentina (rojo) y DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm (A y B), 50 μm (A' y B') y 20 μm (A'' y B'').

El CHT es un polímero bioadhesivo, ya que las cargas positivas de los grupos amino libres pueden formar interacciones electrostáticas con las células, que presentan carga negativa, por lo que no es de extrañar que las células se presenten extendidas sobre el material. El grado de estas interacciones va a depender de la cantidad de agente entrecruzante presente, siendo menor la interacción a mayor cantidad de agente entrecruzante (Dhawan et al., 2004).

Por otra parte, el CHT ha sido objeto de numerosos estudios por su potencial capacidad para mejorar la curación de heridas, favoreciendo la reepitelización y reduciendo el tiempo de sangrado (Singla & Chawla, 2001). Sin embargo, no todas las investigaciones al respecto han obtenido resultados que sostengan dicha propiedad del polímero (Okamoto et al., 1995).

Además, el CHT presenta propiedades antimicrobianas, lo que reduciría el riesgo de infecciones a la hora de implantar la estructura tubular. Se cree que el mecanismo de acción podría ser la unión y desestabilización de la superficie bacteriana (Singla & Chawla, 2001), aunque todavía se requiere más investigación en este aspecto (Raafat & Sahl, 2009).

Por todas estas propiedades mencionadas, además de su biocompatibilidad, se piensa que el CHT es un material ideal para la construcción de las estructuras tubulares.

También hay que destacar el importante papel de las células de Schwann en la regeneración del SNP, lo que justifica el hecho de que se haya optado por estas células para incluirlas en las

estructuras tubulares del *scaffold*. En respuesta a un daño en los nervios del SNP, estas células se dividen rápidamente migrando a la zona de la lesión y fagocitando los restos de mielina que, como ya se ha mencionado en este trabajo, provocan la inhibición de la regeneración neural (Sulaiman & Gordon, 2003). Además, se encargan de formar los tubos endoneurales que ayudan a guiar el crecimiento de los axones (Marieb, 2009). Asimismo, las células de Schwann secretan factores neurotróficos que promueven el crecimiento axonal (Verdú & Navarro, 1998). Estas funciones de las células de Schwann tras un daño en el SNP, hacen pensar que puedan contribuir a la regeneración de los axones en el SNC, lo que ha propiciado que el trasplante de células de Schwann sea uno de los más estudiados para restaurar la función de la médula espinal (Zaminy et al., 2013)(Lavdas et al., 2008). Sin embargo, a pesar de que el trasplante de dichas células presenta un gran potencial, todavía no se ha conseguido restaurar la función nerviosa con esta estrategia (Oudega & Xu, 2006), aunque puede que, en combinación con el *scaffold* creado, se consigan mejorar los resultados, ya que el tubo fabricado, aparte de proteger a las células cultivadas en su interior, va a aportar un soporte estructural para las células de Schwann donde van a poder adherirse y proliferar de una manera más adecuada.

5. CONCLUSIONES

Tras la realización del trabajo se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Los moldes diseñados permiten la creación de estructuras tubulares que pueden adaptarse a las características anatómicas de la zona medular de los modelos animales de rata y perro, siendo posible, además, modificar el tamaño de los moldes con el objetivo de producir tubos que puedan adaptarse a otras zonas de la médula espinal, o a la médula espinal de otras especies.
- El CHT ha sido el material utilizado para la realización de las estructuras tubulares, y dota a las mismas de una porosidad que permite la difusión de nutrientes y otras sustancias, sin permitir la salida de las células al exterior del tubo ni la invasión de células externas.
- Las estructuras tubulares fabricadas son biocompatibles y no presentan toxicidad para las células, lo que supone un paso importante para poder realizar los ensayos en modelos animales.
- Las células de Schwann, cultivadas en el lumen de los tubos, son capaces de adherirse adecuadamente y proliferar, tapizando la superficie interna de los mismos, lo que indica que el material es adecuado para la supervivencia de este tipo celular tan importante en la regeneración del sistema nervioso, y que supondría una fuente de factores que podrían favorecer el crecimiento axonal.

Por tanto, las estructuras tubulares de CHT que incluyen en su interior células de Schwann, se proponen como un biohíbrido que presenta una potencial capacidad para regenerar la médula espinal tras una lesión.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABEMATSU, M.; TSUJIMURA, K.; YAMANO, M.; SAITO, M.; KOHNO, K.; & KOHYAMA, J. (2010). Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted. *Journal of Clinical Investigation*, 120(9).
- ALLISON, D. D.; & GRANDE-ALLEN, K. J. (2006). Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Engineering*, 12(8), 2131–2140.
- ARAS, M.; ALTAS, M.; MOTOR, S.; DOKUYUCU, R.; YILMAZ, A.; OZGIRAY, E.; SERASLAN, Y.; & YILMAZ, N. (2015). Protective effects of minocycline on experimental spinal cord injury in rats. *Injury*, 46(8), 1471–1474.
- AWAD, B. I.; CARMODY, M. A.; & STEINMETZ, M. P. (2015). Potential role of growth factors in the management of spinal cord injury. *World Neurosurgery*, 83(1), 120–131.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; & GURNY, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19–34.
- BETHEA, J. R.; NAGASHIMA, H.; ACOSTA, M. C.; BRICENO, C.; GOMEZ, F.; MARCILLO, A. E.; & DIETRICH, W. D. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 16(10), 851–863.
- BRADBURY, E. J.; MOON, L. D. F.; POPAT, R. J.; KING, V. R.; BENNETT, G. S.; PATEL, P. N.; & MCMAHON, S. B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881), 636–640.
- CAFFERTY, W. B. J.; DUFFY, P.; HUEBNER, E.; & STRITTMATTER, S. M. (2010). MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *Neuroscience*, 30(20), 6825–6837.
- CHAN, B. P.; & LEONG, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(SUPPL. 4).
- CHO, Y.; SHI, R.; & BORGENS, R. B. (2010). Chitosan produces potent neuroprotection and physiological recovery following traumatic spinal cord injury. *Journal of Experimental Biology*, 213(9), 1513–1520.
- COLLINS, M. N.; & BIRKINSHAW, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydrate Polymers*.
- DE RUITER, G. C. W.; MALESSY, M. J. A.; YASZEMSKI, M. J.; WINDEBANK, A. J.; & SPINNER, R. J. (2009). Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurgical Focus*, 26(2), E5.
- DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; & SINHA, V. R. (2004). Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech*, 5(4), 122–128.
- DONOGHUE, P. S.; LAMOND, R.; BOOMKAMP, S. D.; SUN, T.; GADEGAARD, N.; RIEHLE, M. O.; & BARNETT, S. C. (2013). The Development of a ϵ -Polycaprolactone Scaffold for Central Nervous System Repair. *Tissue Engineering Part A*, 19(3–4), 497–507.
- EVANIEW, N.; NOONAN, V. K.; FALLAH, N.; KWON, B. K.; RIVERS, C. S.; AHN, H.; & DVORAK, M. F. (2015). Methylprednisolone for the Treatment of Patients with Acute Spinal Cord Injuries: A Propensity Score-Matched Cohort Study from a Canadian Multi-Center Spinal Cord Injury

- Registry. *Journal of Neurotrauma*, 32(21), 1674–83.
- FAWCETT, J. W.; & ASHER, R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*, 49(6), 377–391.
- FESSEL, G.; CADBY, J.; WUNDERLI, S.; VAN WEEREN, R.; & SNEDEKER, J. G. (2014). Dose- and time-dependent effects of genipin crosslinking on cell viability and tissue mechanics - Toward clinical application for tendon repair. *Acta Biomaterialia*, 10(5), 1897–1906.
- FOUAD, K.; KLUSMAN, I.; & SCHWAB, M. E. (2004). Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *European Journal of Neuroscience*, 20(9), 2479–2482.
- FRANCIS SUH, J.-K.; & MATTHEW, H. W. . (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21(24), 2589–2598.
- GORDON, T.; & GORDON, K. (2010). Nerve regeneration in the peripheral nervous system versus the central nervous system and the relevance to speech and hearing after nerve injuries. *Journal of Communication Disorders*, 43(4), 274–285.
- GRANDPRÉ, T.; LI, S.; & STRITTMATTER, S. M. (2002). Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, 417(6888), 547–551.
- HAN, S.; WANG, B.; JIN, W.; XIAO, Z.; CHEN, B.; XIAO, H.; & DAI, J. (2014). The collagen scaffold with collagen binding {BDNF} enhances functional recovery by facilitating peripheral nerve infiltrating and ingrowth in canine complete spinal cord transection. *Spinal Cord*, 52(12), 867–873.
- HORNER, P. J.; & GAGE, F. H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, 407(6807), 963–970.
- HUANG, Y. C.; & HUANG, Y. Y. (2006). Biomaterials and strategies for nerve regeneration. *Artificial Organs*, 30(7), 514–522.
- HUEBNER, E. A.; & STRITTMATTER, S. M. (2009). Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems. *Results and Problems in Cell Differentiation. Author Manuscript*, 48, 339–351.
- HUTMACHER, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529–2543.
- IBRAHIM, H. M.; & EL- ZAIRY, E. M. R. (2015). Chitosan as a Biomaterial - Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers. In *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. (pp. 81–101). Dr. Varaprasad Bobbarala (Ed.).
- IBRAHIM, S.; K KANG, Q.; & RAMAMURTHI, A. (2011). The Impact of HA Oligomer Content on Physical, Mechanical, and Biologic Properties of Divinyl Sulfone-Crosslinked HA Hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 94(2), 355–370.
- LANGER, R.; & VACANTI, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926.
- LAVDAS, A A; PAPASTEFANAKI, F.; THOMAIDOU, D.; & MATSAS, R. (2008). Schwann cell transplantation for CNS repair. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 151–160.
- LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; & GOOSEN, M. F. A. (1992). Applications and Properties of Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4), 370–397.
- MACKAY-SIM, A. (2005). Olfactory ensheathing cells and spinal cord repair. *The Keio Journal of Medicine*, 54(1), 8–14.

- MARIEB, E. N. (2009). *Anatomía y fisiología humanas* (9th ed.).
- MCDONALD, J. W.; BELEGU, V.; & BECKER, D. (2014). Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition) Chapter 64 – Spinal Cord.
- MUKHOPADHYAY, G.; DOHERTY, P.; WALSH, F. S.; CROCKER, P. R.; & FILBIN, M. T. (1994). A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*, 13(3), 757–767.
- OKAMOTO, Y.; KENJI SHIBAZAKI, S.; & MINAMI, A. M. (1995). Evaluation of Chitin and Chitosan on Open Wound Healing in Dogs. *Department of Veterinary Surgery*, 57, 851–854.
- OUDEGA, M.; & XU, X.-M. (2006). Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 23(3–4), 453–467.
- PERRY, V. H.; & TEELING, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: The contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in Immunopathology*, 35(5), 601–612.
- RAAFAT, D.; & SAHL, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2 SPEC. ISS.), 186–201.
- RAO, J.; YANG, Y.; LIN, S.; SHEN, J.; YAN, Y.; SU, X.; ... GAO, Y. (2015). Repair of spinal cord injury by chitosan scaffold with glioma ECM and SB216763 implantation in adult rats. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(10), 3259–3272.
- RAPALINO, O.; LAZAROV-SPIEGLER, O.; AGRANOV, E.; VELAN, G. J.; YOLE, E.; FRAIDAKIS, M.; & SCHWARTZ, M. (1998). Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nature*, 4, 623–6.
- ROTSHENKER, S. (2011). Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 109.
- SADOWSKY, C.; VOLSHTEYN, O.; SCHULTZ, L.; & MCDONALD, J. W. (2002). Spinal cord injury. *Disability and Rehabilitation*, 24(13), 680–687.
- SCHMIDT, C. E.; & LEACH, J. B. (2003). Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, 293–347.
- SILVA, N. A.; SOUSA, N.; REIS, R. L.; & SALGADO, A. J. (2014). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*, 114, 25–57.
- SINGLA, A. K.; & CHAWLA, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(8), 1047–1067.
- STOKOLS, S.; & TUSZYNSKI, M. H. (2004). The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials*.
- SULAIMAN, O. A. R.; & GORDON, T. (2003). Cellular and Molecular Interactions After Peripheral and Central Nerve Injury. *Biomedical Reviews*, 14, 51–62.
- TABAKOW, P.; JARMUNDOWICZ, W.; CZAPIGA, B.; FORTUNA, W.; MIEDZYBRODZKI, R.; CZYZ, M.; & RAISMAN, G. (2013). Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant*, 22(9), 1591–1612.
- TENG, Y. D.; LAVIK, E. B.; QU, X.; PARK, K. I.; OUREDNIK, J.; ZURAKOWSKI, D.; & SNYDER, E. Y. (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 3024–3029.

- THURET, S.; MOON, L. D.; & GAGE, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, 7(8), 628–643.
- TOY, D.; & NAMGUNG, U. (2013). Role of Glial Cells in Axonal Regeneration. *Experimental Neurobiology*, 22(2), 68.
- VANDEVORD, P. J.; MATTHEW, H. W. T.; DESILVA, S. P.; MAYTON, L.; WU, B.; & WOOLEY, P. H. (2002). Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(3), 585–590.
- VENKATESAN, J.; & KIM, S. K. (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. *Marine Drugs*, 8(8), 2252–2266.
- VERDÚ, E.; & NAVARRO, X. (1998). The Role of Schwann Cell in Nerve Regeneration. In *Understanding Glial Cells* (pp. 319–359).
- WANG, C.; LAU, T. T.; LOH, W. L.; SU, K.; & WANG, D. A. (2011). Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker-Genipin with therapeutic model cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 97 B(1), 58–65.
- WANG, X.; BUDEL, S.; BAUGHMAN, K.; GOULD, G.; SONG, K.-H.; & STRITTMATTER, S. M. (2009). Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth. *Journal of Neurotrauma*, 26(1), 81–95.
- WANG, X.; HE, J.; WANG, Y.; & CUI, F.-Z. (2012). Hyaluronic acid-based scaffold for central neural tissue engineering. *Interface Focus*, 2(3), 278–291.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017). World Health Organization.
- YOUNES, I.; & RINAUDO, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174.
- ZAMINY, A.; SHOKRGOZAR, M. A.; SADEGHI, Y.; NOROUZIAN, M.; HEIDARI, M. H.; & PIRYAEI, A. (2013). Transplantation of Schwann cells differentiated from adipose stem cells improves functional recovery in rat spinal cord injury. *Archives of Iranian Medicine*, 16(9), 533–541.
- ZHANG, C.-Y.; PARTON, L. E.; YE, C. P.; KRAUSS, S.; SHEN, R.; LIN, C.-T.; & LOWELL, B. B. (2017). Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metabolism*, 3(6), 417–427.
- ZHANG, Q.; YAN, S.; YOU, R.; KAPLAN, D. L.; LIU, Y.; QU, J.; & WANG, X. (2016). Multichannel silk protein/laminin grafts for spinal cord injury repair. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 104(12), 3045–3057.
- ZHANG, Z.; ORTIZ, O.; GOYAL, R.; & KOHN, J. (2014). Biodegradable Polymers. In *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)* (pp. 441–473).