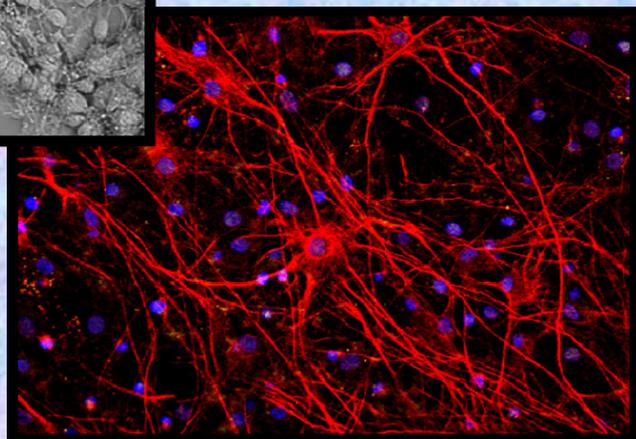
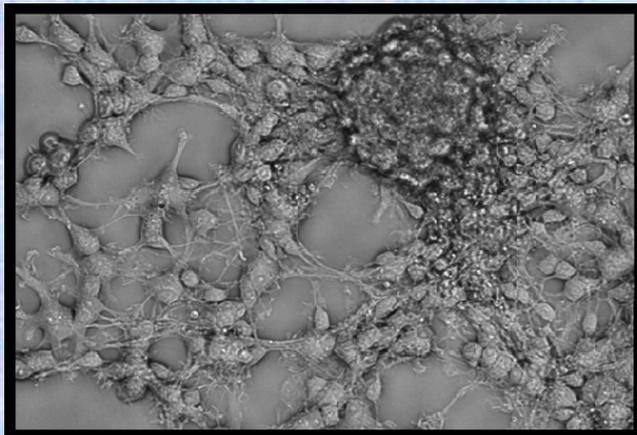




UPV - EHU
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**DESARROLLO DE UN NUEVO SOPORTE POLIMÉRICO CON COMPONENTES
DE MATRIZ EXTRACELULAR NEURAL PARA SU APLICACIÓN EN LA
DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE DISTINTAS CÉLULAS PRIMARIAS**



TESIS DOCTORAL
PATRICIA GARCÍA PARRA

2011



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular



Unidad de Salud

DESARROLLO DE UN NUEVO SOPORTE POLIMÉRICO CON COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR NEURAL PARA SU APLICACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE DISTINTAS CÉLULAS PRIMARIAS

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por

PATRICIA GARCÍA PARRA

Bajo la dirección de los Doctores

JOSÉ IÑAKI ÁLAVA MARQUÍNEZ y FABIO CAVALIERE

Leioa, Enero 2011.



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

- ✓ *Una Ayuda de Formación de Personal Investigador del Gobierno Vasco (2006-2008).*
- ✓ *El Proyecto de Investigación Básica y Aplicada titulado “Patterning de sustratos poliméricos para la diferenciación de células madre de adulto en células neuronales dopaminérgicas” (NEUROPATX), concedido por el Departamento de Industria, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco (2008-2010).*
- ✓ *Una Ayuda de Formación, Especialización y Desarrollo Tecnológico de la Fundación Centros Tecnológicos “Iñaki Goenaga” (2008-2010).*
- ✓ *La ayuda del Instituto-Fundación Teófilo Hernando (Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid).*

"We cannot change the cards we are dealt, just how we play the hand".

"The Last Lecture". In Memoriam: Randy Pausch.

"La paciencia es virtud, arte, sabiduría de saber esperar con calma, paz interior y hasta sentido del honor, algo que deseamos y necesitamos pero que tarda en llegar. La paciencia y aceptación de la realidad constituyen la mejor opción ante lo irreversible. Cuanto más costoso nos resulte un objetivo, más necesitaremos de la paciencia porque es ella la que al final nos garantizará el éxito".

"La confianza es un valor que sólo se gesta en las mentes positivas y abiertas a la esperanza, y en los corazones bondadosos, fuertes, nobles y esforzados. La desconfianza, por el contrario, casi siempre es punto de referencia de los cobardes, fracasados, rencorosos, débiles e inseguros. La verdadera confianza-esperanza siempre se traduce en fe en uno mismo y en seguridad de que, antes o después, llegará el fruto del propio esfuerzo".

"La inspiración existe, pero tiene que encontrarse trabajando".

Pablo Ruiz Picasso.

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han tendido su mano durante todos estos años de andadura por un camino algo sinuoso en ciertas ocasiones, pero enriquecedor, sin duda, gracias a todas esas experiencias profesionales, y sobre todo personales, de las que tanto he aprendido. Poder leer, ¡por fin!, mi Tesis Doctoral es, como todos sabéis, un sueño hecho realidad; es ver cumplida una aspiración personal que estaba dentro de mí desde el mismo día que me despedí con añoranza de mis queridos años de facultad mirando hacia delante con temor e incertidumbre; es también la recompensa a muchos momentos de frustración por unas circunstancias poco favorables y, sobre todo, es la materialización de una ilusión siempre presente y un esfuerzo continuo e incansable por cumplir con ese dicho de “querer es poder”.

Sois muchas las personas que tengo en mi cabeza en estos momentos y a las que me gustaría mencionar una por una, pero, sin duda, las primeras personas a las que debo mi enorme agradecimiento y admiración son mis directores de tesis, sin los que este sueño, hoy, no se hubiese hecho realidad. Como decía la fábula de la tesis doctoral del conejo “lo más importante no es de qué trate tu tesis sino quiénes sean tus directores”.

***Iñaki**, mil gracias por la confianza que depositaste en mí en mis peores momentos, por todo lo que he aprendido de ti día a día, por tus consejos, por tratarme siempre con tanto respeto, por alimentar mi ilusión hasta el último momento y por hacer que las circunstancias de mi entorno esta vez sí jugaran a mi favor, a pesar de todos los vientos desfavorables que han soplado en los últimos meses de navegación. Sin tu apoyo, ayuda y confianza este día nunca hubiese llegado, estoy segura. Muchísimas gracias.*

***Fabio**, mil gracias por enseñarme a disfrutar de la Ciencia y, sobre todo, por enseñarme que la verdadera Ciencia empieza en la humanidad de personas como tú. Contigo comenzó mi pasión por la Neurociencia y, sin tu ayuda, esta pasión se hubiese desvanecido en mi interior. Muchas gracias por estar siempre ahí, por tus consejos, por tus ánimos, por tus palabras amables y por escucharme en cualquier lugar en el que estás.*

A ambos, deciros que necesitaría horas y horas para mostraros mi agradecimiento por valorarme como lo habéis hecho, pero ya sabéis lo mucho que os aprecio así que sólo una palabra, gracias.

Muchas gracias también a todos los que, en diferentes circunstancias, aunque igualmente importantes para mi madurez personal y profesional, habéis estado a mi lado durante estos cinco últimos años.

*Gracias **Antonio**, por el aprecio que me has demostrado en todos estos años, por tus buenos consejos tanto antes como después de finalizar la carrera, por recibirme con los brazos abiertos cada vez que he llamado a tu puerta y por confiar en que este día iba a llegar aceptando ser el tutor de mi tesis.*

*Gracias **Fernando**, por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación en tu laboratorio. Gracias **Ana**, porque a tu lado aprendí a tener paciencia y porque, tu reciente lectura de tesis, me ha dado el ánimo que necesitaba para comprender que todo llega y que los esfuerzos, al final, se ven recompensados. Por cierto, tenemos un artículo que publicar, no lo olvides.*

Gracias **Edurne**, por escucharme en tantos y tantos momentos y, en definitiva, por estar siempre conmigo aún en la distancia. Siempre serás mi técnico pero, sobre todo, mi amiga, y siempre echaré de menos tus consejos, tu experiencia y tu ayuda. Un abrazo de los que reconfortan, pero esta vez de alegría.

Gracias a mis **buen@s compañer@s de Inbiomed**, no solamente por todos esos momentos que compartimos juntos durante mi estancia con vosotr@s, sino por demostrarme en estos últimos meses lo que es el verdadero compañerismo ayudándome en todo lo que he necesitado.

Gracias a mis **“chicas de rojo”** por enseñarme a trabajar, por aguantar mis “sueños en voz alta” y por esos cambios de turno para que pudiera asistir a “mis cursos”. Fue un verdadero placer compartir esos momentos con todas vosotras, tanto en “la primera” como en “la segunda temporada”, pero he de confesar que espero que no haya “una tercera”; prefiero pasar a veros “de visita” aunque no en sábado, claro.

Gracias a mis **“chicas de Salud Pública”** por aguantar a una coordinadora tan perfeccionista. Sobre todo, gracias a ti, **Eva**, por la confianza y el respeto que depositaste en mí en aquellos momentos y por valorar tanto mi trabajo. Créeme si te digo que recuerdo esos días en Pamplona con mucho cariño y que tengo ganas de ver publicados los resultados del estudio, porque sentiré que una pequeña parte de mí está con ello.

Thanks to my **friends of the ESPOU'08** because with you I learned the wonderful of Science. I will always remember my first English oral communication because I was very nervous, but that dissapeared when I felt your sincerely attention and interest to my work. In these moments, I felt a really PhD student. Specially, thanks to you, Biotechnologist friends, for let me live with you an unique and uncomparable opportunity to enjoy the Science in a wonderful land like Seville. Thanks to this opportunity, I am a Master Degree in Neuroscience and Developmental Biology today. It is a pleasure for me being Magister by UPO.

Gracias a mis **amig@s de la UIMP** por compartir conmigo esos maravillosos momentos de ilusión y de alegría. **Marien y Hannes**, mil gracias por vuestra amistad. Ya sabéis que todo lo que vivimos quedará para siempre en mi memoria porque me hizo revivir. Como bien dijo usted, mi querido profesor **Antonio García García**, “me impregné del espíritu de la UIMP, entre ciencia y poesía, antes de volver a ese trabajo que alimentaba mis ganas de estar donde estoy ahora”. Mil gracias a usted también por valorar mi trabajo y por embarcarse con ilusión en este proyecto común que estoy segura que dará unos maravillosos resultados. A ti, **Marcos**, gracias por hacerme sentir importante en mi trabajo. A ti y a mis **querid@s amig@s del ITH**, mil gracias por tratarme como una más de vuestro grupo, por los inolvidables momentos vividos tanto en Santander como en Madrid, por cuidarme en Cardona, y por vuestros ánimos en estos últimos meses. No sabéis cuánto os lo he agradecido desde la distancia. Sin vosotr@s esto tampoco sería posible.

Gracias a **José López-Barneo**, a **Patricia González** y, en general, a todas las **personas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Sevilla**, por permitirme compartir unos días de trabajo a vuestro lado. Siempre quedará en mi memoria vuestro calor. **Lucía**, espero ser capaz de defender mi tesis tan correctamente como lo hiciste tú. Tu

lectura siempre quedará en mi memoria y me ayudará a ser crítica con la mía propia. Gracias a todos por esa lección de humildad; con vosotros corroboré una vez más que la buena Ciencia se gesta en el trabajo de personas de gran corazón.

*Gracias a mis **compañer@s de Inasmet**, por atender mis dudas y prestarme vuestra ayuda durante estos dos últimos años. **Isabel, Leire, Ana y Carolina**, gracias por ayudarme en el nuevo mundo para mí de los biomateriales. **Rubén**, gracias por mostrarme el mundo de la biomecánica y por hacerme disfrutar enseñando. Y, sobre todo, gracias a ti, **Mariaje**, por tratarme con tanto cariño y respeto y, sobre todo, por escucharme y animarme cuando más los necesitaba.*

*Por supuesto, muchas gracias a la **Fundación Inasmet-Tecnalia** y a la **Fundación Centros Tecnológicos "Iñaki Goenaga"** por su ayuda institucional, material y económica.*

*Gracias también a **Adolfo** y a **Ander**, por depositar vuestra confianza en mí y permitirme comenzar una nueva etapa profesional en Biodonostia; creedme cuando os digo que estoy entusiasmada y que pondré todo de mi parte para que sea lo más fructífera posible.*

*Por último, aunque por supuesto no menos importante, mil gracias a **mi familia**, sobre todo a ti, **amá**, por tu apoyo y amor incondicional, por tener paciencia conmigo en mis malos momentos, y por creer que este día iba a llegar. Sé que con esto no puedo agradecerte todo lo que me has dado en la vida pero sé que cuando me contemples leyendo mi Tesis Doctoral sentirás la misma felicidad que estoy sintiendo yo en estos momentos.*

***Miguel**, tenías razón "no iba para atrás como los cangrejos sino que me detuve para tomar impulso". Gracias por estar siempre a mi lado. Ahora sí ha llegado el momento de una "nueva ilusión".*

¡MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO A TODOS!

ÍNDICE

	<u>Página</u>
<u>RESUMEN</u>	i
<u>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</u>	iii
<u>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. INGENIERÍA TISULAR	1
1.2. BIOMATERIALES	2
1.2.1. Biomateriales poliméricos	6
1.2.2. Biomateriales poliméricos aplicados al Sistema Nervioso dañado	7
1.2.2.1. Polímeros naturales.....	10
1.2.2.2. Polímeros sintéticos.....	15
1.2.3. Creación de microestructuras de superficie en biomateriales como guías de diferenciación neural	18
1.2.3.1. Microestampación por contacto.....	19
1.2.3.2. Fotolitografía.....	19
1.2.4. Matrices extracelulares	22
1.2.4.1. Matrices extracelulares neurales.....	25
1.3. TERAPIA CELULAR	26
1.3.1. Desarrollo embrionario del Sistema Nervioso	26
1.3.2. Neurogénesis adulta	30
1.3.3. Células madre	31
1.3.3.1. Células madre embrionarias.....	32
1.3.3.2. Células madre/progenitoras neurales adultas.....	34
1.3.3.2.1. <i>Células madre/progenitoras neurales de la zona subventricular</i>	36
1.3.3.2.2. <i>Células madre/progenitoras derivadas de la cresta neural</i>	39
1.3.3.2.3. <i>Células precursoras derivadas de la piel</i>	40
1.3.3.3. Diferenciación de células madre/progenitoras neurales en neuronas dopaminérgicas para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.....	41
1.3.3.3.1. <i>Moléculas inductoras de la diferenciación neuronal</i>	42
1.3.3.3.2. <i>Moléculas inductoras de la diferenciación dopaminérgica</i>	46

1.4. ENFERMEDAD DE PARKINSON	47
1.4.1. Breve descripción de la Enfermedad de Parkinson.....	47
1.4.2. Deficiencias de los tratamientos en la Enfermedad de Parkinson	49
1.4.3. Situación actual de la Terapia Celular aplicada a la Enfermedad de Parkinson.....	50
 <u>CAPÍTULO II: OBJETIVOS</u>	53
 <u>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS</u>	55
3.1. REACTIVOS	55
3.2. MATERIALES	58
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	59
3.3.1. Medio de mantenimiento de la línea celular PC12.....	60
3.3.2. Medio de diferenciación de la línea celular PC12.....	60
3.3.3. Medio de aislamiento y proliferación de células de hipocampo de rata embrionaria.....	60
3.3.4. Medio de aislamiento y proliferación de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata.....	60
3.3.5. Medio de aislamiento y proliferación de células precursoras derivadas de piel de rata adulta.....	60
3.3.6. Medio de diferenciación neuronal.....	61
3.3.7. Medio de diferenciación dopaminérgica.....	61
3.4. ANTICUERPOS	61
3.5. MÉTODOS	63
3.5.1. Fabricación de los sustratos fotolitografiados	63
3.5.1.1. Ataque ácido de los cubreobjetos de vidrio.....	63
3.5.1.2. Fotolitografía.....	63
3.5.2. Fabricación de la matriz extracelular neural	65
3.5.2.1. Formulación.....	65
3.5.2.2. Desarrollo.....	66
3.5.3. Caracterización del soporte de diferenciación neuronal	67
3.5.3.1. Tinción de la matriz con Azul de Coomassie.....	67
3.5.3.2. Técnicas microscópicas para la observación del soporte.....	68
3.5.3.2.1. <i>Microscopía óptica</i>	68
3.5.3.2.2. <i>Microscopía de fluorescencia</i>	68
3.5.3.2.3. <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	68

3.5.3.2.4. <i>Microscopía de fuerzas atómicas</i>	69
3.5.3.3. Perfilometría de la matriz.....	69
3.5.3.4. Ensayo colorimétrico de Bradford para la determinación de proteína total.....	69
3.5.3.5. Ensayo ELISA para la detección de moléculas de señalización.....	70
3.5.4. Cultivos celulares	73
3.5.4.1. Línea celular establecida PC12.....	73
3.5.4.1.1. <i>Mantenimiento</i>	73
3.5.4.1.2. <i>Diferenciación</i>	74
3.5.4.2. Cultivos primarios.....	75
3.5.4.2.1. <i>Aislamiento y proliferación de células de hipocampo de rata embrionaria</i>	75
3.5.4.2.2. <i>Aislamiento y proliferación de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata</i>	76
3.5.4.2.3. <i>Aislamiento y proliferación de células precursoras derivadas de piel de rata adulta</i>	78
3.5.4.2.4. <i>Diferenciación de cultivos primarios</i>	80
3.5.5. Caracterización celular	80
3.5.5.1. Tinciones celulares.....	80
3.5.5.1.1. <i>Tinción de eosina-azul de metileno según May-Grünwald</i>	80
3.5.5.1.2. <i>Tinción de Bodian modificada (proteinato de plata)</i>	81
3.5.5.1.3. <i>Tinción con el colorante fluorescente vital PKH67</i>	82
3.5.5.2. Inmunofluorescencias.....	83
3.5.5.3. Técnicas microscópicas.....	84
3.5.5.3.1. <i>Microscopía óptica</i>	84
3.5.5.3.2. <i>Microscopía de fluorescencia</i>	84
3.5.5.3.3. <i>Microscopía confocal</i>	85
3.5.5.3.4. <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	85
3.5.6. Medida de la viabilidad celular mediante ensayo con MTT...	85
3.5.7. Análisis estadísticos	86
<u>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</u>	87
4.1. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DEL SOPORTE DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL	87

4.1.1. Sustrato fotolitografiado	87
4.1.2. Matriz extracelular neural	90
4.1.2.1. Análisis de la morfología nanoestructural de la matriz mediante microscopía de fuerzas atómicas.....	95
4.1.2.2. Análisis de la morfología microestructural de la matriz mediante microscopía electrónica de barrido y perfilometría.....	95
4.1.2.3. Determinación de la cantidad de proteína total liberada de la matriz mediante ensayo colorimétrico de Bradford.....	100
4.1.2.4. Análisis de la liberación de Shh de la matriz mediante ensayo ELISA.....	102
4.2. VALIDACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA EN EL SOPORTE DESARROLLADO CON LA LÍNEA CELULAR PC12	105
4.2.1. Observación de la formación de redes pseudo-neuronales mediante tinciones y técnicas microscópicas	105
4.2.2. Determinación de la concentración celular necesaria para obtener una diferenciación neuronal óptima	109
4.2.3. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y dopaminérgica mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal	113
4.3. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS DE HIPOCAMPO DE RATA EMBRIONARIA (E18)	115
4.3.1. Observación de la formación de redes neuronales mediante microscopía óptica	117
4.3.2. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal mediante marcajes inmunofluorescentes y microscopía confocal	117
4.4. AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES DE ZONA SUBVENTRICULAR DE RATA NEONATA (P2-P3)	121
4.4.1. Cultivo en suspensión de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata (P2-P3): formación de neuroesferas	121
4.4.2. Diferenciación de neuroesferas en la matriz extracelular desarrollada	122

4.4.2.1. Observación de la formación de redes neuronales mediante técnicas microscópicas.....	124
4.4.2.2. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y dopaminérgica mediante marcajes inmunofluorescentes y microscopía confocal.....	127
4.5. AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES NEURALES DERIVADOS DE PIEL DE RATA ADULTA.....	139
4.5.1. Cultivo en suspensión de células precursoras derivadas de piel de rata adulta: formación de estructuras similares a neuroesferas.....	139
4.5.2. Diferenciación de estructuras similares a neuroesferas en la matriz extracelular desarrollada.....	145
4.5.2.1. Seguimiento de la diferenciación neuronal mediante tinción con un colorante vital fluorescente y microscopía de fluorescencia.....	145
4.5.2.2. Observación de la formación de redes neuronales mediante microscopía óptica.....	148
4.5.2.3. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y dopaminérgica mediante marcajes inmunofluorescentes y microscopía confocal.....	151
<i>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....</i>	155
5.1. LA COMBINACIÓN DE MICROESTRUCTURAS DE SUPERFICIE Y DE COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR NEURAL GUÍAN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL <i>IN VITRO</i>.....	155
5.2. LA FORMACIÓN DE REDES PSEUDO-NEURONALES DOPAMINÉRGICAS POR PARTE DE LA LÍNEA CELULAR PC12 DEMUESTRA LA HABILIDAD DEL SOPORTE DESARROLLADO DE INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL GUIADA.....	158
5.3. LAS REDES NEURONALES MADURAS DE CÉLULAS DE HIPOCAMPO DE RATA EMBRIONARIA DIFERENCIADAS EN TAN SÓLO 8 DÍAS SOBRE LA MATRIZ CONFIRMAN SU UTILIZACIÓN EFICIENTE CON CÉLULAS PRIMARIAS.....	160

5.4. LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA SOBRE LA MATRIZ DESARROLLADA A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS DE ZONA SUBVENTRICULAR DE RATA NEONATA MUESTRA MÁS DE UN 80% DE EFICIENCIA.....	161
5.5. LA TÉCNICA DE CULTIVO DE NEUROESFERAS PERMITE EL AISLAMIENTO Y LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES DERIVADAS DE PIEL DE RATA ADULTA PERO SU DIFERENCIACIÓN SOBRE LA MATRIZ DESARROLLADA NO PRESENTA LOS MISMOS RESULTADOS QUE EN EL CASO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS DE ORIGEN NEURAL.....	165
<i>CAPÍTULO VI: <u>CONCLUSIONES</u>.....</i>	171
<i>CAPÍTULO VII: <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>.....</i>	173
<i><u>APÉNDICE</u>.....</i>	209

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 3.1. Reactivos utilizados en la fabricación del sustrato fotolitografiado.	55
Tabla 3.2. Reactivos utilizados en la fabricación de la matriz extracelular neural.	55
Tabla 3.3. Reactivos utilizados en la caracterización del soporte.	56
Tabla 3.4. Reactivos utilizados en los cultivos celulares.	56
Tabla 3.5. Reactivos utilizados en la caracterización de los cultivos celulares.	57
Tabla 3.6. Materiales.	59
Tabla 3.7. Anticuerpos primarios.	62
Tabla 3.8. Anticuerpos secundarios.	62
Tabla 3.9. Formulación de la matriz extracelular neural.	66
Tabla 3.10. Preparación de disoluciones de BSA necesarias para obtener una recta de calibrado.	70
Tabla 4.1. Porcentaje de células PC12 positivas para NFL y TH después de 7 DIV.	113
Tabla 4.2. Resumen de los marcajes observados a lo largo de la diferenciación de las células precursoras neurales de SVZ de rata neonata.	138
Tabla 4.3. Resumen de los marcajes observados a lo largo de la diferenciación de las células precursoras derivadas de piel de rata adulta.	154
Tabla 5.1. Revisión de los tipos celulares diferenciados en la literatura a partir de células precursoras derivadas de piel.	170

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1.1. Clasificación de los biomateriales en función de los efectos producidos en el material, de la interacción con el material/organismo, y de la naturaleza química.	6
Figura 1.2. Biomateriales poliméricos, tanto naturales como sintéticos, aplicados a la reparación del Sistema Nervioso dañado.	9
Figura 1.3. Representación esquemática de la microfabricación de sustratos con geometrías definidas mediante la técnica de microestampación por contacto.	20
Figura 1.4. Representación esquemática de la microfabricación de sustratos con geometrías definidas mediante la técnica de fotolitografía.	21
Figura 1.5. Modelo de organización macromolecular de la matriz extracelular.	24
Figura 1.6. Representación de las principales etapas que tienen lugar durante la formación del tubo neural (futuro Sistema Nervioso).	28
Figura 1.7. Representación de la generación de los distintos tipos celulares que componen el Sistema Nervioso, con indicación de la migración neuronal a través de la glía radial.	29
Figura 1.8. Aislamiento y expansión de células madre/progenitoras neurales utilizando el ensayo de neuroesferas.	35
Figura 1.9. La zona subventricular es una zona de neurogénesis en el cerebro adulto.	38
Figura 1.10. Subfamilias de netrinas en base a su estructura.	46
Figura 1.11. Características patológicas de la Enfermedad de Parkinson.	48
Figura 3.1. Microgeometría seleccionada para el diseño de la máscara utilizada en el proceso de fotolitografiado.	64
Figura 3.2. Representación esquemática del proceso de microfabricación del sustrato fotolitografiado.	65
Figura 3.3. Representación esquemática del proceso de deposición manual de la matriz extracelular neural sobre el sustrato fotolitografiado y digestión del exceso de la misma antes de ser utilizado en cultivo celular.	67
Figura 3.4. Representación esquemática del ensayo ELISA contra Shh.	72
Figura 3.5. Morfología de un cultivo de células PC12 en condiciones de proliferación.	74
Figura 3.6. Esquema del protocolo de aislamiento y proliferación de neuronas hipocampales de rata embrionaria (E18).	76
Figura 3.7. Esquema del protocolo de aislamiento y proliferación de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata (P2-P3).	77
Figura 3.8. Esquema del protocolo de aislamiento y proliferación de células precursoras derivadas de piel de rata adulta.	79
Figura 4.1. Sustrato fotolitografiado.	88
Figura 4.2. Aumento de la adherencia de la resina al sustrato mediante tratamiento previo de los cubreobjetos con ácido fluorhídrico.	89
Figura 4.3. Autofluorescencia de la resina SU-8 2100.	90

Figura 4.4.	Distintas combinaciones de membrana basal y ácido hialurónico para conseguir la polimerización y penetración adecuadas de la matriz en los soportes fotolitografiados.	94
Figura 4.5.	Topografía de la matriz de diferenciación neural a escala nanométrica.	96
Figura 4.6.	Muestras metalizadas para su observación mediante microscopía electrónica de barrido.	97
Figura 4.7.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la matriz de diferenciación neural.	98
Figura 4.8.	Imágenes comparativas de microscopía electrónica de barrido entre la matriz en estudio (A) y un fragmento de cerebro de rata (B).	98
Figura 4.9.	Análisis perfilométrico de la matriz de diferenciación neural.	100
Figura 4.10.	Concentración de proteína total liberada de la matriz con respecto al tiempo de incubación.	101
Figura 4.11.	Análisis de la liberación de Shh de la matriz mediante ensayo ELISA.	104
Figura 4.12.	Efectos del sustrato fotolitografiado y de la matriz extracelular en la diferenciación de células PC12.	107
Figura 4.13.	Red pseudo-neuronal formada por las células PC12 diferenciadas en un soporte fotolitografiado con matriz extracelular.	108
Figura 4.14.	Imagen de SEM de la red pseudo-neuronal formada por las células PC12 diferenciadas en un soporte fotolitografiado con matriz extracelular.	108
Figura 4.15.	Diferenciación de células PC12 sobre el soporte desarrollado en medio de cultivo sin (A) y con (B) NGF β .	110
Figura 4.16.	Diferenciación de células PC12 sobre el soporte desarrollado a diferentes concentraciones.	111
Figura 4.17.	Determinación de la concentración celular necesaria para llevar a cabo una diferenciación óptima de las células PC12 sobre el soporte desarrollado.	112
Figura 4.18.	Expresión de NFL y TH por células PC12 diferenciadas sobre la matriz después de 7 DIV.	114
Figura 4.19.	Resultados preliminares de la neuroprotección inducida por el condroitín 4-sulfato en neuronas de hipocampo embrionarias cultivadas sobre matrices que llevan este proteoglicano en su composición basal.	116
Figura 4.20.	Diferenciación de células de hipocampo de rata embrionaria (E18) sobre las matrices desarrolladas previamente (con condroitín 4-sulfato).	118
Figura 4.21.	Expresión de MAP2 en células de hipocampo de rata embrionaria (E18) diferenciadas sobre las matrices desarrolladas previamente (con condroitín 4-sulfato) durante 10 DIV.	119
Figura 4.22.	Enriquecimiento y expansión de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata mediante cultivo de neuroesferas.	123
Figura 4.23.	Representación esquemática del protocolo de diferenciación neuronal y dopaminérgica utilizado en este trabajo.	124
Figura 4.24.	Neuroesferas de SVZ de rata neonata en proceso de diferenciación en la matriz desarrollada.	126

Figura 4.25	Red neural observada en la matriz después de 20 DIV en condiciones de diferenciación neuronal y dopaminérgica.	127
Figura 4.26.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la red neuronal formada en la matriz.	128
Figura 4.27.	Representación esquemática de algunas de las proteínas expresadas por las células neurales a medida que se diferencian, tanto si lo hacen por la vía neuronal como por la vía glial, y que sirven en este trabajo como marcadores para seguir el proceso de diferenciación.	129
Figura 4.28.	Expresión de Sox2 y de nestina por las células que forman las neuroesferas derivadas de SVZ de rata neonata después de 24 horas en condiciones de diferenciación sobre la matriz.	130
Figura 4.29.	Expresión de nestina por las células que forman la red neuronal periférica a las neuroesferas después de 7 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz.	131
Figura 4.30.	Expresión de NeuN y de nestina por las células que forman la red neuronal periférica a las neuroesferas después de 14 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz.	132
Figura 4.31.	Expresión de NFL por neuronas inmaduras (A, verde) y de GFAP por astrocitos (A y B, rojo) que forman la red neural después de 14 días de diferenciación sobre la matriz.	133
Figura 4.32.	Expresión de MAP2 por neuronas en proceso de maduración (verde) y de GFAP por astrocitos (rojo) después de 21 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz.	134
Figura 4.33.	Expresión de MAP2 (verde) y de TH (rojo) por neuronas en proceso de maduración después de 28 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz.	135
Figura 4.34.	Expresión de MAP2 (verde) y de TH (rojo) por neuronas dopaminérgicas después de 35 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz.	136
Figura 4.35.	Red de neuronas dopaminérgicas diferenciadas sobre la matriz a partir de células progenitoras neurales de SVZ de rata neonata.	137
Figura 4.36.	Enriquecimiento y expansión de células precursoras derivadas de piel de rata adulta mediante cultivo de estructuras similares a neuroesferas.	141
Figura 4.37.	Porcentaje de estructuras similares a neuroesferas que se observan en los cultivos a los 7 DIV en función de su tamaño.	142
Figura 4.38.	Expansión de las estructuras similares a neuroesferas tanto después de ser disgregadas enzimáticamente como sin disgregar.	144
Figura 4.39.	Adhesión de las estructuras similares a neuroesferas a la matriz después de 24 horas en condiciones de diferenciación.	146
Figura 4.40.	Colonización de la matriz por las células precursoras que componen las estructuras similares a neuroesferas a medida que ponen en marcha mecanismos de diferenciación neural.	147
Figura 4.41.	Red neural observada en la matriz después de 10 DIV en condiciones de diferenciación.	149
Figura 4.42.	Tinción de Bodian de la red neural observada en la matriz después de 10 DIV en condiciones de diferenciación.	150

Figura 4.43.	Diferenciación de estructuras similares a neuroesferas en el sustrato fotolitografiado, con la consecuente formación de flujos celulares.	150
Figura 4.44.	Expresión de nestina por las células con aparente morfología neuronal que forman la red neural observada en la matriz después de 10 días en condiciones de diferenciación.	151
Figura 4.45.	Incremento del tamaño de las prolongaciones neuríticas de las células nestina positivas que se observan en la matriz después de 14 días en condiciones de diferenciación.	152
Figura 4.46.	Expresión de β -III-tubulina (A) y α -SMA (B) por las células con morfología neuroblástica y por las células con apariencia fibroblástica, respectivamente, después de 20 días en condiciones de diferenciación.	153
Figura 6.1.	Esquema representativo global del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral.	172

RESUMEN

Las características topográficas y bioquímicas en las que se desarrollan las células son críticas para un correcto crecimiento axonal (Nianzhen y Folch, 2005). Sin un sustrato adecuado no sería posible obtener neuronas funcionales, ya que es la presencia de determinados estímulos de contacto y de determinadas moléculas de señalización lo que permite que se desarrollen y se establezcan los contactos sinápticos adecuados (Goldner y col., 2006). Ambos aspectos resultan fundamentales a la hora de llevar a cabo la regeneración de circuitos neuronales *in vivo*, para el tratamiento de determinadas enfermedades degenerativas o traumáticas del Sistema Nervioso (por ejemplo, la Enfermedad de Parkinson o la lesión medular post-traumática, respectivamente) (Potter y col., 2008).

Por todo ello, en este trabajo de Tesis Doctoral se presenta el desarrollo, la caracterización y la validación de un nuevo soporte polimérico capaz de inducir la diferenciación neuronal *in vitro*, combinando técnicas de fotolitografía y de tecnología de matrices extracelulares (Gunn y col., 2010). La biocompatibilidad y la eficiencia en la diferenciación neuronal y dopaminérgica sobre el soporte desarrollado, se ha comprobado tanto a nivel de línea celular establecida (PC12) como a nivel de cultivos primarios. En este caso, se han utilizado tres tipos de células: (i) células de hipocampo de rata embrionaria (E18), (ii) células precursoras neurales de zona subventricular de rata neonata (P2-P3), y (iii) células precursoras derivadas de piel de rata adulta (Toma y col., 2001). Con estos tres tipos celulares se ha pretendido demostrar, respectivamente, (i) la capacidad de diferenciación neuronal de células ya determinadas al linaje neuronal en estadios tempranos de desarrollo (embrionario); (ii) la capacidad de diferenciación no sólo neuronal sino también dopaminérgica de células multipotentes neurales, con capacidad de plasticidad y relacionadas con la neurogénesis adulta; y (iii) la respuesta de células de origen no neural, descritas en la literatura como una fuente importante de células precursoras neurales con potencialidad en trasplantes autólogos. Como conclusión global del trabajo presentado, se puede decir que el cultivo de células precursoras neurales en sustratos tridimensionales con componentes similares a la propia matriz extracelular neural, representa un medio eficaz para el desarrollo de nuevos tejidos neurales trasplantables. Además, el cultivo de otros tipos celulares en el soporte desarrollado puede servir como modelo de liberación controlada de moléculas implicadas en la diferenciación celular, o como modelo para el estudio de moléculas implicadas en diferentes enfermedades.

The topographical and biochemical characteristics of the substrata in which the cells develop are critical for proper axonal outgrowth (Nianzhen y Folch, 2005). Without a suitable substrate would not be possible to obtain functional neurons, because only the presence of certain contact stimuli and signaling molecules allows them to develop and stabilize the appropriate synaptic contacts (Goldner y col., 2006). Both aspects are essential when carrying out the regeneration of neural circuits *in vivo*, for the treatment of certain degenerative and traumatic diseases of the Nervous System (for example, Parkinson's Disease or post-traumatic spinal cord injury, respectively) (Potter y col., 2008).

Therefore, this Doctoral Thesis work presents the development, characterization and validation of a new polymeric support that is able to induce neuronal differentiation *in vitro*, combining both photolithographic techniques and extracellular matrix technology (Gunn y col., 2010). The biocompatibility and efficiency in dopaminergic neuronal differentiation over the developed substrate has been studied with PC12 cell line, as well as with some primary cultures. In this case, three types of cells have been used: (i) cells of rat embryonic hippocampus (E18), (ii) neural progenitor cells of neonatal rat subventricular zone (P2-P3), and (iii) skin-derived precursor cells of adult rats (Toma y col., 2001). With these three types of cells, the present work demonstrates, respectively, (i) the ability of some cells committed to the neural lineage to differentiate into neuronal phenotypes in early stages of the development (embryonic); (ii) the ability of some neural multipotent cells (with plasticity potential and related to adult neurogenesis) to differentiate into both neuronal and dopaminergic phenotypes; and (iii) the response of some non-neural origin cells, described in the literature as an important source of neural precursor cells with a great potential in autologous transplants. As an overall conclusion to this work, it is possible to affirm that the culture of neural precursor cells over the developed three-dimensional substrata (with components related to the natural neural extracellular matrix), represents an effective system to develop new transplantable neural tissues. In addition, the culture of other types of cells over the developed support can be useful as a model of controlled release system of some molecules involved in cell differentiation, or as a model for the study of molecules involved in different diseases.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A

Abs: absorción
ADN: ácido desoxirribonucleico
AFM: microscopio de fuerzas atómicas
ARN: ácido ribonucleico

B

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA: albúmina sérica bovina

C

Ca²⁺: calcio
CHS-A: condroitín 4-sulfato
cm²: centímetro cuadrado
CO₂: dióxido de carbono

D

λ: longitud de onda
Da: daltons
DIV: días *in vitro*
DMSO: dimetilsulfóxido
DNase I: desoxirribonucleasa I
DRG: ganglio de raíz dorsal

E

E18: 18 días post-fertilización
ECM: matriz extracelular
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EHS: tumor Engelbreth-Holm-Swarm
Em: emisión
ESC: célula madre embrionaria
ESN: estructura similar a neuroesfera

F

FBS: suero bovino fetal
FGF2: factor de crecimiento fibroblástico básico
FGF8: factor de crecimiento fibroblástico 8

G

g: gramos
GDNF: factor neurotrófico derivado de la glia
GFAP: proteína ácida fibrilar glial

H

HBSS: solución salina tamponada de Hank
HHMW: ácido hialurónico de alto peso molecular
HLMW: ácido hialurónico de bajo peso molecular
HS: suero de caballo

K

kDa: kilodaltons
kV: kilovoltios

L

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina
LIF: factor inhibidor de la leucemia
LSGS: suplemento de crecimiento bajo en suero

M

μCP: microestampación por contacto
μl: microlitros
μm: micrómetros
M: molar
MAP2: proteína asociada a microtúbulos 2
mg: miligramos
Mg²⁺: magnesio
ml: mililitro
mm: milímetros
mM: milimolar
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio

N

NECM: matriz extracelular neural
NFL: neurofilamento ligero
NGF: factor de crecimiento nervioso
nm: nanómetros
Non-ESC: célula madre adulta
NSC: célula madre neural

O

O₂: oxígeno

P

P2-P3: 2-3 días post-nacimiento
PBS: tampón fosfato salino
PDMS: polidimetil siloxano
PEG: polietilenglicol
PGA: ácido poliglicólico
PLA: ácido poliláctico
PNN: red perineuronal
P/S: penicilina/estreptomicina
p/v: peso/volumen

R

RGD: tripéptido arginina-glicina-aspartico
R_{ms}: rugosidad superficial media
rpm: revoluciones por minuto

S

SC: célula madre
SEM: microscopio electrónico de barrido
Shh: sonic hedgehog
SKP: células precursora derivada de piel
SMA: actina muscular lisa
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
SVZ: zona subventricular

T

TH: tirosina hidroxilasa

U

UV: luz ultravioleta

V

v/v: volumen/volumen

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Este trabajo de Tesis Doctoral engloba conceptos de varias áreas del conocimiento como son los biomateriales y las células madre/progenitoras, encuadrados dentro del campo de la Ingeniería Tisular aplicada a la reparación del Sistema Nervioso dañado por motivo de una enfermedad neurodegenerativa, concretamente por la Enfermedad de Parkinson. Por ello, antes de pasar a enumerar los objetivos fundamentales de este trabajo, se realizará una introducción de los conceptos principales de dichas áreas, aplicados a la exposición de esta Tesis Doctoral.

1.1. INGENIERÍA TISULAR

El término Ingeniería Tisular (del inglés, *Tissue Engineering*) fue adjudicado a esta disciplina en 1987 durante la reunión de la Fundación Nacional de Ciencias, aunque muchas de las técnicas utilizadas ya habían sido desarrolladas en décadas anteriores (Skalak y col., 1988). La idea de la Ingeniería Tisular se forjó con la unión de la experiencia ganada en diversos campos como la Biología Celular, la Bioquímica y la Biología Molecular, y su posterior aplicación a la Ingeniería de Tejidos. El rol de la Ingeniería Química y la Biología fue fundamental para la aplicación racional de los principios de los sistemas vivientes. La tercera arma de conocimiento fue proporcionada por la Terapéutica Humana, brindada por médicos y cirujanos.

Hoy en día, científicos de diversas áreas colaboran activamente con ingenieros biomecánicos para desarrollar tejidos análogos a los originales, que permitan a los médicos mejorar, mantener y restaurar la función de los tejidos dañados.

Por ello, la Ingeniería Tisular se define como un campo multidisciplinario e interdisciplinario que aplica los principios de la Biología y de la Ingeniería para el desarrollo de sustitutos tisulares que permitan mejorar, mantener y restaurar la función de tejidos dañados o enfermos. Una aproximación a la Ingeniería Tisular consiste en cultivar células del propio paciente en matrices poliméricas biodegradables que contienen factores de crecimiento y de señalización específicos, para después implantar todo el sistema en el tejido dañado, de manera que se obtenga una integración funcional y, consecuentemente, una recuperación funcional del mismo.

Por lo tanto, la Ingeniería Tisular se fundamenta en el uso de células específicas, de tejidos u órganos, y de componentes extracelulares, naturales o sintéticos, para crear sustitutos

biológicos con la finalidad de mejorar, mantener, reparar o reemplazar la funcionalidad de los tejidos o de los órganos (Vacanti y Langer, 1999).

Dentro de este campo, se pueden diferenciar dos enfoques distintos. El enfoque más común consiste en aislar células específicas a través de una pequeña biopsia del paciente y cultivarlas sobre soportes porosos tridimensionales bajo unas condiciones de cultivo controladas. Posteriormente, el conjunto soporte/células se sitúa en la zona deseada del paciente con la finalidad de dirigir la formación del nuevo tejido a través del soporte (Mano y col., 2004). Por otro lado, se encuentra la alternativa de implantar el soporte sin células directamente *in vivo*, con el propósito de estimular y dirigir la formación de tejido *in situ* (Drotleff y col., 2004).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se pueden definir tres pilares básicos sobre los cuales se sustenta la Ingeniería Tisular. En primer lugar, es necesario usar células con características similares a aquellas del tejido u órgano que se pretende tratar y que son expandidas en cultivos *ex vivo*. En segundo lugar, es necesario crear un soporte ideal para la supervivencia, desarrollo y diferenciación de dichas células. Además, la posibilidad de agregar factores inductores que se vayan liberando de una forma controlada, incrementa potencialmente la calidad del tejido a reemplazar. Estos soportes tridimensionales porosos son conocidos como matrices tisulares (del inglés, *scaffolds*). En tercer y último lugar, es necesario obtener un medio de cultivo adecuado para el cultivo de las células seleccionadas sobre los soportes porosos de una manera exitosa (Arala, 2007).

En los siguientes apartados, se presentarán algunos de los biomateriales y de los tipos celulares que se han utilizado hasta ahora con estos fines, siempre desde el punto de vista de su utilización en Ingeniería Tisular aplicada a la reparación del Sistema Nervioso dañado.

1.2. BIOMATERIALES

En 1982 se definió como biomaterial a toda aquella sustancia o combinación de sustancias, de origen sintético o natural, que podía ser utilizada durante un cierto periodo de tiempo, en sustitución de cualquier tejido, órgano o función del organismo humano. Las más recientes definiciones describen a los biomateriales como sustancias que, sin ser nutrientes ni fármacos, están incluidos en sistemas terapéuticos o diagnósticos (Peppas y Langer, 1994); también se pueden definir como componentes de origen biológico que no se relacionan con sus aplicaciones (Langer y Tirrel, 2004).

La Medicina recurre de manera creciente a materiales ajenos al organismo con la finalidad de encontrar un remedio, definitivo o temporal, al déficit de una función biológica. Los biomateriales no son, exclusivamente, los dispositivos destinados a ser implantados en el cuerpo humano, sino también los que están en contacto con las mucosas, los que están destinados a tratar la sangre, o los que permiten la liberación controlada de fármacos.

Los biomateriales deben cumplir el requisito fundamental de la biocompatibilidad, es decir, no deben interactuar de forma perjudicial con el organismo. El grado de biocompatibilidad de un material depende de su forma, de su estructura, de su composición y de sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas, además de su localización en el organismo y de su tipo de aplicación. Otro requisito muy importante de un biomaterial es su duración, es decir, la capacidad que presente de mantener sus prestaciones durante el tiempo necesario, ya sea en forma de implante provisional o definitivo.

Los biomateriales candidatos a ser utilizados en Ingeniería Tisular tienen que presentar la doble función de dirigir la morfogénesis *in vivo* y de servir de soporte estructural y funcional del implante durante su integración en el tejido del huésped.

Por lo tanto, todo biomaterial o soporte ideal, diseñado para su aplicación en regeneración tisular, debería:

- Estar compuesto por un material biocompatible, es decir, que no resulte citotóxico.
- No alterar el potencial clonogénico y proliferativo de las células que se cultiven en él.
- Actuar como soporte para el crecimiento del tejido en tres dimensiones.
- Poseer una red de poros interconectados con un diámetro superior a 100 μm , que permita tanto la penetración de las células como la formación y vascularización del tejido nuevo.
- Integrarse en el tejido del huésped sin que se forme una cicatriz.
- Presentar una textura superficial y una composición química que promueva la adhesión celular y la adsorción de moléculas biológicas como factores de crecimiento y moléculas de señalización.

- Eliminarse gradualmente a medida que se repare el tejido dañado, generando productos de degradación no tóxicos que puedan ser excretados fácilmente.
- Poder producirse en formas que se ajusten a las del defecto a tratar.
- Tener unas propiedades mecánicas adaptadas a las necesidades del tejido a regenerar.
- Poder producirse comercialmente bajo las regulaciones existentes y con un coste que permita su uso rutinario en la práctica clínica.

La moderna Ciencia de los Biomateriales se caracteriza por su intensa búsqueda de nuevos materiales que, con unas propiedades específicas, permitan mejorar determinadas prestaciones de los biomateriales actuales (Ratner y Bryant, 2004). Por otro lado, entre los científicos que trabajan en este área, está creciendo el interés por profundizar en los mecanismos de interacción entre las células y la matriz extracelular, con el objetivo de determinar cómo esta matriz extracelular condiciona e influye en los procesos de desarrollo celular. La integración de estos nuevos conocimientos con el diseño de los más avanzados biomateriales es lo que está proporcionando la funcionalidad que permite conseguir interacciones y señales específicas entre el biomaterial y la superficie de las células (Payne, 2007).

En los años noventa, se intentó recubrir determinados materiales con proteínas naturales -tanto estructurales como de adhesión- de la matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina, colágeno y/o laminina) (Hersel y col., 2003), pero su uso en aplicaciones médicas generó algunos inconvenientes. Las fuentes biológicas a partir de las cuales se obtuvieron estas proteínas ocasionaron respuestas autoinmunes y aumentaron los riesgos de infección; además, estas proteínas sufrían procesos de proteólisis acelerada como consecuencia de los procesos inflamatorios, por lo que tenían que ser renovadas continuamente, imposibilitando su utilización a largo plazo. Asimismo, sólo una parte de las proteínas exponían apropiadamente sus dominios de adhesión celular debido a su deposición estocástica sobre la superficie de los materiales que, por su naturaleza, podían modificar la conformación y/o el estado nativo de las proteínas. Muchos de estos inconvenientes se solucionaron presentando los motivos de reconocimiento celular de forma aislada en forma de péptidos inmovilizados, lineales o cíclicos.

Los propósitos que la Ciencia de los Biomateriales tendrá que alcanzar están relacionados con la mejora de la biocompatibilidad, es decir, con la identificación de las características que dotan al material de la capacidad para pasar desapercibido e íntegro hasta su diana; y con el desarrollo de nuevos biomateriales cuyas propiedades puedan ser controladas y modificadas

según unas necesidades específicas. Entre éstos últimos se encontrarían los llamados “materiales inteligentes” (del inglés, *smart biomaterials*) (Sarikaya y col., 2003; Jones, 2004) como, por ejemplo, geles que respondan a determinados estímulos físico-químicos (por ejemplo, cambios de temperatura o de pH), permitiendo la liberación controlada de ciertas moléculas o fármacos. A este respecto, merece la pena señalar que las aportaciones que realice la Nanotecnología también resultarán determinantes (Silva, 2006).

Actualmente, un sector importante de la investigación en biomateriales está evolucionando hacia la Medicina Regenerativa. Esta disciplina considera una aplicación distinta del biomaterial: una aplicación no sólo vinculada a la obtención de dispositivos médicos o de tejidos/órganos artificiales biocompatibles para trasplantes, sino vinculada al crecimiento de tejidos/órganos a partir de células del propio paciente (autólogos), con el objetivo último de personalizar cada tratamiento terapéutico. La Medicina Regenerativa se beneficia de un conjunto de complejas técnicas utilizadas para seleccionar las células del paciente y desarrollarlas *in vitro* en combinación con biomateriales adecuados para ello. Como se ha comentado en el apartado anterior, a esto es a lo que se refiere el término actual de Ingeniería de Tejidos.

Para poder desarrollar todas las posibles aplicaciones de la Medicina Regenerativa, se deberían conocer y controlar varios aspectos como, por ejemplo:

- Las propiedades de los diferentes tipos de células y de los biomateriales.
- Los mecanismos de interacción entre las células y la superficie de los biomateriales.
- Los procesos de adhesión y de crecimiento de las células tanto sobre la superficie como en el interior de los biomateriales para obtener un desarrollo tridimensional.
- Los mecanismos de promoción de la adhesión, del crecimiento y de la diferenciación de las células a través del uso de señales moleculares específicas.
- Los mecanismos de interacción entre los biomateriales y el ambiente biológico.

Actualmente, se pueden encontrar en la literatura numerosas clasificaciones de los biomateriales; un ejemplo de ello, se muestra en la **Figura 1.1**.

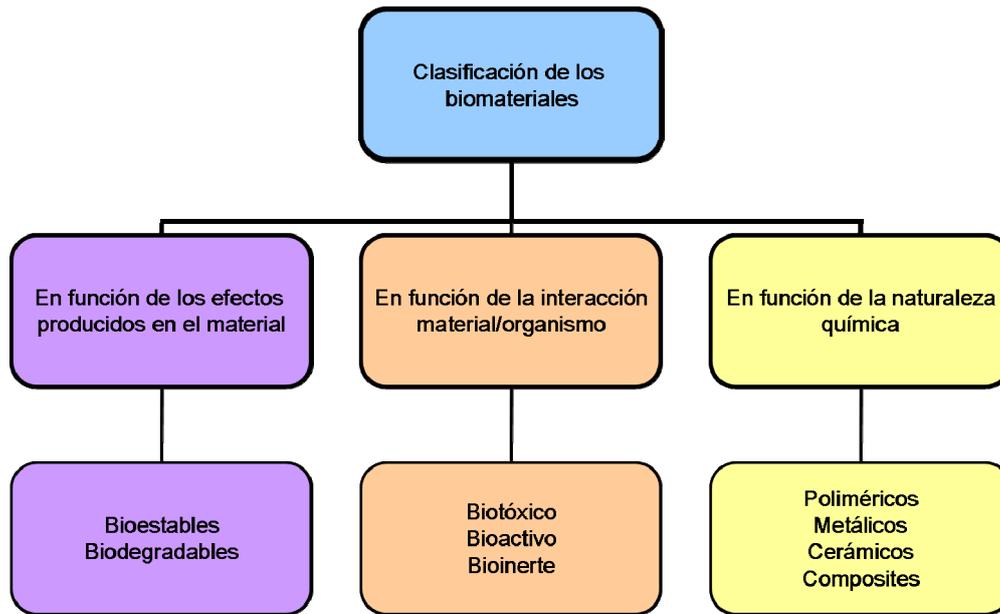


Figura 1.1. Clasificación de los biomateriales en función de los efectos producidos en el material, de la interacción con el material/organismo, y de la naturaleza química.

1.2.1. Biomateriales poliméricos

En el caso de los biomateriales poliméricos, es necesario distinguir los polímeros sintéticos (por ejemplo, el ácido poliláctico o el ácido poliglicólico) de los polímeros naturales (por ejemplo, los polisacáridos y las proteínas) porque las características, tanto estructurales como de composición, del polímero utilizado determinarán el comportamiento de las células expuestas a dicho biomaterial (Shi y col., 2004).

En una situación ideal, las células y el biomaterial deberían interactuar para garantizar la estabilidad del sistema en su conjunto. Se pueden definir tres tipos de interacciones entre los biomateriales y las células. En el caso de los biomateriales no adhesivos, sus superficies altamente hidrofóbicas no permiten a las células interactuar con ellas. Otros biomateriales consiguen una adhesión celular pasiva, es decir, sus superficies proporcionan interacciones físico-químicas que aportan adsorción entre el biomaterial y las células, siendo este tipo de interacción reversible, de manera que las células adheridas pueden desprenderse del biomaterial manteniendo su integridad. Finalmente, otros biomateriales consiguen una adhesión celular activa, es decir, las células que pueblan estas superficies activan espontáneamente sus procesos de adhesión y propagación celulares. En estos casos, las células sufren modificaciones que imposibilitan su desprendimiento espontáneo del biomaterial, aunque no se observen cambios morfológicos importantes en ellas (Kikuchi y Okano, 2005).

Para mejorar estas interacciones, se han estudiado métodos de modificación superficial de los polímeros mediante la introducción de señales bioquímicas específicas (Dovbeshko y col., 2003). Una de las estrategias más prometedoras en este sentido es la creación de dominios de unión específicos para proteínas expresadas en las propias células, que sirvan no sólo para anclar a las células al soporte sino para controlar su comportamiento celular. Algunas de las proteínas que servirían para este fin serían, por ejemplo, la laminina o la fibronectina, cuyos dominios de unión son reconocidos de manera específica por receptores de las propias células. Por ejemplo, los dominios de unión de la fibronectina son reconocidos por receptores de la familia de las integrinas y consisten en lazos peptídicos formados por la secuencia específica RGD (tripéptido formado por arginina, glicina y ácido aspártico). Concretamente, esta secuencia peptídica ha sido descrita en la literatura como inductora del crecimiento axonal y de la inducción de la morfología neuronal (Ahmed y Jayakumar, 2003).

Desafortunadamente, los soportes poliméricos actuales presentan varios inconvenientes. Por un lado, muchos de los polímeros biodegradables que se han estado utilizando en la práctica clínica no muestran un claro comportamiento biocompatible. Por otro lado, ningún biomaterial puede satisfacer al 100% todos los requisitos necesarios para ser utilizado como material óptimo de una matriz tisular. Como se comentará más adelante, la matriz extracelular (del inglés, *ExtraCellular Matrix, ECM*) es una estructura compleja por lo que no se puede pretender desarrollar una ECM en base a un solo biomaterial. Una solución sería la fabricación de una ECM formada por diversos biomateriales, teniendo en cuenta que cada tipo celular tiene unos requerimientos específicos y que no se puede desarrollar una única ECM para todos ellos, sino que la composición de una ECM concreta deberá ser acorde con las células que se vayan a cultivar en ella (Álava y col., 2004).

1.2.2. Biomateriales poliméricos aplicados al Sistema Nervioso dañado

Teniendo en cuenta las características del Sistema Nervioso, los biomateriales que se implanten en él deberían presentar las siguientes propiedades generales:

- Biocompatibilidad y biodegradabilidad. El biomaterial no debe generar rechazo inmunológico por parte del individuo receptor y debe ser degradable, ya que la presencia crónica de un material que no se degrada provoca la compresión nerviosa y la reactividad tisular crónica al implante (Merle y col., 1989). Además, la velocidad de degradación del biomaterial debe ser lo suficientemente lenta como para permitir la regeneración del tejido

nervioso a reparar. Finalmente, los productos de degradación no deben ser tóxicos para el individuo receptor porque generarían un rechazo inmediato.

- Estructura porosa adecuada. Una estructura porosa resulta imprescindible para que los vasos sanguíneos atraviesen el biomaterial, de manera que haya un aporte apropiado de nutrientes y una eliminación adecuada de los productos de desecho. La influencia de la porosidad de un biomaterial en la vascularización de un tejido se ha demostrado mediante estudios de diferenciación de células troncales humanas en geles de alginato (Gerecht-Nir y col., 2004). En ellos, se observa la importancia del número, del tamaño y de la orientación de los poros, si lo que se busca es que tanto las células nerviosas como sus axones puedan crecer e invadir el biomaterial a través de ellos, manteniendo una orientación definida. Así, se ha postulado que la pérdida de la interconectividad de los poros puede ser la responsable de que no crezcan bien las neuritas (Patist y col., 2004).
- Superficie permisiva con la adhesión y el crecimiento de las células. La superficie debe presentar unas características que permitan la adhesión celular bien de forma directa o bien a través de moléculas de ECM que favorezcan el crecimiento neurítico (por ejemplo, la laminina). Sin embargo, esta adhesividad no debe ser tan fuerte como para impedir el crecimiento y la migración de las células nerviosas y de sus axones (Schense y Hubbell, 2000).
- Superficie con una topografía superficial de texturas alineadas. Este tipo de topografía facilita el crecimiento unidireccional de los axones en regeneración, además de favorecer las respuestas celulares adhesivas, por lo que se encuentra directamente relacionada con la propiedad anterior (Haston y col., 1983).
- Actividad eléctrica. Desde 1970 existe la evidencia de que los campos electromagnéticos ayudan en la regeneración y en la mejora funcional de los nervios lesionados (Lago y col., 2005). Además, se ha comprobado que la actividad eléctrica en torno al cono de crecimiento axonal modula su crecimiento y su orientación (Ming y col., 2001).

Hasta el momento, se han estudiado muchos biomateriales construidos a partir de sustancias sintéticas, con la finalidad de conseguir un biomaterial polimérico con las propiedades físico-químicas adecuadas para poder ser utilizado terapéuticamente en el Sistema Nervioso. Sin embargo, los biomateriales poliméricos construidos a partir de moléculas de ECM -como el colágeno, la laminina o la fibronectina- o de otras moléculas biológicas -como la fibrina, la agarosa, el ácido hialurónico, el alginato o el quitosano- siguen resultando de

referencia en la regeneración nerviosa. Estos biomateriales presentan la ventaja de que sus componentes se encuentran presentes en organismos vivos, lo que los hace especialmente útiles en lo que a rechazo inmunológico se refiere. Combinando varios de estos componentes se podría desarrollar el biomaterial más adecuado para ser implantado en el Sistema Nervioso dañado.

En la **Figura 1.2** se presenta un esquema de los principales biomateriales poliméricos, tanto naturales como sintéticos, ensayados hasta el momento en la reparación del Sistema Nervioso dañado, y que se mostrarán más detalladamente en los subapartados siguientes.

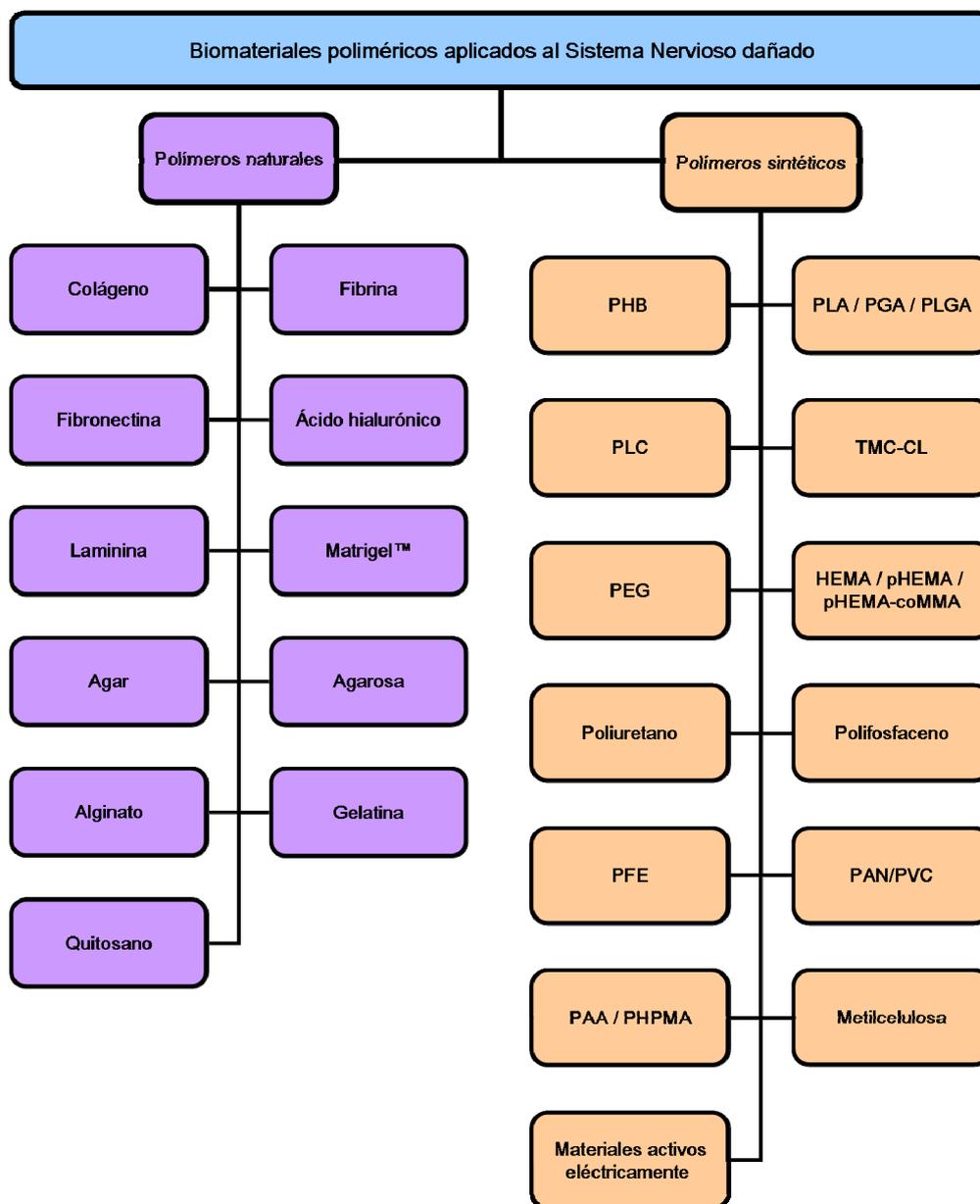


Figura 1.2. Biomateriales poliméricos, tanto naturales como sintéticos, aplicados a la reparación del Sistema Nervioso dañado.

1.2.2.1. Polímeros naturales

Los polímeros naturales o biopolímeros son polímeros que se forman de manera natural durante el ciclo de crecimiento de los organismos vivos. Su síntesis se basa en reacciones de polimerización de monómeros activos que, generalmente, son catalizados por enzimas en el interior de las células dentro de procesos metabólicos complejos (Chandra y Rustgi, 1998).

Los polímeros naturales han sido muy utilizados en la reparación de distintos tejidos como, por ejemplo, el tejido nervioso, la piel, el hueso o el cartílago. Debido a su origen natural, presentan la ventaja de ser muy similares al medio sobre el que actúan, por lo que son reconocidos y asimilados por el organismo, evitándose así los efectos secundarios inherentes a la inserción de un material extraño en el organismo. Sin embargo, el hecho de que, generalmente, sean insolubles en disolventes orgánicos; de que sus temperaturas de procesamiento deban ser bajas para evitar su degradación; de que presenten unas propiedades mecánicas muy limitadas; y de que existan grandes diferencias entre los distintos lotes al finalizar su procesamiento, condicionan el uso de los polímeros naturales en aplicaciones biomédicas (Yang y col., 2001).

A continuación se presentan algunos de los polímeros naturales ensayados en los últimos años para su aplicación en la reparación del Sistema Nervioso dañado.

- Colágeno. El colágeno define a una familia de proteínas estructurales que se caracteriza por una triple hélice formada por tres cadenas peptídicas. Existen más de 20 tipos de colágeno pero, concretamente, el colágeno tipo IV es el que está presente en la membrana basal de los tejidos. El colágeno es uno de los componentes mayoritarios de la ECM debido a sus propiedades mecánicas y a su resistencia a la degradación. Estas propiedades, junto con su baja antigenicidad, hacen del colágeno un sustrato ideal para su utilización en Ingeniería Tisular (Gelse y col., 2003). Así, la utilización del colágeno como sustrato para el crecimiento celular se inició en la década de los cincuenta (Ehrmann y Gey, 1956). Más adelante, se cultivaron fibroblastos embebidos en geles de colágeno tridimensionales, observándose su permisividad en cuanto al crecimiento celular y su influencia sobre la morfología celular y la manera en que las células crecían en su superficie (Elsdale y Bard, 1972). Estudios posteriores confirmaron que las superficies construidas con colágeno resultaban muy apropiadas para la adhesión y el crecimiento no sólo de fibroblastos (Bessea y col., 2002) sino también de neuronas (O'Connor y col., 2001). Además, dado que el colágeno es una molécula anisotrópica diamagnética, se llevaron a cabo distintas estrategias de orientación de las fibras de colágeno durante el proceso de gelificación de las matrices (por ejemplo, mediante la utilización de campos magnéticos), demostrándose

que las fibras de colágeno orientadas promueven la extensión alineada de neuritas desde ganglios de raíz dorsal (del inglés, *Dorsal Root Ganglia, DRG*) (Dubey y col., 1999). Recientemente, se ha observado que las matrices de colágeno también resultan útiles en el atrapamiento de células precursoras y en la inducción de su diferenciación (O'Connor y col., 2000).

- Fibrina: La fibrina es el componente principal de los coágulos sanguíneos. Se forma como consecuencia de la proteólisis del fibrinógeno, una molécula común en el torrente circulatorio. Los monómeros de fibrina se autoensamblan para formar protofibrillas de dos monómeros, agregándose éstas lateralmente, a su vez, para formar paquetes de fibras que se ramifican hasta generar una red a modo de gel hidratado en presencia de agua. La estructura fibrilar de las matrices de fibrina se puede modificar de varias maneras como, por ejemplo, variando las concentraciones de trombina, de fibrinógeno, de ácido hialurónico o de otras proteínas presentes en el medio (Hayen y col., 1999). Además, la concentración de calcio presente en el medio también influye en su estructura (a mayor concentración de calcio, mayor diámetro de las fibras de fibrina) así como el pH (en pH alcalino las fibras de fibrina se disponen longitudinalmente). La fibrina se ha venido utilizando durante mucho tiempo como adhesivo quirúrgico (Sierra, 1993) pero su uso en el Sistema Nervioso es controvertida ya que inhibe la adhesión y la migración de las células de Schwann (Akassoglou y col., 2003). Por ello, es necesario modificar la fibrina, por ejemplo, con moléculas promotoras de la adhesión celular como los péptidos derivados de la laminina (RGD), de la N-cadherina o de la heparina (Schense y Hubbell, 2000). Además, las propiedades diamagnéticas de los monómeros de fibrina también permiten su orientación mediante campos magnéticos, modificando sus propiedades mecano-estructurales y favoreciendo la extensión de neuritas (Dubey y col., 2001). Por último, la fibrina posee propiedades angiogénicas dependientes de su concentración (Nehls y Herrmann, 1996), y puede transportar neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3, GDNF) y factores de crecimiento (FGF2). Por todo ello, la fibrina, debidamente modificada, es un buen candidato para su uso en la reparación del Sistema Nervioso (sobre todo, en la médula espinal), o como vehículo para liberar en él sustancias que ayuden a su reparación (Ahmed y col., 2008).
- Fibronectina. La fibronectina es una glicoproteína que interviene en una amplia variedad de interacciones celulares con las moléculas de la ECM y juega un papel muy importante en la adhesión, la migración, el crecimiento y la diferenciación celulares. La fibronectina es una molécula dimérica que contiene dominios de unión a la heparina, al colágeno/gelatina y a la fibrina. Inicialmente, fue descrita en el cerebro en desarrollo, donde es producida por los astroblastos y media el crecimiento neurítico (Matthiessen y col., 1989). Se han desarrollado

sustratos de fibronectina con fibras orientadas que estimulan la regeneración axonal (Ahmed y Brown, 1999). Además, la fibronectina sirve como vehículo portador y presentador de neurotrofinas, de modo que, al estar unidos a ella, mejoran sus cualidades promotoras de la regeneración axonal (Whitworth y col., 1996).

- Ácido hialurónico. El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano presente en diversos tejidos como el tejido conjuntivo, el tejido epitelial y el tejido nervioso, donde es uno de los componentes mayoritarios de la ECM. Las matrices de ácido hialurónico presentan una estructura altamente hidratada lo que facilita el movimiento celular, la extensión neurítica y la difusión de moléculas señalizadoras (Laurent y Fraser, 1992), procesos esenciales en la regeneración nerviosa. Así, los geles de ácido hialurónico han sido ensayados en modelos de lesión de nervio periférico, observándose un aumento en la regeneración y en la mejora funcional (Wang y col., 1998). Sin embargo, debido a que probablemente aceleran la maduración axonal, no resultan apropiados por sí solos a largo plazo. Recientemente, se han realizado estudios que demuestran la baja toxicidad y buenas propiedades angiogénicas de los geles de ácido hialurónico (Jansen y col., 2004), proponiéndose como sustrato para regeneración nerviosa (Cui y col., 2006). Con el fin de mejorar sus propiedades biofísicas, se ha modificado su porosidad y viscosidad mediante la unión a poli-D-lisina, aumentando su susceptibilidad a ser invadido por células nerviosas y disminuyendo la reacción del sistema inmune hasta niveles similares a los de los implantes inertes (Tian y col., 2005).
- Laminina. La laminina es un componente fundamental de la membrana basal de los tejidos. Resulta un componente estructural esencial tanto para la organización como para la diferenciación celular, procesos mediados por su interacción con receptores de la membrana celular de la familia de las integrinas. La laminina es una molécula de la ECM altamente promotora de la neuritogénesis (Manthorpe y col., 1983), pero los geles de laminina limitan la migración celular y la difusión de factores de crecimiento a concentraciones superiores a 4 mg/ml (Labrador y col., 1998). Por ello, la laminina siempre se utiliza combinada con otros componentes, no como geles exclusivos de esta proteína.
- Matrigel™. Bajo el nombre de Matrigel™, la empresa BD Biosciences comercializa un extracto soluble de membrana basal purificado a partir de un sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón (Kleinman y Martin, 1989; Kleinman y Martin, 1992). Existen otras casas comerciales que purifican el mismo tipo de extracto de membrana basal y le incluyen ciertas modificaciones, por lo que lo comercializan con otros nombres (por ejemplo, Cultrex® de la casa comercial R&D). A temperatura ambiente, el Matrigel™ forma un gel no poroso compuesto por laminina, colágeno tipo IV, entactina y proteoglicanos del tipo heparán

sulfato, además de factores de crecimiento solubles como IGF-1, TGF- β , PDGF y EGF. Hasta ahora, el Matrigel™ se ha utilizado principalmente como vehículo para transportar células o factores tróficos, ya que por sí sólo no induce ni regeneración ni vascularización. También ha sido ensayado en cultivos de células madre embrionarias y adultas (Kleinman y Martin, 2005; Gelain y col., 2006; Ma y col., 2008; Thonhoff y col., 2008).

- Agar. El agar es un polisacárido sin ramificaciones que resulta de la combinación de dos polisacáridos, la agarosa y la agarpectina, y que se obtiene de la pared de varias especies de algas (*Gelidium*, *Eucheama* y *Gracillaria*). Cuando está en solución, a altas temperaturas se encuentra en estado líquido, ya que sus cadenas se encuentran desenrolladas y plegadas al azar; sin embargo, al enfriarse, se producen interacciones entre las cadenas de agarosa, solidificando y formando un gel. El agar como tal ha sido muy poco utilizado en Ingeniería Tisular aplicada al Sistema Nervioso, salvo para el cultivo de neuronas espinales de embrión de rata (Mandys y col., 1991).
- Agarosa. La agarosa es un polímero de α -L-galactosa y β -D-galactosa, obtenido a partir de algas (*Gelidium* y *Gracillaria*). Es soluble en agua a temperaturas superiores a 65°C y, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas en sus cadenas laterales, gelifica en un rango de entre 17 y 40°C. Estudios iniciales mostraron que, cuando se cultivan neuronas en su interior, la morfología y el tamaño de poro de la agarosa influyen en la emisión, elongación, organización y dirección de crecimiento de las neuritas a través del gel. Así, se comprobó que las neuronas no pueden emitir neuritas a concentraciones de agarosa superiores a 1,25% (p/v), estableciéndose esta concentración como el umbral superior que permite el crecimiento neurítico en neuronas incluidas en agarosa (Bellamkonda y col., 1995). Al igual que con los geles de colágeno y de fibrina, la agarosa puede ser modificada con péptidos derivados de moléculas de adhesión como la laminina para aumentar la proporción de neuronas que extienden sus neuritas en el interior del gel (Borkenhagen y col., 1998). Recientemente, se ha desarrollado un método de congelación-secado que permite obtener matrices de agarosa con los poros orientados linealmente y susceptibles de cargarse con factores neurotróficos (Stokols y Tuszynski, 2004).
- Alginato. El alginato es un polisacárido natural extraído de algas marrones y que se compone de los monómeros β -D-manuronato y α -L-glucuronato. Es un material biocompatible e inmunológicamente inerte (Sennerby y col., 1987) pero no es digerido por las células de los mamíferos. Forma un gel en presencia de iones de calcio y sufre un proceso de degradación física cuando los iones de calcio difunden gradualmente fuera del gel, provocando que éste pueda ser degradado lentamente y excretado en la orina. Los geles de alginato presentan una

estructura porosa cuyo tamaño de poro se encuentra en función de la concentración de alginato. Estos geles permiten una buena adhesión celular sin perder su volumen inicial, comparado con los geles de colágeno que pierden hasta un 40% de su volumen después de ser implantados (Shapiro y Cohen, 1997). Además, los geles de alginato inducen la neovascularización en modelos de diferenciación de células madre embrionarias humanas (Gerecht-Nir y col., 2004). En muchos casos, la mejora inducida por el alginato en la supervivencia y en la regeneración neuronal puede complementarse con moléculas de la ECM o con factores neurotróficos. Los poros de los geles de alginato también se pueden orientar longitudinalmente, comprobándose un crecimiento orientado de las neuritas (Prang y col., 2006).

- Gelatina. La gelatina es una proteína que proviene de la hidrólisis del colágeno presente en el tejido conjuntivo de los animales y que no existe en ellos de forma natural. Su utilización en reparación nerviosa ha sido mediante su mezcla o entrecruzamiento con otros compuestos (Lu y col., 2007).
- Quitosano. El quitosano es un término que hace referencia a la quitina en diferentes estados de desacetilación y despolimerización. La quitina es un polímero estructural natural del exoesqueleto de los artrópodos y de algunos hongos. Se compone de poli-N-acetilglucosamina y β -1,4-glicósidos unidos, formando un polímero lineal. Dependiendo del grado de desacetilación de la quitina, se pueden obtener distintos tipos de quitosano con propiedades físico-químicas diferentes. Sus propiedades biocompatibles, biodegradables, hemostáticas y cicatrizantes, así como su acción antibacteriana y antifúngica, lo convierten en una molécula idónea para ser utilizada en reparación de lesiones en el Sistema Nervioso (Shi y col., 2006). Sin embargo, la propiedad más interesante del quitosano surge de su naturaleza policationica. Así, el quitosano es insoluble en soluciones acuosas a $\text{pH} \geq 7$, mientras que cuando el pH desciende a 6, los grupos amino de los azúcares se protonan y hacen que el compuesto comience a ser soluble. Además, estas características de polication lo hacen especialmente útil para unirlo a sustancias aniónicas como la heparina, dando lugar a toda una serie de estudios para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos de manera controlada. Teniendo en cuenta que las superficies cargadas positivamente resultan promotoras de la adhesión celular, se ha comprobado que el quitosano induce la adhesión celular y la extensión neurítica en células PC12 (Cheng y col., 2003) y en células de Schwann (Gingras y col., 2003).

1.2.2.2. Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos ofrecen una serie de ventajas frente a los polímeros naturales:

- Mayor biocompatibilidad.
- Posibilidad de modificar ampliamente su composición y sus propiedades mecánicas.
- Bajo coeficiente de fricción.
- Facilidad de procesado incluso en formas/estructuras complejas.
- Posibilidad de modificación físico-química superficial.
- Posibilidad de inmovilización de células o biomoléculas en su interior o en su superficie.

Sin embargo, también presentan una serie de desventajas:

- Presencia de sustancias indeseadas que pueden ser liberadas en el organismo.
- Facilidad de absorber agua y biomoléculas desde el ambiente circundante.
- Propiedades mecánicas inapropiadas.
- Dificultad de esterilización.

Los polímeros sintéticos surgen con la necesidad de mejorar las propiedades físico-químicas de los materiales (porosidad, velocidad de degradación, resistencia mecánica, flexibilidad), en la búsqueda por encontrar un sustrato óptimo capaz de ser modificado con otras sustancias (fármacos, moléculas promotoras de la regeneración, moléculas inmunomoduladoras).

A continuación se presentan algunos de los polímeros sintéticos ensayados en los últimos años para su aplicación en la reparación del Sistema Nervioso dañado.

- Poli-3-hidroxibutirato (PHB). Es un polímero de almacenamiento energético natural presente en el citoplasma de algunas bacterias y algas. Se trata de un sustrato biocompatible y de degradación lenta. Se han realizado estudios de implantes de PHB con células de Schwann en su interior o con moléculas de la ECM como la fibronectina, la laminina o el colágeno, observando que promueve la adhesión celular y la regeneración de las fibras nerviosas (Novikova y col., 2008).

- Poli (α -hidroxiácidos). En este grupo se incluyen el ácido poli-láctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA). Por ejemplo, se ha observado que el PLA cubierto con laminina promueve el crecimiento orientado de neuritas de DRG (Rangappa y col., 2000).
- Poli-L-láctico- ϵ -caprolactona (PLC). Es un buen polímero para regeneración nerviosa porque facilita la deposición de moléculas de la ECM como el colágeno (Jansen y col., 2004).
- Copolímero de trimetilcarbonato-caprolactona (TMC-CL). Es un polímero de reciente creación, cuyos productos de degradación son prácticamente inertes. Permite la supervivencia neuronal y la extensión de neuritas en su interior, además de promover la regeneración axonal al ser aplicado junto con células de Schwann. Tiene una estructura porosa que permite la libre circulación de metabolitos, por lo que permite pensar en su utilización como vehículo para transporte de moléculas (Lietz y col., 2006).
- Poli-etilenglicol (PEG). Es un polímero que se produce por la interacción de óxido de etileno con agua por lo que se caracteriza por tener un contenido acuoso importante, lo que le confiere unas propiedades mecánicas similares a las de los tejidos blandos. Sin embargo, es un polímero inerte que no permite la adhesión celular por lo que se le están incorporando moléculas de adhesión celular como el péptido RGD. Se ha utilizado ampliamente en lesiones de médula espinal (Donaldson y col., 2002).
- 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), poli-HEMA (pHEMA), poli-glicerilmetacrilato (pGMA) y poli-2-hidroxietilmetacrilato-co-metilmetacrilato (pHEMA-co-MMA). Los geles de pHEMA, fácilmente modificables, permiten fabricar canales orientados longitudinalmente en su interior para inducir respuestas de crecimiento celular alineadas (Flynn y col., 2003). También se han construido geles de pHEMA-co-MMA con una porosidad y propiedades físicas adecuadas para ser utilizadas en regeneración axonal (Dalton y col., 2002). En este sentido, también se han probado geles de pHEMA-co-MMA suplementados con polímeros naturales y/o con factores tróficos.
- Poliuretano. Es un compuesto poco estudiado. En algunos estudios se han construido superficies de poliuretano con texturas alineadas donde se ha visto respuestas de crecimiento neurítico alineadas a partir de DRG (Zhang y col., 2005).

- Polifosfaceno. Es un compuesto no tóxico que permite la incorporación de factores promotores del crecimiento. Se ha estudiado en lesiones del Sistema Nervioso Periférico pero no se han observado mejoras significativas (Nicoli y col., 2000).
- Polifosfoéster (PFE). Es un compuesto biodegradable que permite la incorporación de moléculas en su estructura gracias a los restos de fosfato. Se ha estudiado en lesiones del Sistema Nervioso Periférico, observándose la promoción de la regeneración y de la remielinización de los axones lesionados (Wang y col., 1999).
- Copolímeros de poliacrilonitrilo/polivinilcloruro (PAN/PVC). Han sido diseñados para ser rellenos con Matrigel™ o con factores neurotróficos. Son semipermeables por lo que impiden la invasión excesiva de moléculas de la ECM (Xu y col., 1995).
- Geles de poliacrilamidas (PAA) o poli-hidroxipropilmetacrilamidas (PHPMA). La acrilamida como tal es un compuesto muy tóxico. Sin embargo, al mezclar la acrilamida con la bis-acrilamida en unas determinadas condiciones, se generan unos geles de PAA de estructura estable y no tóxica susceptibles de ser utilizados en regeneración nerviosa. Los geles más utilizados en este sentido son los de PHPMA, solos o modificados con moléculas de adhesión, que permiten el crecimiento tanto de células gliales como de neuronas, la deposición de la ECM y la angiogénesis (Woerly y col., 2001).
- Metilcelulosa. Es un polímero derivado de la celulosa que forma geles en solución acuosa cuando ésta se calienta, debido a interacciones hidrofóbicas entre sus moléculas. Sus propiedades físico-químicas pueden modificarse variando la concentración de metilcelulosa en la solución. Es biocompatible tanto *in vitro* como *in vivo* y promueve la regeneración nerviosa periférica (Wells y col., 1997).
- Materiales eléctricamente activos. Se ha conseguido duplicar la extensión de las neuritas de células PC12 cultivadas sobre polímeros conductores como el polímero de polipirrol (Schmidt y col., 1997; Zhang y col., 2007). También se ha conseguido estimular la diferenciación de células Nb2a sobre polímeros con cargas, como el polímero de etileno-propileno fluorado o el fluoruro de polivinildieno (Valentini y col., 1993).

1.2.3. Creación de microestructuras de superficie en biomateriales como guías de diferenciación neural

El problema de cómo crecer células neurales manteniendo su morfología y su funcionalidad intrínsecas es muy antiguo (Rall W, 1959), pero no se realizaron experimentos serios al respecto hasta 1994 de la mano de Fromherz y Schaden (Fromherz y Schaden, 1994). Los trabajos de estos investigadores utilizando neuronas de sanguijuela en cultivo, representaron el inicio del desarrollo de la tecnología de crecimiento celular guiado. El siguiente paso en este desarrollo consistió en la introducción, en el año 2002, de células madre/progenitoras como fuente de células proliferativas e indiferenciadas (Englund y col., 2002). Ese mismo año, se demostró la habilidad de la combinación de una matriz de PGA con células en la reconstrucción del tejido nervioso perdido en ratas (Park y col., 2002). Además, la aplicación de nuevas tecnologías de microfabricación de soportes en el campo de la Neurobiología entre los años 2002 y 2003, ha llevado a muchos grupos de todo el mundo a competir por el desarrollo de sustratos con microgeometrías de superficie con moléculas de señalización que permitan el crecimiento y la diferenciación neuronal guiada (Park y col., 2002; Oliva y col., 2003; Vogt y col., 2005). Por ejemplo, en el año 2006, se desarrollaron matrices biodegradables multicanal para promover la regeneración de la médula espinal dañada *in vivo* (utilizando células de Schwann como células nodrizas), obteniéndose unos resultados muy prometedores en este sentido (Moore y col., 2006). Este mismo año, aparecieron en la literatura numerosos trabajos de desarrollo de matrices con distintas microgeometrías capaces de guiar la regeneración neural *in vitro* (Recknor y col., 2006; Tsai y col., 2006; Johansson y col., 2006). Posteriormente, el descubrimiento de neuropéptidos capaces de regular el crecimiento axonal de una forma selectiva supuso el inicio de los intentos por controlar la vía de diferenciación dopaminérgica *in vitro* (Lin e Isacson, 2006; Lin y col., 2008).

De una manera generalizada, las principales áreas de aplicación de las nuevas tecnologías de microfabricación serían el desarrollo de biosensores, el desarrollo de matrices (del inglés, *arrays*) de ADN/ARN/proteínas y el desarrollo de dispositivos (del inglés, *chips*) de aplicación en Ingeniería Celular y Tisular (Chow y col. 2008). De hecho, los sustratos con microgeometrías están empezando a ser usados como soportes para cultivo celular, lo que conduce al desarrollo de nuevos ensayos que permiten controlar la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular de una manera selectiva (Khademhosseini y col., 2006; Borenstein y col., 2007; Lee y col., 2008).

Entre las nuevas tecnologías de microfabricación de bajo coste con aplicación potencial en el campo de la Biomedicina se encuentran la técnica de microestampación por contacto (del

inglés, *microContact Printing*, μCP) y la técnica de fotolitografía (del inglés, *photolithography*) (Li y col., 2003). En ambos casos, tras el proceso de fabricación del sustrato, puede haber un paso posterior adicional de biofuncionalización o modificación superficial del mismo, con el objetivo de proporcionar a las células señales de adhesión, migración, proliferación y diferenciación específicas (Falconnet y col., 2006).

A continuación, se presentan brevemente estas dos técnicas de creación de microestructuras de superficie.

1.2.3.1. Microestampación por contacto

La técnica de microestampación por contacto se utiliza para estampar ciertas moléculas en la superficie de los sustratos mediante un molde o sello elastomérico con geometrías definidas. Las moléculas a estampar se unen al sello (normalmente de *Poli(Dimetil Siloxano)*, *PDMS*) antes de contactar con la superficie en la que se van a depositar de manera específica (Zhang y col., 1999; Vogt y col., 2004). La resolución de la geometría definida depende de la distorsión del sello durante el proceso de estampado y del tamaño de las moléculas adheridas al sello (Schmalenberg y Uhrich, 2005).

Una representación esquemática de cómo se lleva a cabo el proceso de microestampación por contacto se presenta en la **Figura 1.3**.

1.2.3.2. Fotolitografía

En la técnica de fotolitografía se utiliza una fotoresina selectiva expuesta a luz UV seguida de un ataque con disolventes para generar la estructura superficial deseada sobre el soporte que se desea modificar superficialmente (Yim y col., 2005; Hasirci y Kenar, 2006; Karp y col., 2006). Esta técnica se encuentra limitada a aplicaciones donde se requiere un mimetismo del microambiente para el desarrollo celular. Los retos a alcanzar para la aplicación efectiva de esta técnica en el campo de la Biomedicina incluyen (i) el mantenimiento de la integridad química de la superficie en presencia de los disolventes necesarios para definir el diseño final de la misma, y (ii) el uso de sustratos planos.

Una representación esquemática de cómo se lleva a cabo el proceso de fotolitografía se presenta en la **Figura 1.4**.

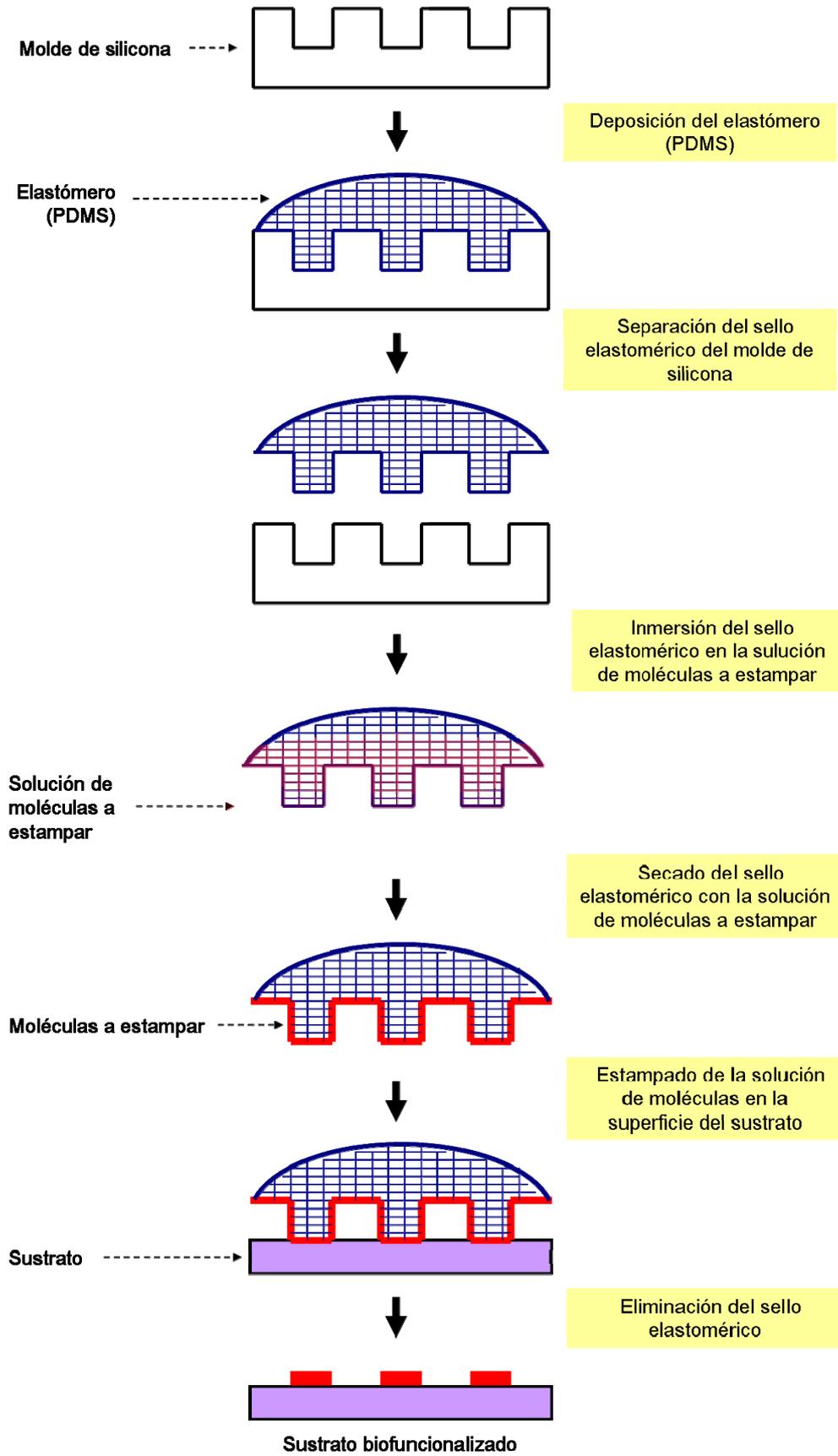


Figura 1.3. Representación esquemática de la microfabricación de sustratos con geometrías definidas mediante la técnica de microestampación por contacto.

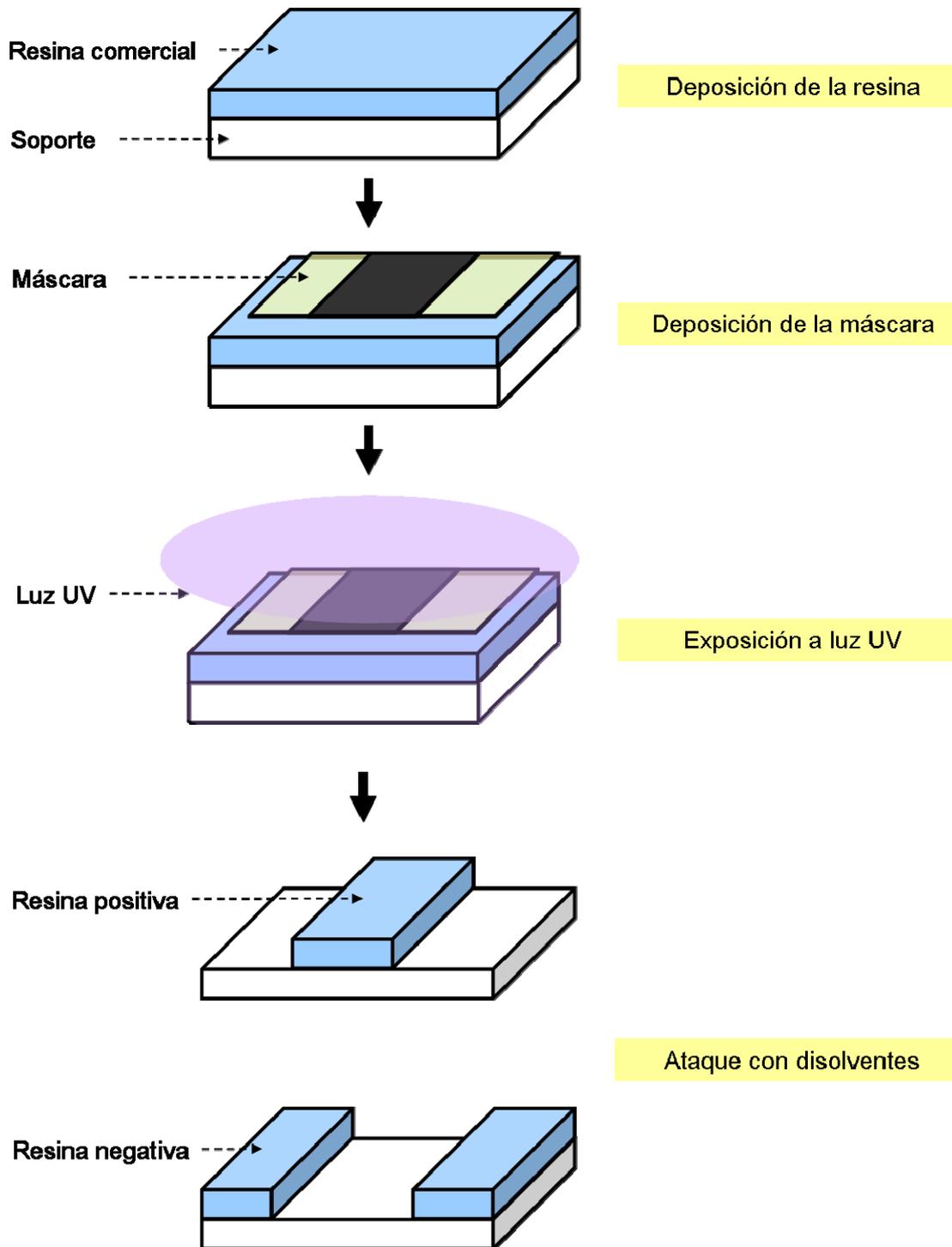


Figura 1.4. Representación esquemática de la microfabricación de sustratos con geometrías definidas mediante la técnica de fotolitografía.

Como ya se ha mencionado, ambas técnicas son muy importantes para la fabricación de biomateriales con microestructuras de superficie de aplicación en cultivos neuronales, ya que influyen en el comportamiento de las neuronas cuando son cultivadas sobre este tipo de sustratos. El crecimiento axonal (Flemming y col., 1999; Li y Folch, 2005), la formación de sinapsis específicas (Goldner y col., 2006) o la regeneración axonal (Schmalenberg y Uhrich, 2005) son algunas de las características que se ven afectadas por esas microgeometrías superficiales, haciendo que estas técnicas despierten un gran interés en la Ingeniería Tisular aplicada al Sistema Nervioso.

Además, ambas técnicas han sido utilizadas para simular el efecto de la ECM en el comportamiento neuronal (Schmalenberg y Uhrich, 2005). Para ello, se han utilizado tanto moléculas estructurales naturales de la propia ECM neural como moléculas señalizadoras del crecimiento axonal. En algunas ocasiones, estas moléculas estructurales naturales han sido sustituidas por materiales sintéticos como el poliestireno, el ácido poliláctico o la polilisina para inducir la diferenciación neuronal (Yang y col., 2005). En cualquier caso, los biomateriales con microestructuras de superficie resultan de vital importancia para lograr un crecimiento y una diferenciación neuronal guiados apropiados (Miller y col., 2002).

1.2.4. Matrices extracelulares

Los tejidos animales son extraordinariamente interesantes desde el punto de vista de la Ingeniería porque son materiales multicomponente (del inglés, *composites*) organizados mediante una estructura ordenada jerárquicamente desde la escala nanométrica hasta la escala macrométrica, lo cual determina sus propiedades y, consecuentemente, las funciones que desempeñan. Por lo tanto, los tejidos animales deben ser considerados estructuras complejas constituidas tanto por las células como por la matriz extracelular que las alberga. Por ello, tanto las células como la matriz extracelular determinan la estructura, las propiedades y la funcionalidad de un tejido.

Durante muchos años, se creyó que la matriz extracelular era sólo una superficie de soporte para los tejidos. Sin embargo, la presencia de una organización estructural bien definida hace que la matriz extracelular sea algo muy diferente a una simple suspensión de partículas en un fluido, confiriéndole unas características particulares de viscosidad, consistencia y resistencia que consiguen que actúe como adhesivo, lubricante y amortiguador de impactos (Ingber, 1991; Boudreau y col., 1995). Además, su estructura porosa reticulada permite la difusión de oxígeno, nutrientes, productos del metabolismo celular y moléculas de señalización intercelulares desde y

hacia las células. Cabe destacar también que la dinámica de interacción entre las células y la matriz extracelular, a través de unas proteínas de membrana específicas conocidas como integrinas, contribuye a la migración, proliferación, diferenciación y muerte celular. Además, en la mayoría de los tejidos de los mamíferos, las células son dependientes de anclaje para sobrevivir, es decir, se mueren si no disponen de un sustrato al que adherirse. Por ello, se dice que la viabilidad de los tejidos depende de un soporte sólido, a pesar de que cada tipo celular necesita un tipo de soporte sólido determinado, con un grado de dureza específico, que determina su proliferación, diferenciación y, en definitiva, su comportamiento (Discher y col., 2005).

Como se muestra en la **Figura 1.5**, la matriz extracelular está compuesta por proteínas, glicoproteínas, glucosaminoglicanos, proteoglicanos, ácido hialurónico, factores de crecimiento, factores de señalización, citoquinas y enzimas (Matins-Green, 1997; Hubbel, 2006). Concretamente, los glucosaminoglicanos (como el heparán sulfato o el condroitín sulfato), que al unirse a ciertas proteínas de la ECM forman los proteoglicanos, son los encargados de unir un gran número de factores de crecimiento que modulan su actividad (Varki y col., 1999). Por su parte, las proteínas fibrosas (como el colágeno, la laminina o la fibronectina) se encuentran dispersas entre los proteoglicanos formando un retículo con enlaces transversales que confieren a la ECM propiedades de consistencia y resistencia a la deformación.

En base a esta estructura, la matriz extracelular soporta y vehiculiza a las células hasta su tejido diana, por lo que permite situar grandes cantidades de células de manera eficiente en una zona específica deseada, guiando el proceso de desarrollo del nuevo tejido (Marler y col., 1998). En algunos casos, se ha utilizado la inyección directa de la suspensión celular en el organismo en ausencia de una ECM apropiada, pero resulta muy difícil controlar la localización exacta de las células trasplantadas.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la importancia de la matriz extracelular, el primer paso para obtener un tejido biológicamente funcional debe consistir en el desarrollo de un soporte poroso, sintético o natural, que imite a la propia matriz extracelular de ese tejido, y sobre el que se adhieran, proliferen y se diferencien las células potencialmente regenerativas, preferiblemente obtenidas del propio paciente en el que se desea insertar el tejido desarrollado. De esta manera, el soporte guiará el crecimiento de las células y la síntesis tanto de nueva matriz extracelular como de otras moléculas biológicas (Zhang y Ma, 2000).

Con lo sensible y lo complejo que es el cuerpo humano, y en particular el Sistema Nervioso, los requerimientos básicos que deben cumplir las matrices extracelulares utilizadas en

Ingeniería Tisular, y especialmente en Ingeniería Tisular aplicada al Sistema Nervioso, son múltiples y extremadamente exigentes (Murugan y Ramakrishna, 2007).

En primer lugar, y como ocurre con cualquier biomaterial destinado a ser insertado en el cuerpo humano, la biocompatibilidad de la matriz extracelular resulta fundamental, por lo que sus componentes no deben presentar ni citotoxicidad ni inmunogenicidad (Rezwana y col., 2006). En relación con esto, las matrices extracelulares desarrolladas deben ser fácilmente esterilizables para prevenir infecciones tanto en su superficie como en el interior de su estructura porosa (Chaikof y col., 2002). Además, deben presentar unas propiedades mecánicas adecuadas, similares a las del tejido diana, manteniendo su forma, su estructura y su integridad en el ambiente agresivo que constituye el medio biológico (Money y Langer, 1995; Uemura y col., 2003). Otro aspecto importante es que presente una microestructura adecuada, con una porosidad y un diámetro de poro óptimo para dirigir el crecimiento de cada tipo celular y ayudar a la vascularización interna del tejido. El rango de diámetro de poro óptimo abarca desde unos escasos micrómetros hasta cientos de micrómetros, dependiendo de la naturaleza del tejido que se desee regenerar. Además, debe ser biodegradable y con una velocidad de degradación apropiada que concuerde con la velocidad de formación de nuevo tejido, de forma que la carga se transfiera de forma progresiva (Langer y Vacanti, 1993). También cabe destacar la importancia de que interactúe con las células, mejorando las funciones de adhesión, crecimiento, migración y diferenciación celulares. Finalmente, se deben poder fabricar con distintos tamaños y formas y de una forma escalable.

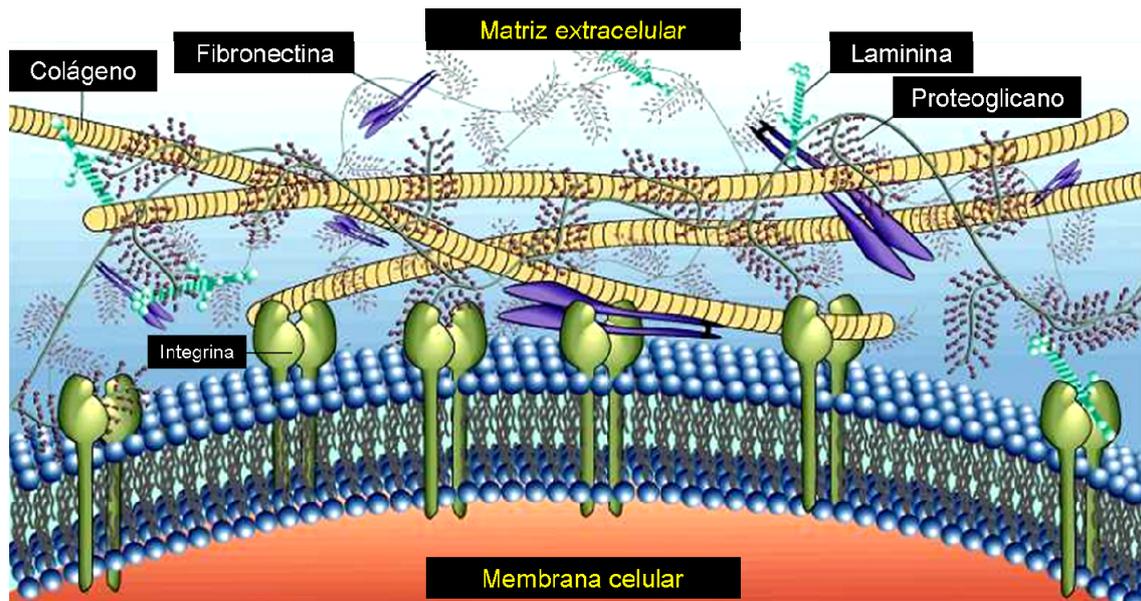


Figura 1.5. Modelo de organización macromolecular de la matriz extracelular (adaptado de Wiley y col., 1999).

1.2.4.1. Matrices extracelulares neurales

A pesar de que se han identificado numerosas moléculas relacionadas con el entorno natural de las células nerviosas, sólo unas pocas han sido investigadas desde el punto de vista de la Ingeniería Tisular. Estas investigaciones *in vitro* se han centrado en la capacidad de adhesión de las células neurales a esas moléculas y a su capacidad de extensión neurítica.

Como ya se ha comentado, la matriz extracelular juega un papel muy importante en este sentido, por lo que muchos de sus componentes proporcionan una base necesaria para el crecimiento tanto de las neuronas como de las neuritas *in vitro* (Corey y Feldman, 2003). De hecho, diversas enfermedades neurológicas (por ejemplo, la Enfermedad de Batten o la Enfermedad de Fabry) tienen su origen en estructuras anómalas de la matriz extracelular neural (del inglés, *Neural ExtraCellular Matrix, NECM*) que conducen a la aparición de desórdenes en la transmisión nerviosa (Cooper, 2003; Szpak y col., 2007). Incluso durante el desarrollo embrionario, la NECM juega un papel muy importante en la formación y expansión de la cresta neural (Mina y col., 1990; Perris y Perissinotto, 2000).

A pesar de que la mayor parte de la NECM es amorfa, existen zonas densas especializadas conocidas como redes perineuronales (del inglés, *PeriNeural Networks, PNNs*) alrededor de las neuronas, con huecos en los sitios donde se establecen los contactos sinápticos (Celio y col., 1998). Las redes perineuronales están formadas por proteoglicanos (basados en ácido hialurónico y neurocanos), proteínas de unión (colágeno, laminina y fibronectina) y neuropéptidos, y se encuentran involucradas en la regulación de la plasticidad neuronal (Pizzorusso y col., 2002) y en la neuroprotección (Morawski y col., 2004). De hecho, las células que se depositan en la NECM continúan proliferando porque se encuentran en un nicho especializado que las nutre, las mantiene en estado proliferativo y las dirige hacia fenotipos neuronales en el cerebro adulto (Hartig y col., 1999). Como se verá más adelante, los ensayos clínicos en los que se usan células madre neurales para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson concluyen que el microambiente entre y alrededor de las células dañadas permite el desarrollo de nuevas neuronas dopaminérgicas, pero que el número de neuronas dopaminérgicas funcionales que se generan es insuficiente para la clínica.

Por todo ello, resulta imprescindible desarrollar una NECM específica donde las células que se quieran utilizar para reemplazar a las células del Sistema Nervioso dañado encuentren las condiciones apropiadas para su posterior crecimiento y diferenciación.

1.3. TERAPIA CELULAR

Antes de pasar a definir el concepto de célula madre/progenitora y a presentar distintos tipos de células madre/progenitoras con potencial en Terapia Celular dirigida a la reparación del Sistema Nervioso dañado, es necesario comentar brevemente algunos aspectos importantes tanto del desarrollo embrionario del Sistema Nervioso como de la neurogénesis existente en el Sistema Nervioso adulto.

1.3.1. Desarrollo embrionario del Sistema Nervioso

El Sistema Nervioso de los vertebrados procede del ectodermo embrionario que, mediante dos procesos de neurulación consecutivos (neurulación primaria y neurulación secundaria), da lugar al tubo neural (**Figura 1.6**). En el año 2000, Jessel y Sanes describieron el inicio de este proceso, mediado al menos por dos tipos de mecanismos: (i) el bloqueo de la señalización de las proteínas morfogenéticas del hueso (del inglés, *Bone Morphogenetic Proteins, BMPs*) por moléculas inductoras de la neurulación como las proteínas nogina (del inglés, *Noggin*) y cordina (del inglés, *Cordin*), y (ii) la inhibición de los genes que codifican las BMPs por parte de los factores de crecimiento fibroblásticos (del inglés, *Fibroblast Growth Factors, FGFs*) (Jessel y Sanes, 2000). Anatómicamente, la neurulación comienza con la elevación de los bordes externos del ectodermo embrionario que, a continuación, se extienden de una forma convergente medial hasta conectarse y fusionarse, con la consecuente separación del ectodermo cutáneo (Keller, 2005). De esta forma, una vez que se completa la formación del tubo neural, todo el Sistema Nervioso se encuentra cubierto por la piel. Posteriormente, se produce la oclusión del tubo neural y el cierre del neuroporo anterior cranealmente al primer par de somitas. De esta forma, se origina un tubo neural lleno de líquido, lo que constituye una especie de sistema ventricular primitivo que genera una fuerza intraluminal, cuyo resultado será la formación del cerebro, la médula espinal y los sistemas ventriculares definitivos. La diferenciación del tubo neural en las distintas regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) tiene lugar simultáneamente de tres formas diferentes: (I) a nivel anatómico, el tubo neural se abulta y constriñe formando las distintas vesículas del cerebro y de la médula espinal; (ii) a nivel tisular, las células de la pared del tubo neural se reordenan para formar las distintas regiones funcionales; y (iii) a nivel celular, las células neuroepiteliales se diferencian en los distintos tipos de neuronas y de células gliales (**Figura 1.7**) (Gilbert, 2003).

Clásicamente, se proponía que estas células neuroepiteliales eran las que daban lugar tanto a células progenitoras neuronales como gliales, a partir de las cuales se generaban

neuronas y células gliales, respectivamente (Gilbert, 2003). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que la mayor parte de las neuronas de las distintas regiones cerebrales proceden de la glía radial (Anthony y col., 2004). Por un lado, el grupo del Dr. Howard habla de la glía radial como el principal tipo de progenitor neural -además de su conocido papel en la migración neuronal-, a pesar de que sus características moleculares y espaciotemporales aún son bastante desconocidas (Howard y col., 2006). Por otro lado, el grupo del Dr. Álvarez-Buylla propone a la glía radial como un tipo celular con capacidad de autorrenovación y de generación de fenotipos neuronales en edades embrionarias, y neuronales y gliales en edades adultas (Álvarez-Buylla y Lim, 2004). De esta forma, al concepto tradicional de generación de neuronas y células gliales se ha de añadir el de generación de la glía radial. Por ello, se propone que las células neuroepiteliales experimentan divisiones simétricas que permiten su expansión en un estadio temprano del desarrollo, y que, posteriormente, sufren divisiones asimétricas que dan lugar a una progenie diferenciada. En primer lugar, mediante una fase neurogénica en la que la glía radial genera principalmente células progenitoras neuronales -además de ser utilizada para la migración radial-; y, más adelante en el desarrollo, mediante una fase gliogénica en la que la glía radial genera mayoritariamente precursores gliales que, a su vez, darán lugar a neuronas y a células gliales (Temple, 2001; Merkle y Álvarez-Buylla, 2006; Shen y col., 2006). Por todo ello, generalmente se defiende que las células madre neurales se deben encontrar en una de las fases anteriores, generando más progenitores neuronales o gliales dependiendo del momento del desarrollo en el que se encuentren.

Además de los procesos de diferenciación celular, la migración neuronal es un proceso fundamental que ocurre a lo largo del tubo neural y en las crestas neurales durante el desarrollo embrionario del Sistema Nervioso. Las células postmitóticas inmaduras tienen que migrar desde su lugar de producción (zona ventricular) hasta su destino definitivo. Mediante esta migración, las neuronas se sitúan en posiciones específicas para su interacción con otras neuronas. La posición final de cada neurona postmitótica es especialmente crítica, ya que la función neural depende de las conexiones precisas que se establezcan entre las neuronas y sus dianas. En muchas regiones del SNC, las neuronas son guiadas a su destino final en íntimo contacto con las prolongaciones de la glía radial, un tipo especial de célula glial que actúa como guía celular (migración radial), tal y como se apuntaba anteriormente (**Figura 1.7**). En este proceso ciertas moléculas de adhesión (como la laminina o la fibronectina) y ciertas moléculas señalizadoras (como las integrinas o la neuregulina) están presentes tanto en la neurona migratoria como en la glía radial, determinando la unión de la neurona con la célula glial, su desplazamiento y separación. En base a estos conceptos, se hace patente la necesidad de un soporte que guíe la diferenciación y la migración neuronal y glial a la hora de reconstruir el tejido nervioso dañado, tal y como ocurre en el Sistema Nervioso en desarrollo.

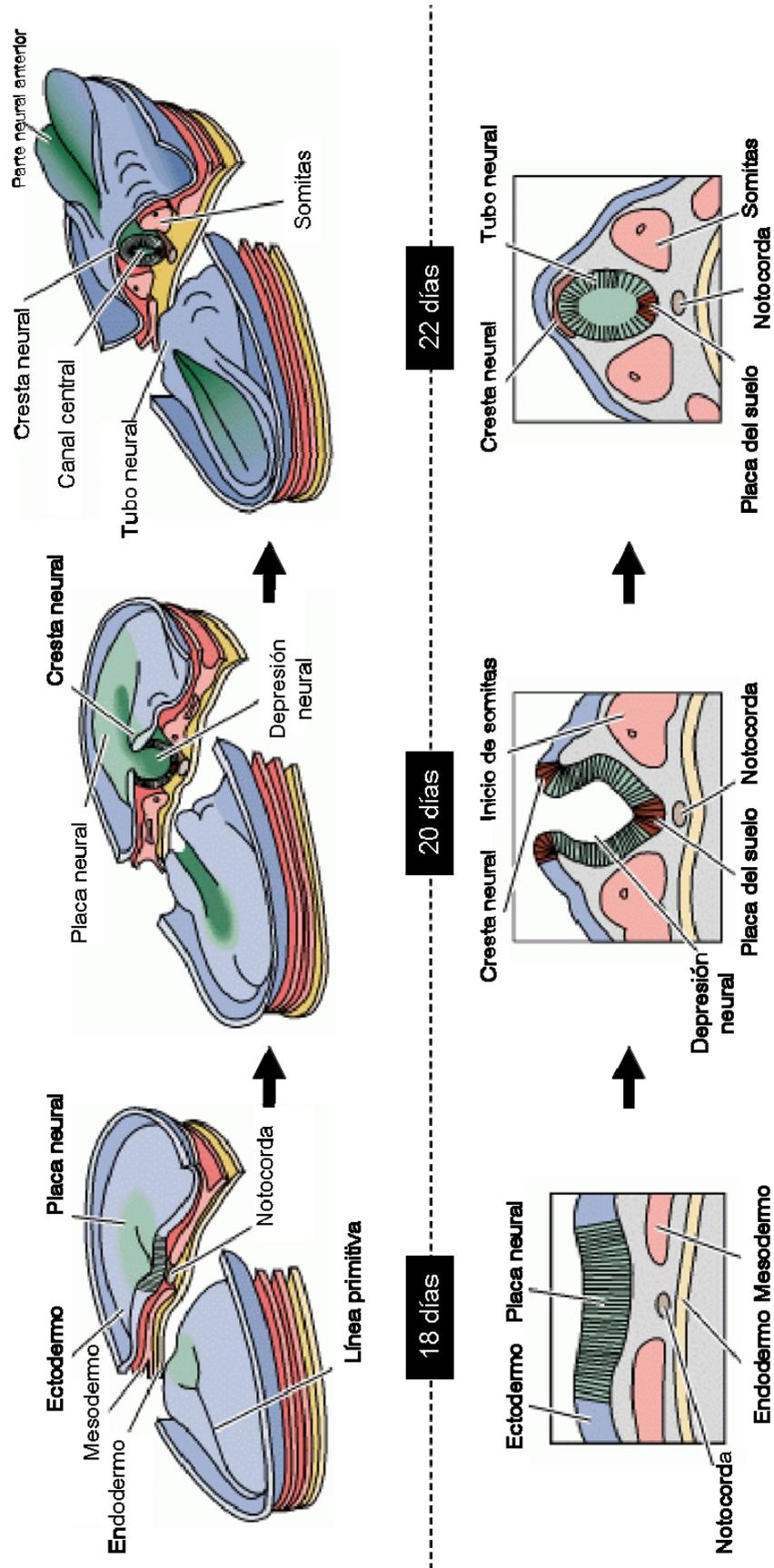


Figura 1.6. Representación de las principales etapas que tienen lugar durante la formación del tubo neural (futuro Sistema Nervioso) (adaptado de Purves y col., 2008).

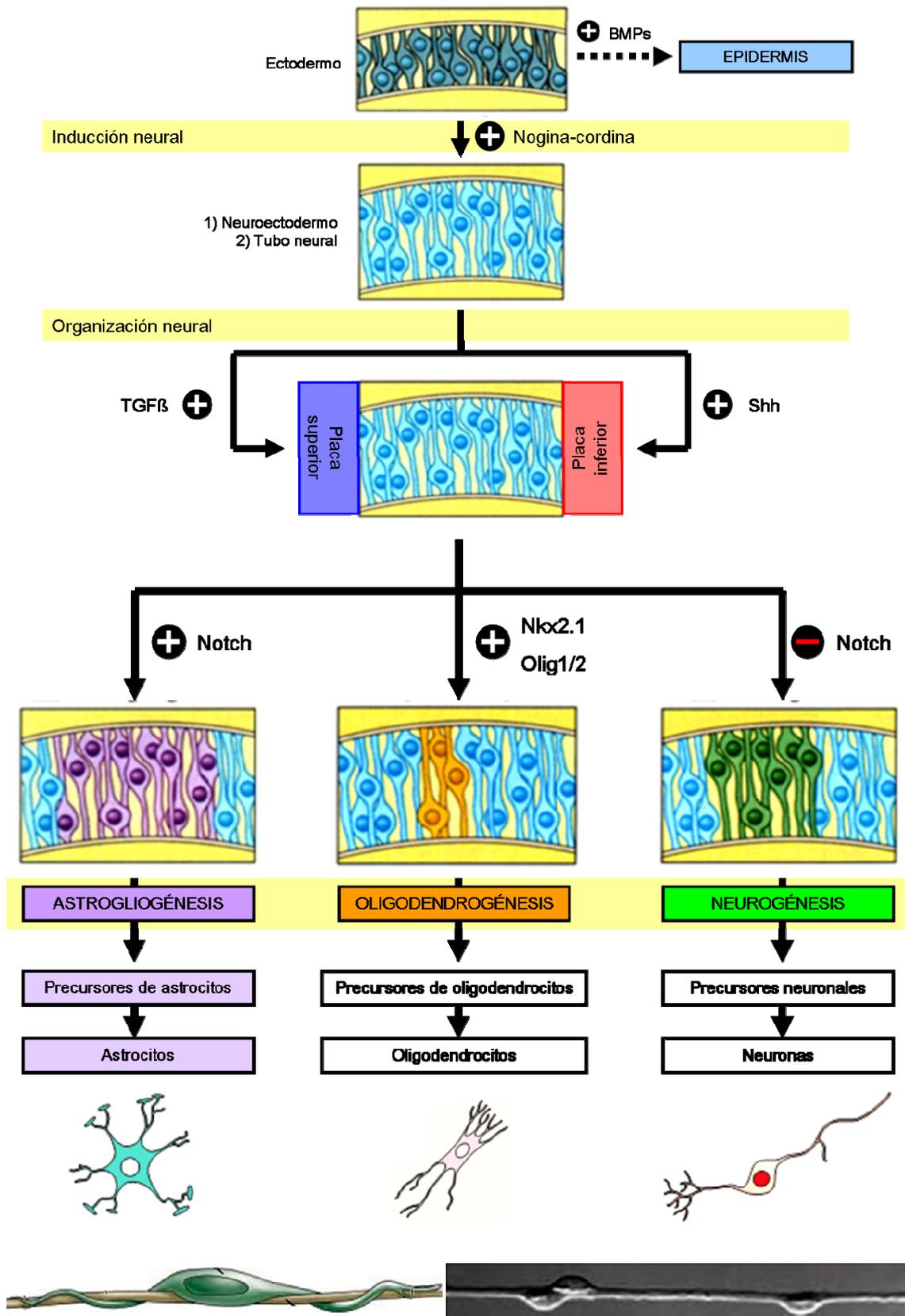


Figura 1.7. Representación de la generación de los distintos tipos celulares que componen el Sistema Nervioso, con indicación de la migración neuronal a través de la glía radial (adaptado de Kintner, 2002).

1.3.2. Neurogénesis adulta

Hasta los años sesenta, se pensaba que el cerebro adulto era una estructura bastante estática, sin capacidad de renovación ni para generar nuevas neuronas ni para formar nuevas conexiones neuronales. Sin embargo, a principios del siglo XX, Ramón y Cajal ya postuló que la falta de regeneración nerviosa en el SNC podría no ser un hecho totalmente irreversible, y que el crecimiento de las fibras nerviosas estaría limitado por el medio físico y químico que rodea a dichas fibras (Ramón y Cajal, 1913-1914). Entre 1968 y 1969, Hinds y Altman demostraron la capacidad del cerebro adulto para generar nuevas neuronas en roedores (Hinds, 1968; Altman, 1969), a pesar de que el pensamiento prevalente hasta ese momento era que las únicas células que se regeneraban en el Sistema Nervioso adulto eran las células gliales. En ese momento, comenzó a hablarse de neurogénesis en el cerebro adulto (Chojnacki y col., 2009). Posteriormente, estas observaciones fueron apoyadas por otros autores que trabajaban con pájaros (Nottebohm, 2002), con roedores (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Doetsch y col., 1999), con primates no humanos (Kornack y Rakic, 2001) y con humanos (Sanai y col., 2004).

Mientras que en el SNC embrionario se han aislado células madre/progenitoras neurales de prácticamente todas las regiones estudiadas (Temple, 2001; Vicario-Abejón y col., 2003), en el SNC adulto la neurogénesis queda restringida a tres zonas determinadas (Ming y Song, 2005) que son (i) la zona subventricular (Reynolds y col., 1992; Doetsch y col., 1999; Capela y Temple, 2002; Sanai y col., 2004); (ii) la capa subgranular del giro dentado del hipocampo (Gage, 2000; Palmer y col., 2000) ó, según otros autores, la capa subependimal del ventrículo lateral próxima al giro dentado (Seaberg y van der Kooy, 2003); y (iii) el bulbo olfatorio (Pagano y col., 2000; Gritti y col., 2002; Liu y Martin, 2003). Algunos autores apuntan, además, la existencia de neurogénesis en la médula espinal (Weiss y col., 1996), en la corteza cerebral (Gould y col., 1999) o, incluso, en la sustancia negra (Lie y col., 2002; Zhao y col., 2003), pero sus observaciones resultan muy controvertidas.

A pesar de ser más escasas las regiones del SNC adulto donde se pueden encontrar células madre/progenitoras neurales, el hecho de que la fuente de obtención de las mismas sea un tejido adulto, hace que las células madre/progenitoras neurales adultas sean muy atractivas para su uso en Terapia Celular y en Medicina Regenerativa, evitando con ello los problemas éticos que se presentan en determinados sectores de la sociedad con el uso de las células madre embrionarias (Lledo y col., 2006).

A continuación se presentan las características fundamentales que definen tanto a las células madre embrionarias como a las células madre/progenitoras adultas, con indicación de

algunos de los tipos de células madre/progenitoras neurales más atractivas para su utilización en Terapia Celular aplicada al Sistema Nervioso dañado.

1.3.3. Células madre

Las células madre (del inglés, *Stem Cells, SCs*) fueron descubiertas por primera vez en el año 1963 por el grupo del Dr. Becker cuando, al inyectar células derivadas de médula ósea en ratones inmunosuprimidos, se dieron cuenta de que el número de nódulos que se formaban en el bazo de estos ratones era proporcional al número de células de médula ósea inyectadas, concluyendo que cada nódulo se formaba a partir de una sola célula (Becker y col., 1963). Seguidamente, descubrieron que estas células eran capaces de auto-renovarse de forma indefinida, principal característica de las células madre.

Las células madre son células indiferenciadas que presentan dos características esenciales que las definen: (i) la capacidad ilimitada de auto-renovarse y (ii) la capacidad de generar, mediante división simétrica, dos células madre similares a ella misma, o, mediante división asimétrica, una célula madre y una célula progenitora que podrá dar lugar a células de distintos linajes bajo las condiciones adecuadas (Weissman, 2000; Körbling y Estrov, 2003; Li y Xie, 2005; Morrison y Spradling, 2008). A diferencia de las células madre, las células progenitoras (del inglés, *progenitor cells*) se definen como células proliferativas, con capacidad limitada de auto-renovación, frecuentemente unipotentes y con una capacidad de diferenciación más limitada que las células madre. El término de célula precursora (del inglés, *precursor cell*) no es tan estricto en su definición y se utiliza para cualquier célula temprana en el desarrollo (McKay, 1997). Por lo tanto, la diferencia entre célula progenitora y célula precursora no se encuentra bien definida y, en ocasiones, se emplean ambos términos de forma indistinta aunque considerando en todo momento que la célula progenitora es una célula más cercana a la célula postmitótica y diferenciada (Seaberg y van der Kooy, 2003).

Tanto las células madre como las células progenitoras/precursoras se encuentran presentes en embriones tempranos, en tejidos fetales y, posiblemente, en la mayoría de los tejidos adultos, de los cuales, la médula ósea y la sangre son los ejemplos mejor estudiados. Por lo tanto, dependiendo del grado de desarrollo de la fuente de obtención, las células madre se pueden clasificar en tres tipos básicos: (i) embrionarias, (ii) fetales y (iii) adultas (Sun y col., 2007). Por otro lado, dependiendo de su potencial de desarrollo, se pueden distinguir tres tipos de células madre: (i) el cigoto y las células que se obtienen del mismo en las divisiones iniciales (es decir, el embrión en los estadios de 2 y 4 células), que al ser células totipotentes pueden dar

lugar tanto al trofoblasto (que dará lugar a su vez a la placenta) como a todos los tipos celulares que constituyen el embrión; (ii) las células madre embrionarias (del inglés, *Embryonic Stem Cells, ESCs*), que se encuentran presentes en la masa celular interna del blastocisto antes de su implantación y que, al ser células pluripotentes, pueden dar lugar a células de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) y a células germinales; y (iii) las células madre no embrionarias (del inglés, *non-Embryonic Stem Cells, non-ESCs*) o adultas, que, al ser células multipotentes, encuentran limitada su capacidad de dar lugar a distintos tipos celulares. Dentro de estas últimas, se pueden distinguir las células madre germinales -implicadas en la reproducción- de las células madre somáticas -necesarias para la organogénesis-, estando ambos tipos de células localizados en microambientes o nichos especializados (del inglés, *niches*) después del nacimiento (Li y Xie, 2005; Bajada y col., 2008). En base a estudios realizados con células madre somáticas de diversos tejidos, se ha llegado al consenso de que estas células madre son células morfológicamente y bioquímicamente indiferenciadas que poseen un gran potencial proliferativo, siendo responsables del mantenimiento en el tiempo y de la regeneración del tejido al que pertenecen. Además, representan una baja proporción de células en comparación con su progenie amplificadora transitoria (del inglés, *transit amplifying cells*) -junto a la que se sitúan siguiendo el esquema de célula madre → célula amplificadora transitoria → célula terminalmente diferenciada-, y proliferan lentamente *in vivo* (lo que les permite conservar su potencial proliferativo y minimizar los errores que ocurren en el ADN durante la replicación), a pesar de que pueden proliferar intensamente en respuesta a distintos estímulos de crecimiento. Finalmente, se localizan en regiones bien definidas morfológicamente, protegidas y altamente vascularizadas.

1.3.3.1. Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias fueron aisladas por primera vez en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981) a partir de blastocistos de ratón, utilizando técnicas basadas en las técnicas de cultivo de las células madre de carcinoma. Desde entonces y, sobre todo, a partir del aislamiento de las ESCs humanas en 1998 (Thomson y col., 1998), este tipo de células han sido objeto de numerosas investigaciones con el objetivo de conocer sus propiedades biológicas y su potencial terapéutico.

Como se ha apuntado anteriormente, las ESCs: (1) son células indiferenciadas con capacidad clonogénica; (2) son células pluripotentes; (3) tienen un cariotipo diploide estable; (4) generan teratomas si son transplantadas en ratones inmunodeprimidos; (5) son capaces de integrarse en el blastocisto de un embrión en desarrollo y formar quimeras; (6) se caracterizan

por la expresión de determinados marcadores de superficie (como SSEA 1-4) y de determinados factores de transcripción (como Oct-4 y Nanog) (Matsuda y col., 1999; Cavaleri y Scholer, 2003), así como por la expresión de determinados enzimas (como fosfatasa alcalina y telomerasa) que podrían explicar, en parte, su capacidad ilimitada de auto-renovación; (7) son células fáciles de modificar genéticamente.

Aunque estas células tienen una vida corta en el embrión *in vivo*, pueden propagarse de manera indefinida *in vitro* en un estado indiferenciado, cultivándolas en presencia del factor inhibidor de la leucemia (del inglés, *Leukemia Inhibitory Factor, LIF*) (Williams y col., 1988) y/o sobre una capa de fibroblastos murinos embrionarios (del inglés, *Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs*) -mitóticamente inactivados mediante irradiación o mediante tratamiento con mitomicina- que actúan como células nodrizas (Reubinoff y col., 2000). Además, si las ESCs son cultivadas en condiciones no adherentes (sin suero) forman los llamados cuerpos embrioides, que son unos agregados clonales esféricos compuestos por células madre indiferenciadas, células progenitoras determinadas y células diferenciadas espontáneamente hacia toda clase de fenotipos en función de los factores tróficos y de las moléculas señalizadoras presentes en el medio de cultivo.

La diferenciación de las ESCs en células neuronales fue publicada en 1995 por tres grupos de investigación independientes (Bain y col., 1995; Fraichard y col., 1995; Strübing y col., 1995). Posteriormente, diversos estudios también han demostrado la capacidad de las ESCs de generar precursores neuronales (Okabe y col., 1996), neuronas serotoninérgicas (Finley y col., 1996), gabaérgicas (Lee y col., 2000), glutamatérgicas (Kawasaki y col., 2000), dopaminérgicas (Lee y col., 2000) y motoras (Wichterle y col., 2002). Además de neuronas, también se han obtenido otros linajes neurales a partir de ESCs, como oligodendrocitos (Tropepe y col., 2001) y astrocitos (Tang y col., 2002).

A pesar de ello, la eficiencia de la diferenciación neural a partir de ESCs resulta baja comparada con otros linajes celulares, como el mesenquimal o el hematopoyético, por lo que, actualmente, se está haciendo hincapié en la diferenciación a partir de células madre/progenitoras neurales adultas (Zhou y col., 2008).

1.3.3.2. Células madre/progenitoras neurales adultas

El descubrimiento de las células madre/progenitoras neurales (del inglés, *Neural Stem Cells, NSCs*) en el SNC de mamíferos se produjo en base a estudios clásicos sobre hematopoyesis y desarrollo neural en invertebrados (Potten y Loeffler, 1990). A pesar de que, como se comentó anteriormente, en 1969 Altman definió la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto (Altman, 1969), no fue hasta 1992 cuando Reynolds y Weiss demostraron la existencia de NSCs en animales adultos, mediante su análisis clonal, su expansión *in vitro* y su diferenciación hacia los tres fenotipos neurales del Sistema Nervioso (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) (Reynolds y Weiss, 1992).

Por lo tanto, las NSCs son células determinadas hacia el linaje neural pero con capacidad de auto-renovación, indiferenciadas y multipotentes (McKay, 1997; Gage, 2000; Temple, 2001). Crecen en suspensión en medio de cultivo sin suero (condiciones no adherentes) suplementado con factores de crecimiento -como el factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal Growth Factor, EGF*) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (del inglés, *Fibroblast Growth Factor 2 or basic, FGF2*)-, formando unos agregados celulares esféricos, tridimensionales, heterogéneos y no adherentes conocidos como neuroesferas (del inglés, *neurospheres*), que pueden dar lugar tanto a neuronas como a células gliales cuando se cultivan en sustratos adhesivos en ausencia de estos factores de crecimiento (Reynolds y Weiss, 1992).

Por este motivo, la técnica del cultivo de neuroesferas, descrita con más detalle por Reynolds y Weiss en 1996 (Reynolds y Weiss, 1996) y representada en la **Figura 1.8**, se utiliza ampliamente como método de cultivo estándar para la obtención de NSCs con capacidad de auto-renovación (Singec y col., 2006; Brewer y Torricelli, 2007). Sin embargo, no siempre se consigue la proliferación deseada de estas células en cultivo, sobre todo en el caso de humanos, lo que sugiere la necesidad de una alta densidad celular, factores autocrinos/paracrinos y contactos celulares para inducir dicha proliferación (Hulsas y col., 1997). Aunque el proceso de formación de neuroesferas todavía no se conoce con detalle, la presencia o ausencia de formación de neuroesferas en cultivo se utiliza para determinar si una célula puede ser una NSC o no; el número de neuroesferas que se forman se utiliza como medida comparativa en la capacidad de obtención de NSCs de diferentes regiones o edades; el número de células dentro de una neuroesfera se utiliza para medir el grado de clonogenicidad a partir de una única NSC; la composición de una neuroesfera se utiliza para medir el grado de determinación neural dentro de un clon; y el diámetro de una neuroesfera se utiliza para medir el potencial mitogénico de moléculas inductoras (Deleyrolle y col., 2008).

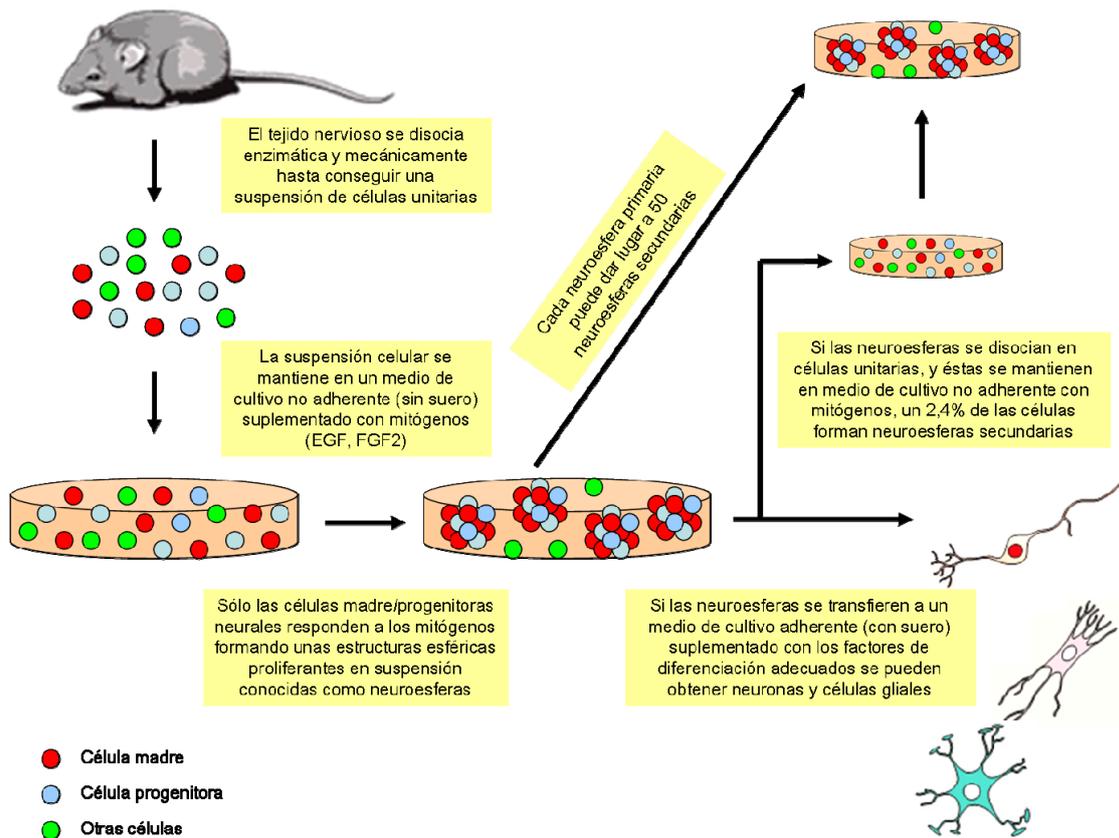


Figura 1.8. Aislamiento y expansión de células madre/progenitoras neurales utilizando el ensayo de neuroesferas (adaptado de Reynolds y Rietze, 2005; y de Jensen y Parmar, 2006).

A pesar de que, inicialmente, la formación de neuroesferas fue descrita sólo a partir de tejido nervioso, la caracterización de estructuras similares a neuroesferas (mamoesferas, dermoesferas, cromoesferas, mioesferas) ha sido descrita en varios tejidos no nerviosos (tejido mamario, piel, médula adrenal y músculo, respectivamente) para definir y medir el potencial de las células madre de dichos tejidos (Ponti y col., 2005; Gago y col., 2009; Chung y col., 2009; Nomura y col., 2007).

El proceso de diferenciación de las NSCs en células con fenotipo neuronal o glial, es inducido en condiciones de cultivo adherentes (con suero) mediante la retirada de los mitógenos EGF y FGF2 y la adición de factores de inducción neuronal o glial específicos, respectivamente. A medida que el proceso de diferenciación avanza, las NSCs limitan su capacidad de autorrenovación y su potencialidad, disminuyendo la expresión de ciertas proteínas asociadas a la pluripotencialidad neural, y aumentando la expresión de otras proteínas asociadas específicamente a fenotipos neuronales y gliales en distintos estadios de diferenciación, respectivamente.

En referencia a las proteínas expresadas de forma específica por las NSCs en estadios de pluripotencialidad, cabe destacar la expresión de las proteínas citoesqueléticas nestina (del inglés, *nestin*) (Johansson y col., 2002) y GFAP (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Alvarez-Buylla y Lim, 2004) así como la expresión de la proteína de unión al ARN musashi-1 (Sakakibara y col., 2006). Sin embargo, hoy en día todavía se desconoce un patrón único de expresión de proteínas específicas de NSCs adultas que, además, permita diferenciar minuciosamente entre células madre, células progenitoras y células precursoras neurales. Por ejemplo, en el caso de la nestina, la detección de esta proteína mediante inmunomarcaje específico no permite diferenciar entre células madre y células progenitoras/precursoras neurales, ya que, en ambos casos, la nestina se expresa de la misma manera, al igual que lo hace en la mayoría de las células del neuroepitelio embrionario antes de la neurogénesis. Sólo cuando estas células comienzan su proceso de diferenciación, disminuye la expresión de nestina y aumenta la expresión de otras proteínas específicas de la diferenciación neuronal (como β -III-tubulina y MAP2), astrocítica (como GFAP) y glial (como O4), respectivamente (Cattaneo y McKay, 1990; McKay, 1997).

1.3.3.2.1. Células madre/progenitoras neurales de la zona subventricular

Como se ha comentado anteriormente, una de las zonas neurogénicas del cerebro adulto es la zona subventricular (del inglés, *SubVentricular Zone, SVZ*), situada de forma adyacente a los ventrículos laterales. En esta zona se encuentran las NSCs que van a generar nuevas neuronas en el bulbo olfatorio. En el cerebro de roedores adultos, las NSCs migran alineadas (a través de la corriente migratoria rostral) formando cadenas de neuroblastos migratorios que mantienen la capacidad de dividirse hasta alcanzar el bulbo olfatorio. Una vez en él, las neuronas inmaduras se dispersan radialmente y completan su diferenciación en neuronas postmitóticas gabaérgicas y dopaminérgicas (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Doetsch y col., 1999; Pencea y Luskin, 2003). En el cerebro de humanos adultos, no se han descrito las cadenas de neuroblastos migratorios como tales, pero sí se han observado unas células aisladas con morfología migratoria en la zona subventricular anterior (Quiñones-Hinojosa y col., 2006).

Concretamente, la organización celular de la zona subventricular de los roedores fue descrita por Álvarez-Buylla y García-Verdugo en el año 2002 (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Como se muestra en la **Figura 1.9.A**, los distintos tipos celulares que constituyen la SVZ se encuentran dispuestos de una forma característica en la pared del ventrículo. Por un lado, las células de tipo B (GFAP positivas) son NSCs con capacidad de

auto-renovación y multipotencialidad; estas células son capaces de generar células de tipo C, es decir, células de amplificación transitoria y alta capacidad de proliferación, y que son capaces, a su vez, de generar células de tipo A, es decir, neuroblastos migratorios que se dirigen por la corriente migratoria rostral hasta alcanzar el bulbo olfatorio (Doetsch, 2003). Por otro lado, en contacto directo con el ventrículo, se encuentra una monocapa de células endimiales ciliadas (células de tipo E) que son las responsables de producir los factores de señalización que regulan el comportamiento de las NSCs (por ejemplo, Noggin, Shh y Notch).

En la SVZ de los humanos, también existe una monocapa de células endimarias en contacto directo con el ventrículo, pero el resto de la organización celular de la SVZ es distinta. Así, entre esta monocapa de células endimarias y la monocapa de NSCs se encuentra un espacio hipocelular y, tras la monocapa de NSCs, se encuentra una zona de transición al parénquima cerebral (Quiñones-Hinojosa y col., 2006).

A pesar de que el destino final de los neuroblastos generados por las NSCs de la SVZ es el bulbo olfatorio, si se produce una lesión en otras zonas del cerebro (por ejemplo el núcleo estriado), éstos neuroblastos pueden migrar hasta dicha región para diferenciarse en nuevas neuronas características de la región lesionada (en este caso, neuronas estriatales) (**Figura 1.9.B**). Precisamente, esta capacidad de plasticidad y migración de los neuroblastos generados a partir de las NSCs de la SVZ de los cerebros adultos, es lo que hace tan interesante a estas células como fuente de obtención de neuronas especializadas para Terapia Celular, sobre todo, de neuronas dopaminérgicas con aplicación en la Enfermedad de Parkinson.

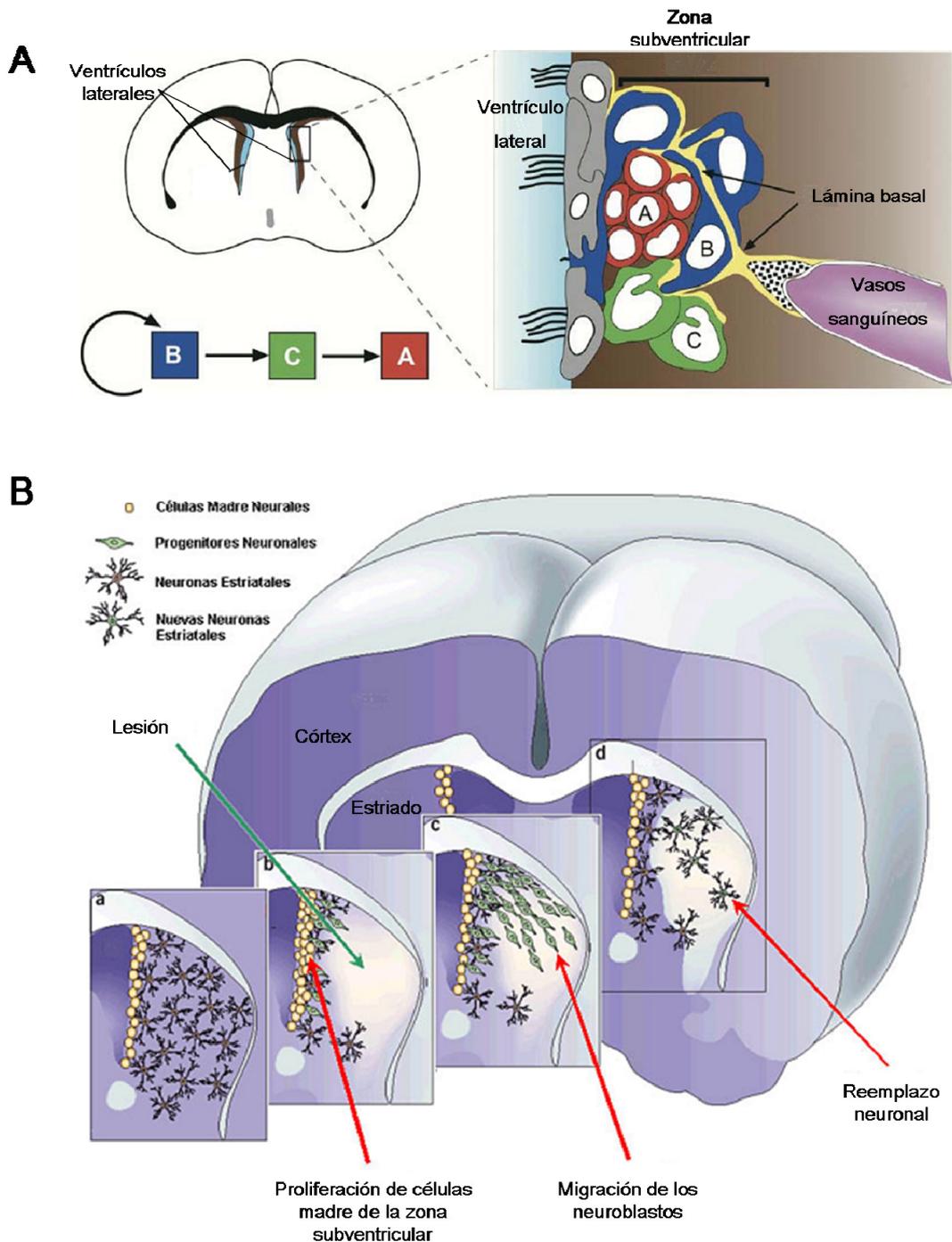


Figura 1.9. La zona subventricular es una zona de neurogénesis en el cerebro adulto. (A) Representación esquemática de la SVZ de roedores adultos donde se muestra que la zona adyacente a los ventrículos laterales contiene NSCs (células de tipo B) que mantienen el contacto con la lámina basal de los vasos sanguíneos. Estas células generan unas células transitorias con alta tasa proliferativa (células de tipo C) que, a su vez, son las que generan los neuroblastos (células de tipo A) que migran hacia el bulbo olfatorio. (B) Ejemplo en el que se muestra que una lesión en el córtex puede activar la generación de neuroblastos a partir de NSCs de la SVZ, que migran hacia la región lesionada para diferenciarse en nuevas neuronas estriatales. (Adaptado de Álvarez-Buylla y col., 2002; y de Lindvall y col., 2004; Curtis y col., 2007).

1.3.3.2.2. Células madre/progenitoras derivadas de la cresta neural

La cresta neural -estructura transitoria que se forma durante el desarrollo embrionario del Sistema Nervioso-, está formada por una población heterogénea de células transitorias (tanto células madre multipotentes como células progenitoras/precursoras comprometidas a un linaje específico, con distintos potenciales de proliferación y de diferenciación) que migran desde la zona dorsal del tubo neural hasta distintas regiones del embrión en desarrollo, donde se diferencian a distintos tipos celulares (neuronas y células gliales del SNP, células endocrinas, melanocitos, células musculares lisas, células de tejido conectivo, células de tejido cartilaginoso y células de hueso de cabeza y cuello) (Barembaum y Bronner-Fraser, 2005; Le Douarin y col., 2007; Dupin y col., 2007). Consecuentemente, estudios recientes han demostrado la existencia de células madre/progenitoras derivadas de la cresta neural en diversos tejidos adultos como nervios y ganglios periféricos, intestino, cuerpo carotídeo, pulpa dental, corazón y dermis (Le Douarin y col., 2008).

En el caso del cuerpo carotídeo, las células madre/progenitoras presentes en él muestran un elevado potencial neurogénico y producen factores dopaminérgicos y neurotróficos -de especial relevancia es el GDNF (del inglés, *Glial Derived Neurotrophic Factor*)-, por lo que suponen una fuente celular importante en Terapia Celular, sobre todo, para la obtención de neuronas dopaminérgicas aplicables a la Enfermedad de Parkinson (López-Barneo y col., 2009).

En el caso de la dermis, estudios pioneros realizados por el grupo de la Dra. Miller, demostraron la existencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de células progenitoras multipotentes derivadas de la cresta neural presentes en la dermis tanto de ratones (Toma y col., 2001; Fernandes y col., 2004) como de humanos (Toma y col., 2005). De hecho, la demostración formal de que estas células dérmicas derivan de la cresta neural se realizó mediante estudios de trazado de linaje en ratón Wnt1-Cre/R26R (ratón doble transgénico; herramienta más utilizada para trazar el destino de las células de la cresta neural desde el desarrollo embrionario hasta el adulto) mediante hibridaciones *in situ* de piel murina embrionaria y adulta (Fernandes y col., 2004; Hunt y col., 2008). Recientemente, también se ha descrito su existencia en otros modelos animales como el cerdo (Dyce y col., 2004), el perro (Valenzuela y col., 2008) y la rata (Biernaskie y col., 2007; Hunt y col., 2008). En este último caso, se han conseguido diferenciar neuronas dopaminérgicas que, al ser transplantadas en el cerebro de ratas parkinsonianas, conducen a una mejora significativa de los síntomas asociados a esta enfermedad (Kubo y col., 2009; Higashida y col., 2010). Dada la importancia de estas células como fuente de obtención de neuronas dopaminérgicas, las características detalladas de estas células se mostrarán más ampliamente en el apartado siguiente.

1.3.3.2.3. Células precursoras neurales derivadas de la piel

Desde la publicación del trabajo de Joshi y Enver en 2002 que demostraba que ciertas células madre adultas presentaban un amplio repertorio de diferenciación (Joshi y Enver, 2002), el interés de la Medicina Regenerativa se ha centrado en la posibilidad de obtener células madre a partir de tejidos adultos de forma alternativa a las células madre embrionarias. En este sentido, la población de células madre/progenitoras ideales sería aquella que derivara del propio paciente, permitiendo la realización de trasplantes autólogos.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y, al igual que el Sistema Nervioso, se forma a partir del ectodermo durante el desarrollo embrionario, tal y como se ha presentado anteriormente. En el año 2001, el grupo de la Dra. Miller aisló y caracterizó una población de células precursoras multipotentes a partir de la dermis de mamíferos (Toma y col., 2001), utilizando un protocolo similar al descrito por Reynolds y Weiss en 1992 para aislar y cultivar NSCs del tejido nervioso (Reynolds y Weiss, 1992). En un primer momento, estas células fueron aisladas a partir de piel de ratón y fueron diferenciadas tanto en células neurales como en células mesodérmicas (Toma y col., 2001; Fernandes y col., 2004). A pesar de que también se pueden aislar células precursoras mesenquimales a partir de la piel, los autores sugirieron que estas células eran un tipo diferente, por lo que las llamaron células precursoras derivadas de piel (del inglés, *SKin-derived Precursors, SKPs*) (las células precursoras mesenquimales no responden al protocolo descrito por Reynolds y Weiss). Como ya se ha comentado, una población de células madre embrionarias endógenas que presenta un potencial similar a estas células y que contribuye a la formación de la dermis, es la población de células madre/progenitoras de la cresta neural, por lo que se ha pensado que las SKPs representan a células precursoras relacionadas con la cresta neural embrionaria que aparecen en la piel durante la embriogénesis y persisten en bajo número en ella durante la edad adulta (Toma y col., 2001; Fernandes y col., 2004). De hecho, las SKPs proliferan de forma similar a las NSCs en medio de cultivo no adherente (sin suero) suplementado con los mitógenos EGF y FGF2, formando estructuras similares a las neuroesferas (ESNs). Además, una subpoblación de estas células también expresa la proteína nestina -igual que las NSCs- y ciertos factores de transcripción como Slug, Snail, Twist y Pax3 -igual que las células de la cresta neural-, pudiéndose diferenciar en células que expresan la proteína β -III-tubulina (del inglés, *β -III-tubulin*) y que presentan una morfología de neuronas recién formadas.

Por todo ello, se afirmó que las SKPs son células precursoras adultas multipotentes: (i) que crecen en suspensión formando estructuras similares a neuroesferas en presencia de EGF y FGF2; (ii) que expresan nestina y fibronectina -proteínas expresadas por las NSCs-, vimentina

-proteína expresada por las células mesodérmicas-, y factores de transcripción como Slug, Snail, Twist, Pax3 y Pax9 -expresados por las células de la cresta neural embrionaria-; (iii) que se pueden mantener en cultivo durante largos periodos de tiempo; y (iv) que se pueden diferenciar tanto en neuronas como en células gliales -incluyendo neuronas periféricas y células de Schwann-, además de en células musculares lisas (Toma y col., 2005).

Recientemente, distintos autores han publicado protocolos específicos para llevar a cabo el aislamiento, el mantenimiento y la proliferación de SKPs de diferentes modelos animales y de humanos, y para diferenciar estas células tanto a neuronas (células β -III-tubulina positivas) como a células de Schwann (células MBP y S100 positivas), tanto *in vitro* como *in vivo* (Toma y col., 2001; Fernandes y col., 2004; Joannides y col., 2004; Toma y col., 2005; Biernaskie y col., 2006; Fernandes y col., 2006; McKenzie y col., 2006; Biernaskie y col., 2007; Gingras y col., 2007; Valenzuela y col., 2008; Fernandes y Miller, 2009; Hunt y col., 2009; Kubo y col., 2009; Higashida y col., 2010). En el caso de la diferenciación glial, se ha demostrado que las SKPs responden a señales de la cresta neural (por ejemplo, neuregulinas) dando lugar a células de Schwann que expresan fenotipo mielinizante cuando se co-cultivan con axones periféricos (Biernaskie y col., 2006; Biernaskie y col., 2007). En el caso de la diferenciación neuronal, estudios electrofisiológicos de SKPs diferenciadas en condiciones neurogénicas durante más de 30 días en cultivo mostraron que las neuronas generadas eran capaces de sufrir despolarización al producirse un incremento transitorio de calcio intracelular (Joannides y col., 2004), pero eran incapaces de generar potenciales de acción (Fernandes y col., 2006; Collo y col., 2006).

A pesar de ello, las SKPs representan una fuente autóloga accesible y disponible de células precursoras neurales de gran utilidad en Medicina Regenerativa aplicada al Sistema Nervioso dañado. Así, por ejemplo, las células de Schwann diferenciadas a partir de SKPs se pueden aplicar en la reparación de la médula espinal dañada, aunque siempre teniendo en cuenta que su potencial de expansión es limitado (McKenzie y col., 2006).

1.3.3.3. Diferenciación de células madre/progenitoras neurales en neuronas dopaminérgicas para el tratamiento de las Enfermedad de Parkinson

Uno de los principales objetivos de muchos grupos de investigación de todo el mundo es la generación de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre, células progenitoras/precursoras u otros tipos celulares, con el fin de obtenerlas en suficiente cantidad como para poder trasplantarlas en modelos animales de Enfermedad de Parkinson y, finalmente, en pacientes que sufran esta enfermedad neurodegenerativa (Lindvall y col., 2004).

Los tres tipos de células diferenciadas del Sistema Nervioso, es decir, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, se pueden diferenciar, además de por sus morfologías específicas, por la expresión de ciertas proteínas como NeuN, β -III-tubulina, NFL ó MAP2 en el caso de las neuronas; GFAP en el caso de los astrocitos; u *O1/4* en el caso de los oligodendrocitos. Además, las neuronas diferenciadas maduras se pueden distinguir y clasificar en función del neurotransmisor que secretan. Así, las neuronas dopaminérgicas secretan el neurotransmisor dopamina, por lo que presentan en su citoplasma un enzima específico para su síntesis (que no comparten con otros tipos de neuronas) conocido como tirosina hidroxilasa (del inglés, *tyrosine hydroxylase, TH*), y expresan en su membrana proteínas específicas para su transporte (del inglés, *DopAmine Transporter proteins, DATs*). Por ello, tanto la tirosina hidroxilasa como los transportadores de dopamina se pueden utilizar como proteínas marcadoras específicas de neuronas dopaminérgicas funcionales.

Una de las estrategias más utilizadas a la hora de diferenciar células madre/precursoras hacia fenotipos neurales *in vitro* es la utilización de moléculas solubles que imitan el patrón de estímulos que la célula recibe durante su desarrollo natural por acción de su entorno inmediato. Por ello, a continuación se presentan algunas de las moléculas inductoras, primero, de la diferenciación neuronal y, segundo, de la diferenciación neuronal dopaminérgica.

1.3.3.3.1. Moléculas inductoras de la diferenciación neuronal

Los factores neurotróficos o neurotrofinas son proteínas solubles que regulan la supervivencia, la proliferación, la plasticidad, la diferenciación y la muerte de las células neuronales (y musculares), por lo que son esenciales para la formación de los circuitos neuronales maduros. Los factores neurotróficos median sus acciones mediante interacción con receptores del tipo Trk (TrkA, TrkB y TrkC) y del tipo p75^{NTR}, desencadenando tres clases de respuestas diferentes: (i) supervivencia/muerte neuronal; (ii) estabilización/eliminación de sinapsis neuronales; y (iii) crecimiento/retracción de prolongaciones neuríticas.

Entre los distintos factores neurotróficos descritos en la literatura (NGF, BDNF, NT-3, NT4/5, CNTF, GDNF) (Bergado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000), a continuación se centrará la atención en el factor de crecimiento nervioso (del inglés, *Nerve Growth Factor, NGF*) y en el factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, *Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF*), por ser los dos factores neurotróficos que se utilizarán en los protocolos de diferenciación neuronal utilizados en este trabajo, como se mostrará más adelante.

El NGF fue descubierto hace 60 años (Levi-Montalcini y Hamburger, 1951) y, desde entonces, se ha caracterizado extensamente su papel en el desarrollo neural. Además, recientemente, se han descubierto acciones inesperadas del NGF en células no neurales (musculares). Los mecanismos moleculares de acción del NGF se basan en gran medida en estudios realizados con células de feocromocitoma de rata (PC12), que se diferencian en células similares a neuronas simpáticas al ser tratadas con NGF (Greene y Tischler, 1976). En el SNC, además de su implicación en la supervivencia neuronal, el NGF media otras funciones superiores como el aprendizaje, la memoria y el comportamiento. De hecho, alteraciones en los niveles de NGF están implicados en varias enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington) y trastornos psiquiátricos (como la depresión) (Chao y col., 2003). Cuando el NGF se une a receptores de tipo TrkA genera señales de supervivencia en la célula, mientras que cuando se une a receptores de tipo p75^{NTR}, genera señales de muerte celular (Wiesmann y de Vos, 2001). Así, el NGF es imprescindible en el desarrollo de neuronas simpáticas y sensoriales. Además, puede ejercer una acción protectora en ellas ya que previene la muerte neuronal causada por la 6-hidroxidopamina. El NGF purificado se ha utilizado en numerosos trabajos para mantener y diferenciar células PC12 (Carter y col., 2003; Marler y col., 2008), neuronas primarias (Obreja y col., 2005; Arantes y Andrews, 2006) y células adrenales (Shepherd y Holzwarth, 2001), resultando un factor neurotrófico esencial en los diversos protocolos de diferenciación neuronal descritos en la literatura.

El BDNF es la segunda neurotrofina mejor caracterizada después del NGF. Fue descubierto accidentalmente a partir de un medio de cultivo condicionado por una línea de células gliales (Barde y col., 1978) y, desde entonces, se sabe que contribuye al desarrollo y a la plasticidad neuronal. En diversos estudios *in vitro*, se ha observado que el BDNF aumenta la supervivencia y la diferenciación de ciertos tipos neuronales, incluyendo neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural y de la placa neural, neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, neuronas colinérgicas de la parte anterior del cerebro, neuronas hipocámpales y células ganglionares de la retina (Jones y col., 1994). Además, actúa sobre poblaciones neuronales que no responden al NGF a pesar de compartir con él un 55% de homología en cuanto a su composición aminoacídica. El hecho de que el BDNF no tenga como únicas dianas a las neuronas, hace pensar en acciones paracrinas o autocrinas de este factor tanto en células neuronales como no neuronales.

Además de las acciones mediadas por los factores neurotróficos, es importante señalar la acción de diversos factores involucrados en la guía axonal, ya que la extensión axonal y dendrítica de las neuronas resulta fundamental en el desarrollo de sinapsis funcionales adecuadas entre ellas (Zhang y col., 2005). Entre estos factores guía se pueden distinguir ciertas

moléculas no difusibles, que actúan a corta distancia, y ciertas moléculas difusibles, que actúan a larga distancia.

Entre las moléculas no difusibles se encuentran las moléculas de la matriz extracelular (colágeno, laminina y fibronectina) y sus receptores (integrinas); las moléculas de adhesión independientes de calcio (CAMs), y las moléculas de adhesión dependientes de calcio (cadherinas).

Entre las moléculas difusibles se encuentran ciertas proteínas, secretables o de membrana, que actúan como factores quimioatrayentes (aproximación hacia el factor guía) o quimiorepulsivos (alejamiento del factor guía) de la migración y de la extensión neuronal, y que pueden aportar a la neurona información posicional y direccional (Song y Poo, 2001; De Castro, 2001). Entre estas moléculas se encuentran las netrinas, las semaforinas, las slit, las efrinas y la reelina. La persistente expresión de muchas de estas moléculas y de sus receptores en la edad adulta sugiere que estas moléculas no sólo participan en el desarrollo embrionario del Sistema Nervioso, sino que juegan un papel muy importante en la función nerviosa en el individuo adulto, sobre todo, tras producirse una lesión (Koeberle y Bähr, 2004). A continuación, se presentan detenidamente las netrinas por ser los factores guía que se utilizarán en este trabajo, como se mostrará más adelante.

La familia de las netrinas está formada por un conjunto de proteínas quimioatrayentes, localizadas en la línea media del Sistema Nervioso en desarrollo y relacionadas con la guía de neuronas y de axones en el mismo (Livesey, 1999). Así, la netrina 1 -miembro que da nombre a la familia-, fue identificada en el cerebro de pollo como la molécula responsable de la actividad quimiotáctica y promotora del crecimiento axonal que posee la médula espinal (Serafini y col., 1994). Esta proteína de 78 kDa presenta en su extremo N-terminal una secuencia señal, seguida de una región de elevada similitud con las tres cadenas de la laminina; esta región homóloga a la laminina la forman el dominio IV, o dominio globular, y el dominio V, una región lineal compuesta de tres repeticiones tipo EGF ricas en cisteína, también llamadas V 1-3, y que forman parte de numerosas moléculas de la matriz extracelular. El extremo C-terminal contiene el dominio C, una región rica en residuos básicos (lo que explica la elevada afinidad de la netrina 1 por la heparina) y que, además, presenta un motivo RGD (que se recuerda que es una secuencia señal para receptores de tipo integrina), lo que explica la elevada afinidad de esta molécula por las membranas celulares (Yurchenco y Wadsworth, 2004). De forma posterior al descubrimiento de la netrina 1, se han identificado otras proteínas, de pesos moleculares comprendidos entre 70 y 80 kDa y una estructura bastante conservada respecto a la anterior, que han sido incorporadas a la familia de las netrinas. En cuanto a los receptores a través de los

cuales las netrinas ejercen su acción, hay que mencionar las proteínas Dcc, Unc-5, A2b e integrinas (Round y Stein, 2007).

Actualmente, se pueden distinguir tres subfamilias de netrinas en base a su estructura (**Figura 1.10**) (Yurchenco y Wadsworth, 2004; Barallobre y col., 2005):

- La subfamilia de las netrinas “clásicas” (Netrina 1 y UNC-6): estas netrinas presentan dos residuos de cisteína adicionales entre el dominio VI y el dominio C. Existen miembros de esta subfamilia tanto en invertebrados como en vertebrados, y, tradicionalmente, se les ha atribuido funciones en la guía de axones y células del Sistema Nervioso, aunque algunos estudios sugieren su participación en el desarrollo de la glándula mamaria, el pulmón, el intestino o el páncreas.
- La subfamilia de netrina-4 / β -netrina: en estas netrinas el dominio VI es parecido a la subunidad β de la laminina (a diferencia de otros miembros de la familia de las netrinas cuyos dos tercios N-terminales muestran similitud con las subunidades α y γ de la laminina) y no presenta residuos de cisteína adicionales. Otra característica estructural de esta subfamilia es el dominio C en el extremo C-terminal propio de UNC-6, y el residuo triptófano conservado en las distintas subunidades de la laminina. Estas netrinas se expresan tanto en el tejido nervioso, donde promueven el crecimiento axonal en determinados tipos neuronales, como en el hígado, el corazón, el ovario y el músculo, donde se localiza a nivel de membrana basal.
- La subfamilia de las netrinas G (netrinas G1 y G2): estas netrinas se encuentran ancladas en la membrana plasmática mediante una molécula GPI; no presentan ni el dominio C en el extremo C-terminal, ni las dos cisteínas adicionales en el dominio VI, ni el residuo triptófano conservado en las distintas subunidades de la laminina. Ambas proteínas pueden dar lugar a distintas isoformas con cambios en sus dominios V y C-terminales. Estas netrinas se expresan básicamente en el Sistema Nervioso Central.

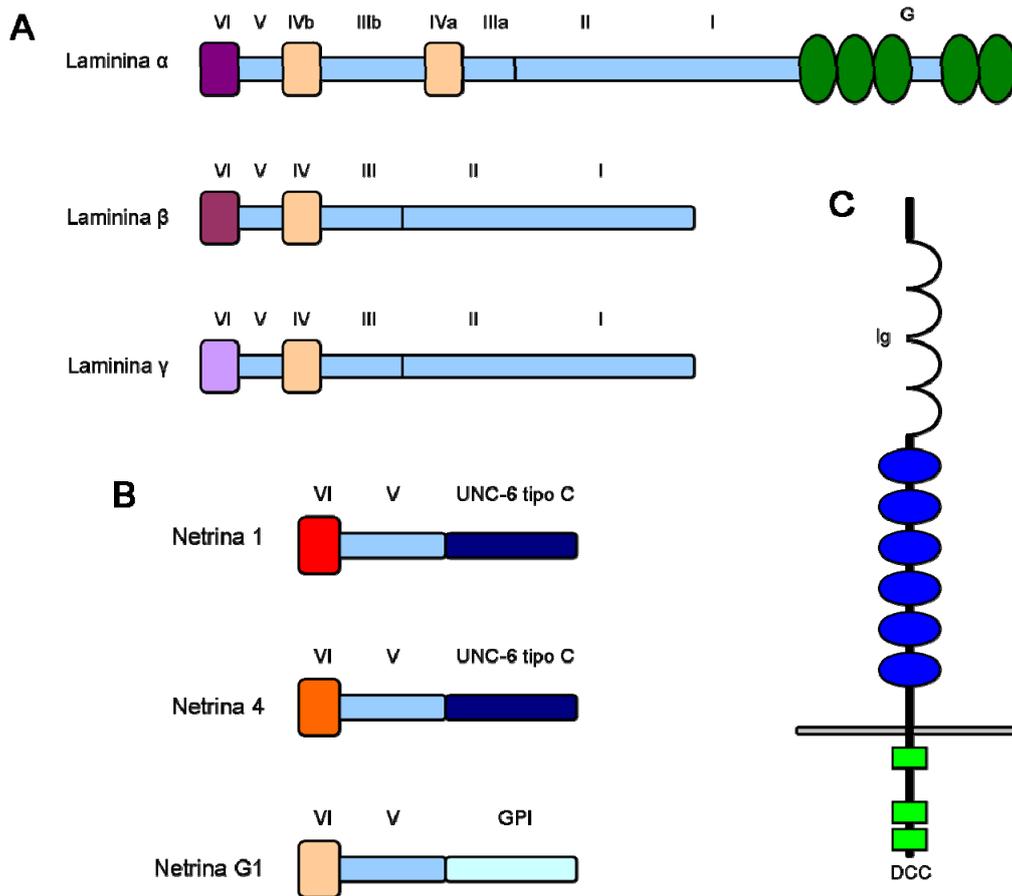


Figura 1.10. Subfamilias de netrinas en base a su estructura. Las tres clases de netrinas (B) y las tres cadenas de la laminina (A) son similares en su extremo N-terminal. La netrina G1 presenta una molécula GPI en la región C-terminal. (C) Uno de los tipos de receptores de las netrinas es el receptor DCC. (Adaptado de Yurchenco y Wadsworth, 2004; y de Van den Heuvel y Pasterkamp, 2008).

1.3.3.3.2. Moléculas inductoras de la diferenciación dopaminérgica

En el caso de la diferenciación neuronal hacia fenotipo dopaminérgico, se han estudiado varias estrategias de diferenciación combinando distintas moléculas como, por ejemplo, FGF2, FGF8, Shh, LIF, ácido ascórbico, forskolina, AMPc, GDNF y/o BDNF (Iacovitti y col., 2007; Deierborg y col., 2008), porque todas ellas son necesarias para la completa maduración y supervivencia de la población de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, pero ninguno de ellos por sí sólo es suficiente para inducir fenotipos dopaminérgicos maduros *in vitro* (Arenas, 2005; Martinat y col., 2006; Gale y Li, 2008).

Entre las distintas moléculas estudiadas, las dos moléculas que se utilizarán en los protocolos de diferenciación dopaminérgica de este trabajo son el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (del inglés, *Fibroblast Growth Factor-8*, FGF8) y *Sonic hedgehog* (Shh).

El FGF8 es un factor difusible ventralizante que interviene en la organización temprana de distintas estructuras del telencéfalo, controlando la transcripción de determinados factores de transcripción, incluyendo a los implicados en la diferenciación dopaminérgica (Ye y col., 1998; Vitalis y col., 2005).

Shh es otro factor ventralizante del tubo neural que promueve la inducción dopaminérgica en el mesencéfalo durante el desarrollo embrionario y que se requiere para la proliferación y el mantenimiento de los precursores neurales en el animal postnatal (Ruiz i Altaba y col., 2002; Machold et al., 2003; Fuccillo y col., 2006).

Finalmente, es importante señalar que se ha intentado manipular las células a diferenciar genéticamente, especialmente mediante la sobreexpresión de Nurr-1, un gen esencial en la formación de las neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo del mesencéfalo ventral (Lin y Rosenthal, 2003; Kim y col., 2006).

1.4. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas, de los daños cerebrales y de los daños en la médula espinal está aumentando. A pesar de los grandes esfuerzos que se están realizando para encontrar tratamientos para estas enfermedades, se han producido progresos muy pequeños, en su mayoría farmacológicos y, en cualquier caso, paliativos no curativos.

1.4.1. Breve descripción de la Enfermedad de Parkinson

Concretamente, la Enfermedad de Parkinson (del inglés, *Parkinson's Disease*, PD) -descrita por James Parkinson en 1817- es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al 1-2% de la población con edades superiores a los 60 años (Lotharius y Brundin, 2002; Toulouse y Sullivan, 2008). Se caracteriza por una pérdida progresiva y selectiva de neuronas dopaminérgicas, que tienen sus cuerpos en la sustancia negra *pars compacta* y que proyectan sus axones hasta el núcleo estriado (**Figura 1.11**), con el consecuente déficit del neurotransmisor dopamina que se produce en el núcleo estriado y el efecto que esto conlleva sobre otras vías de transmisión, como la colinérgica o la glutamatérgica. Todo ello se traduce en una descoordinación de las funciones motoras controladas por esta región cerebral, es decir, se produce temblor en reposo, rigidez y bradiquinesia (Liu, 2007; Olanow y col., 2009). Actualmente, se desconocen las causas que generan esta enfermedad pero se postula que el

estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, las toxinas exógenas, la acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, las infecciones virales, la excitotoxicidad y las deficiencias del sistema inmune pueden ser factores que favorecen su aparición (Arias-Carrión, 2008).

Las características patológicas que definen esta enfermedad son la presencia de eosinófilos, de inclusiones fibrilares y de plegamiento alterado de proteínas en la sustancia negra *pars compacta*, y, en su conjunto, reciben el nombre de cuerpos de Lewy (Beal, 2001; Samii y col., 2004) (**Figura 1.11**). La composición exacta de los cuerpos de Lewy no se conoce con exactitud, pero se sabe que contienen α -sinucleína, parkina, synfilina, neurofilamentos y otras proteínas de la vesícula sináptica, todas ellas ubiquitinadas. A pesar de que la mayor parte de los casos de Enfermedad de Parkinson son de tipo esporádico -debido en gran parte al estrés oxidativo que sufren neuronas de esta región cerebral-, menos de un 5% de los mismos se producen de forma hereditaria, habiéndose identificado, hasta el 2008, 13 *loci* relacionados con esta enfermedad (Toulouse y Sullivan, 2008).

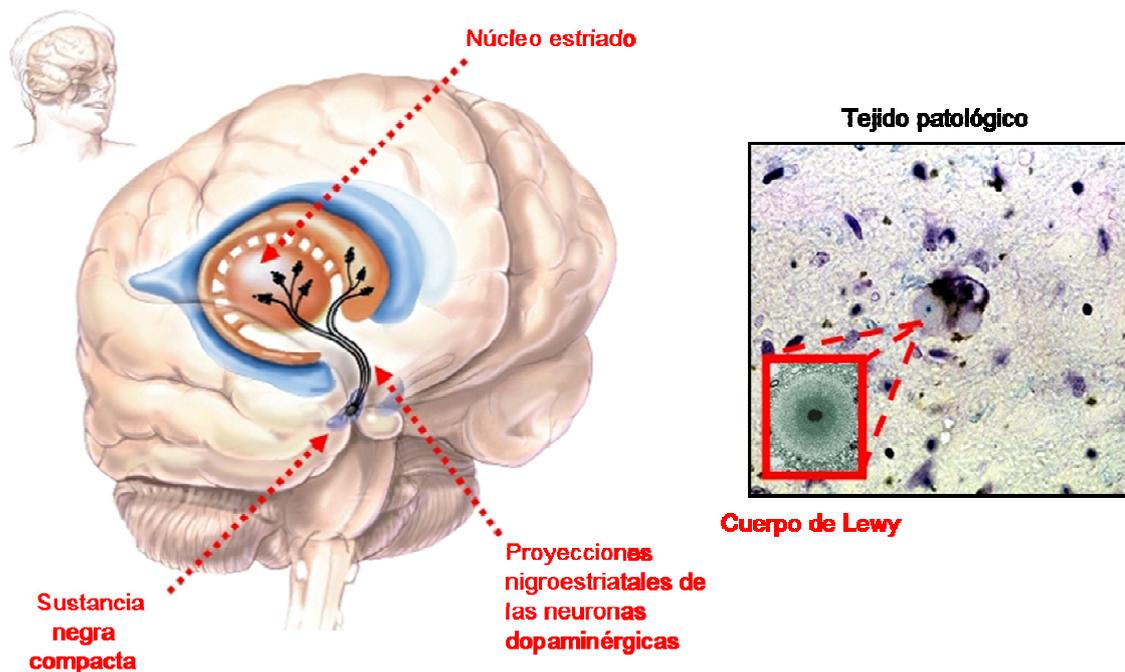


Figura 1.11. Características patológicas de la Enfermedad de Parkinson. La Enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y por la formación de cuerpos de Lewy en el tejido cerebral dañado. (Adaptado de National Institutes of Health, 2001; Beal, 2001).

Actualmente, la L-dihidroxifenilalanina, comúnmente conocida como L-DOPA, es el único tratamiento inicialmente eficaz en la atenuación de los síntomas de esta enfermedad; sin embargo, a medida que la enfermedad avanza, su eficacia se ve disminuida, produciéndose complicaciones motoras, especialmente discinesias (Obeso y col., 2000). Por ello, además de la combinación de la L-DOPA con otros tratamientos farmacológicos (por ejemplo, inhibidores de la COMT o de la MAO-B), se ha recurrido a otros tratamientos adicionales como la estimulación cerebral profunda (del inglés, *Deep Brain Stimulation, DBS*) o la terapia neuroprotectora (del inglés, *neuroprotective therapy*) (por ejemplo, con factores neurotróficos) (Toulouse y Sullivan, 2008). Sin embargo, estos tratamientos sólo consiguen paliar o retrasar los síntomas de la enfermedad, pero no consiguen frenar la degeneración neuronal que se está produciendo en el cerebro de los pacientes. Por lo tanto, es en este punto donde las células madre/progenitoras neurales jugarían un papel muy importante como fuente de obtención de neuronas dopaminérgicas funcionales, capaces de sustituir a las afectadas por el proceso degenerativo, y, con ello, sus funciones (Sánchez Pernaute, 2003).

1.4.2. Deficiencias de los tratamientos en la Enfermedad de Parkinson

Como ya se ha mencionado, en el caso del tratamiento farmacológico, la L-DOPA y/u otros fármacos no frenan la muerte de las neuronas por lo que la enfermedad sigue en progreso. Además, se trata de una enfermedad multisistémica, es decir, se ven afectados tanto el Sistema Nervioso como otros sistemas dependientes de él (por ejemplo, el Sistema Motor) (Obeso y col., 2000).

El uso de células madre/progenitoras ha presentado resultados prometedores en los últimos ensayos clínicos, ya que un pequeño grupo de pacientes mostraron una pequeña recuperación funcional con respecto a los controles. Sin embargo, estos pequeños porcentajes probablemente se debieran a la adaptabilidad de las células madre/progenitoras en el tejido trasplantado más que a una verdadera recuperación funcional de las vías dañadas. Además de la falta de consenso en este sentido, existe el problema de no contar con una fuente celular lo suficientemente accesible y abundante como para obtener un número suficiente de neuronas dopaminérgicas para Terapia Celular (Newman y Bakay, 2008). De acuerdo con Galvin y Jones: *“La diferenciación de las células madre/progenitoras neurales en células con fenotipos neuronales específicos sigue siendo problemática. Nunca se han generado suficientes cantidades de neuronas dopaminérgicas, gabaérgicas o colinérgicas a partir de estas células como para ser clínicamente significativas”* (Galvin y Jones, 2006). Además, estos autores destacan la necesidad de desarrollar una matriz extracelular neural que sirva tanto para su

diferenciación específica como para su vehiculización en el trasplante ya que, como bien mencionan, las células madre/progenitoras crecen y se diferencian en función de las señales que reciben de su entorno y, siempre, sobre un sustento físico apropiado.

1.4.3. Situación actual de la Terapia Celular aplicada a la Enfermedad de Parkinson

A continuación, se describen brevemente los distintos tipos celulares que se han utilizado hasta ahora para trasplantes en pacientes con Enfermedad de Parkinson, indicándose los motivos por los que no han sido efectivos.

En primer lugar, se han utilizado células precursoras derivadas de mesencéfalo ventral embrionario porque, además de ser una fuente importante de dopamina, son las células que proyectan al núcleo estriado y, consecuentemente, las que se deterioran en la Enfermedad de Parkinson. Una vez aisladas a partir del mesencéfalo ventral de embriones, estas células pueden (i) ser trasplantadas directamente (Piccini y col., 2005) o (ii) ser expandidas *in vitro* antes de ser trasplantadas (Studer y col., 1998) en el núcleo estriado de pacientes con Enfermedad de Parkinson. En el primer caso, el principal inconveniente que se presenta es el gran número de discinesias que se producen por la producción incontrolada de dopamina por las células trasplantadas, sin olvidar los inconvenientes de carácter ético subyacentes a la utilización de un tejido fetal, y la necesidad de obtener grandes cantidades de material embrionario para cada trasplante. En el segundo caso, la principal ventaja es la posibilidad de controlar la diferenciación de los precursores mesencefálicos embrionarios *in vitro*, pero presenta las mismas desventajas que el caso anterior.

En segundo lugar, se han utilizado células madre embrionarias con el objetivo de generar *in vitro* neuronas dopaminérgicas funcionales mediante distintas estrategias con moléculas inductoras de dicha diferenciación. A modo de ejemplos, Barberi y col. indujeron la diferenciación dopaminérgica de células embrionarias con FGF2, BDNF, FGF8, Shh y ácido ascórbico (Barberi y col., 2003). Takagi y col. indujeron la diferenciación dopaminérgica de células embrionarias sobre una monocapa de células estromáticas de ratón (línea celular PA6, Kawasaki y col., 2000) con EGF, FGF2 y LIF; además, tras la retirada de los mitógenos y el cultivo de las células sobre un sustrato adherente con FGF2 y FGF20, consiguieron incrementar el porcentaje de neuronas dopaminérgicas cinco veces (hasta un 24%) (Takagi y col., 2005). Sánchez-Pernaute y col. también utilizaron células estromáticas como soporte de expansión de células embrionarias, junto con FGF8, Shh, ácido ascórbico, BDNF y GDNF (Sánchez Pernaute

y col., 2005). Zeng y col. obtuvieron un 87% de neuronas dopaminérgicas a partir de células embrionarias humanas después de tres semanas de cultivo sobre células estromáticas de ratón (línea celular PA6). Estas células expresaban transportadores de dopamina, el enzima ácido aromático descarboxilasa y factores de transcripción asociados a la diferenciación neuronal dopaminérgica (Sox1, Nurr1, Ptx3 y Lmx1b) (Zeng y col., 2004). Con todos estos resultados, es posible observar que la inducción y la diferenciación en cultivo de las células embrionarias hacia fenotipos dopaminérgicos se encuentra bastante estudiada y se han obtenido buenos resultados. Sin embargo, el mayor inconveniente aparece cuando las células se trasplantan en animales parkinsonianos, en los que la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas se reduce significativamente, probablemente por la ausencia de un soporte físico adecuado.

En tercer lugar, se han utilizado células madre/progenitoras neurales adultas porque, como ya se ha visto, poseen la potencialidad de dar lugar a los distintos linajes neurales tanto *in vitro* como al ser trasplantadas en áreas neurogénicas del SNC. Sin embargo, un inconveniente de estas células es que, cuando son trasplantadas en áreas no neurogénicas del SNC (como es el caso de la sustancia negra y el núcleo estriado), se diferencian mayoritariamente a células gliales (Dziewczapolski y col., 2003). Por ello, Richardson y col. observaron que, cuando trasplantaron células progenitoras neurales derivadas de zona subventricular en el núcleo estriado de animales parkinsonianos, existía una recuperación funcional después de dos semanas tras el trasplante, pero que no existía diferenciación dopaminérgica de las células trasplantadas (Richardson y col., 2005).

En cuarto y último lugar, se han utilizado varios tipos de células no neurales con la característica común de ser importantes productoras de catecolaminas, especialmente dopamina. Entre ellas, merece la pena destacar a: (i) las células cromafines de la médula adrenal, capaces de ser diferenciadas en cultivo en células pseudo-neuronales mediante la adición de NGF o mediante la estimulación con campos magnéticos de baja frecuencia (Feria-Velasco y col., 1998; Mínguez-Castellanos y Escamilla-Sevilla, 2005); (ii) las células cromafines extra-adrenales del órgano de Zuckerkandl (Espejo y col., 2001; Fernández-Espejo y col., 2003); y (iii) las células del cuerpo carotídeo (Toledo-Aral y col., 2002; Mínguez-Castellanos y Escamilla-Sevilla, 2005; López-Barneo y col., 2009). En todos los casos, se realizaron trasplantes tanto en modelos animales como en pacientes con Enfermedad de Parkinson, aunque los resultados obtenidos con las células cromafines han sido muy cuestionados por los efectos adversos producidos tras el trasplante. En general, la mayor ventaja de estos tipos celulares es su capacidad de liberar factores neurotróficos (por ejemplo, NGF o GDNF) que favorecen la supervivencia de las propias células trasplantadas y de las neuronas supervivientes (Date y col., 1998; Espejo y col., 2001; Villadiego y col., 2005).

En resumen, a pesar de las distintas estrategias ensayadas, de las técnicas moleculares existentes actualmente y de los más de 20 años de experiencia en esta enfermedad, la Terapia Celular en la Enfermedad de Parkinson todavía presenta los mismos inconvenientes iniciales de supervivencia y recuperación funcional (Drucker-Colin y Verdugo-Díaz, 2004).

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

2. **OBJETIVOS**

En base a la información mostrada en la Introducción, se detecta la necesidad de combinar los biomateriales con distintos tipos celulares, incluidas las células madre/progenitoras neurales, en la reparación del Sistema Nervioso dañado, incluyendo ciertas enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson.

Por un lado, y a pesar de que ya se ha conseguido diferenciar neuronas dopaminérgicas *in vitro* a partir de células madre/progenitoras neurales -tanto embrionarias como adultas-, existe un gran problema de escalado de estas células a la práctica clínica por motivos biológicos, técnicos y éticos. Por tanto, resulta necesario obtener una fuente de células madre/progenitoras neurales lo suficientemente abundante como para generar un número adecuado de neuronas dopaminérgicas para trasplante y, a ser posible, que permita obtener estas células del propio paciente, es decir, que permita realizar un trasplante autólogo. En este sentido, dado el carácter adulto de la Enfermedad de Parkinson, quizá fuera más adecuado pensar en generar neuronas dopaminérgicas a partir de células madre/progenitoras adultas que a partir de células madre embrionarias. Por todo ello, es en este punto donde radica la importancia de generar neuronas dopaminérgicas a partir de una fuente celular no neural como la piel, donde se ha descrito la existencia de células precursoras con potencial neural.

Por otro lado, resulta necesario buscar estrategias que permitan tanto la inducción de fenotipos dopaminérgicos propios de la sustancia negra *in vitro* como la supervivencia e integración funcional de las neuronas dopaminérgicas obtenidas al ser trasplantadas en el huésped. Para ello, es importante que la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas *in vitro* se lleve a cabo sobre biomateriales poliméricos de nueva generación, que permitan guiar la diferenciación de una manera determinada, de manera que las conexiones sinápticas que se produzcan sean funcionales y sirvan para restaurar la vía nigroestriatal dañada. Además, resulta muy interesante que estos nuevos soportes incluyan moléculas de señalización y/o factores tróficos inductores de la supervivencia, tanto de las propias células diferenciadas en ellos, como de las células circundantes al punto en el que se produce la lesión y en el que se realizará la inserción del biomaterial.

Por todo ello, el planteamiento experimental del presente trabajo de Tesis Doctoral ha girado en torno a la posibilidad de desarrollar un nuevo biomaterial capaz de inducir la diferenciación neuronal guiada de una manera más eficiente que las condiciones clásicas de cultivo. Para ello, se ha apostado por combinar la técnica de fotolitografía, para el desarrollo de geometrías en la superficie del biomaterial, y la técnica de polimerización de componentes

proteicos y moléculas de señalización, para el desarrollo de una matriz extracelular neural. Además, para demostrar la eficiencia en la diferenciación neuronal de este nuevo sustrato biofuncionalizado se ha realizado el testado *in vitro* del mismo con distintos tipos celulares, con el objetivo general de demostrar su utilidad como modelo de regeneración neuronal *in vitro*.

De una forma más concisa, los objetivos que se han planteado son los siguientes:

- 1. Desarrollar y caracterizar un nuevo soporte de diferenciación neuronal combinando técnicas de fotolitografía y de matrices extracelulares.**
- 2. Validar la biocompatibilidad y la capacidad de diferenciación neuronal y dopaminérgica guiada del soporte desarrollado con una línea celular establecida ampliamente utilizada en investigación como modelo dopaminérgico *in vitro*.**
- 3. Comprobar la capacidad de diferenciación neuronal de células primarias derivadas de hipocampo de rata embrionaria sobre el soporte desarrollado.**
- 4. Comprobar la capacidad de diferenciación no sólo neuronal sino también dopaminérgica de células precursoras neurales de zona subventricular de rata neonata sobre el soporte desarrollado.**
- 5. Comprobar la capacidad de diferenciación de células de origen no neural, como son las células precursoras derivadas de piel de rata adulta, sobre el soporte desarrollado.**

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

Todos los reactivos que han sido empleados en este trabajo se enumeran en las siguientes tablas (**Tablas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5**) en función de la finalidad para la que han sido utilizados, indicándose referencias y casas comerciales.

Reactivos para la fabricación del sustrato fotolitografiado	Referencia	Casa comercial
Ácido fluorhídrico (<i>Hydrofluoric acid</i>)	131028	Panreac
Isopropanol (<i>Isopropyl alcohol</i>)	I9030	Sigma
Carbonato sódico (<i>Sodium carbonate anhydrous</i>)	SO0115	Panreac
Resina SU-8 2100 (<i>SU-8 2100 permanent epoxy negative photoresist</i>)	-	MicroChem
Revelador SU-8 (<i>SU-8 developer</i>)	-	MicroChem

Tabla 3.1. Reactivos utilizados en la fabricación del sustrato fotolitografiado.

Reactivos para la fabricación de la NECM	Referencia	Casa comercial
Ácido hialurónico de alto peso molecular (<i>Hyaluronan high molecular weight</i>)	GRL002	R&D
Ácido hialurónico de bajo peso molecular (<i>Hyaluronan low molecular weight</i>)	GRL001	R&D
Condroitín 4-sulfato (<i>Chondroitin 4-sulfate sodium salt from bovine trachea, CHS-A</i>)	27042	Sigma
Extracto de membrana basal (<i>Cultrex[®] basement membrane extract without phenol red</i>)	343200501	R&D
Netrina-4 recombinante humana (<i>recombinant human Netrin-4</i>)	1132-N4	R&D
Netrina-G1a recombinante de ratón (<i>recombinant mouse Netrin-G1a</i>)	1166-NG	R&D
Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline, PBS</i>) pH 7.4 (1X)	10010-015	Gibco

Tabla 3.2. Reactivos utilizados en la fabricación de la matriz extracelular neural.

Reactivos para la caracterización del soporte	Referencia	Casa comercial
Azul de Coomassie (<i>Coomassie brilliant blue R-250 staining solution</i>)	161-0436	Bio-Rad
<i>BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	500-0006	Bio-Rad
<i>RayBio® Human Shh-N ELISA Kit</i>	ELH-ShhN-001	RayBiotech Inc

Tabla 3.3. Reactivos utilizados en la caracterización del soporte.

Reactivos para los cultivos celulares	Referencia	Casa comercial
<i>Accumax™ solution</i>	A7089	Sigma
<i>B27 Supplement (50X)</i>	17504-044	Gibco
Colagenasa tipo IA (<i>Collagenase crude type IA</i>)	C2674	Sigma
D(+) <i>glucosa (D(+) glucose anhydrous)</i>	131341.1211	Panreac
<i>DeoxyriboNucleAse I from bovine pancreas (DNaseI)</i>	D5025	Sigma
<i>DiMethyl SulfOxide (DMSO)</i>	D2650	Sigma
Factor de crecimiento epidérmico recombinante de rata (<i>recombinant rat Epidermal Growth Factor, rrEGF</i>)	3214-EG	R&D
Factor de crecimiento fibroblástico básico recombinante de rata (<i>recombinant rat Fibroblast Growth Factor-2, rrFGF2</i>)	3339-FB	R&D
Factor de crecimiento fibroblástico 8b recombinante de ratón (<i>recombinant mouse Fibroblast Growth Factor-8 basic, rmFGF8b</i>)	423-F8	R&D
Factor de crecimiento nervioso β recombinante de rata (<i>recombinant rat Nerve Growth Factor β, rrNGFβ</i>)	N2513	Sigma
Factor neurotrófico derivado de cerebro recombinante humano (<i>recombinant human Brain-Derived Neurotrophic Factor, rhBDNF</i>)	B3795	Sigma
<i>Fungizone™ antimycotic</i>	15290-018	Gibco
<i>Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)</i>	14175053	Gibco
<i>Kaighn's Modification of Ham's F12 Medium (F12K Medium)</i>	21127022	Gibco
L-glutamina 200 mM (<i>L-glutamine 200 mM</i>)	G7513	Sigma
<i>Low Serum Growth Supplement (LSGS)</i>	S00310	Gibco

Tabla 3.4. Reactivos utilizados en los cultivos celulares.

Reactivos para los cultivos celulares	Referencia	Casa comercial
<i>N-2 Supplement (100X)</i>	17502-048	Gibco
<i>Neurobasal™ A Medium</i>	10888	Gibco
<i>NeuroCult® NS-A Basal Medium (rat)</i>	05770	StemCell Technologies
<i>NeuroCult® NS-A Proliferation Supplements (rat)</i>	05773	StemCell Technologies
<i>Papaina (Papain)</i>	P4762	Sigma
Solución inhibidora de la tripsina 1X (<i>Trypsin inhibitor solution 1X</i>)	T7659	Sigma
Solución de penicilina / estreptomina 100X (<i>Penicillin / Streptomycin solution 100X, P/S</i>)	P0781	Sigma
Sonic hedgehog recombinante humano péptido N-terminal C24II (<i>recombinant human Sonic hedgehog amino terminal peptide C24II, rhShh</i>)	1845-SH	R&D
Suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum, FBS</i>)	302020	ATCC
Suero de caballo (<i>Horse Serum, HS</i>)	302040	ATCC
Tripsina-EDTA 0,25% (<i>Trypsin-EDTA solution 0,25%</i>)	T4049	Sigma
<i>Trypan blue stain 0,4%</i>	17942E	Cambrex

Tabla 3.4 (continuación). Reactivos utilizados en los cultivos celulares.

Reactivos para la caracterización celular	Referencia	Casa comercial
Ácido acético glacial	131008.1611	Panreac
Ácido oxálico 2-hidrato	151041	Panreac
Ácido tetracloroaurico(III) 3-hidrato	134432	Panreac
Albúmina sérica bovina (<i>Albumine from Bovine Serum, BSA</i>)	A9418	Sigma
Cloruro amónico (<i>Ammonium chloride</i>)	1311211211	Panreac
Eosina-azul de metileno según May-Grünwald para microscopía	1.01424	Merck
Glicerol (<i>Glycerol</i>)	131339	Panreac
Hidroquinona 99%	161351	Panreac
<i>Hoescht 33258 (bisbenzimidazole H 33258)</i>	14530	Sigma
<i>Mowiol® (polyvinyl alcohol 4-88)</i>	81381	Fluka

Tabla 3.5. Reactivos utilizados en la caracterización de los cultivos celulares.

Reactivos para la caracterización celular	Referencia	Casa comercial
Paraformaldehído 4% (<i>Paraformaldehyde 4% aqueous solution</i>)	157-4	Electron Microscopy Sciences
<i>PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Labeling</i>	MINI-67	Sigma
Proteinato de plata (<i>Silver proteinate</i>)	05495	Sigma
Sodio tiosulfato 5-hidrato	131721	Panreac
Solución de polilisina (<i>Poly-L-lysine solution</i>)	P4707	Sigma
Suero de burro (<i>Normal donkey serum</i>)	D9663	Sigma
Sulfato sódico (<i>Sodium sulfate anhydrous</i>)	SO0664	Scharlau
<i>Triton[®] X-100</i>	T8787	Sigma
<i>Vectashield[®] Mounting Medium</i>	H-1000	Vector Laboratories
<i>Vitrosec[®] 70</i>	256065	Panreac

Tabla 3.5 (continuación). Reactivos utilizados en la caracterización de los cultivos celulares.

En todo momento, el agua que se empleó para reconstituir o diluir los diferentes reactivos fue agua debidamente purificada mediante el sistema de filtración MilliQ de Millipore. Además, para la preparación de reactivos con aplicación en cultivo celular, este agua fue esterilizada mediante calor y presión en un autoclave JP Selecta[®] V006200F Autester ST-30 antes de su uso, siguiendo un ciclo de esterilización de 20 minutos a 134°C con 20 minutos de secado.

3.2. MATERIALES

Todos los materiales que han sido empleados en este trabajo se enumeran en la siguiente tabla (**Tabla 3.6**), indicándose referencias y casas comerciales.

Tanto el material de vidrio (botellas, vasos de precipitados, probetas...) como el material metálico (bisturís, tijeras, pinzas, espátulas...) fueron debidamente esterilizados mediante calor y presión en un autoclave JP Selecta[®] V006200F Autester ST-30 antes de su uso, siguiendo un ciclo de esterilización de 20 minutos a 134°C con 20 minutos de secado.

Material	Referencia	Casa comercial
Cámara de Neubauer (0,0025; 0,0625; prof: 0,1 mm)	35756L	BRAND
<i>Cell Scrapers</i>	3011	Costar
<i>Cell Strainer 40 µm</i>	352340	BD
<i>Corning® CellBIND Cell Culture Flasks 75 cm², canted neck, cap vented</i>	CSL3290	Sigma
Cubreobjetos cuadrados de vidrio de 24 x 24 mm	MZ3010	Menzel-Gläser
Cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm de diámetro y 0,13-0,16 mm de grosor	CB00120RA1	Menzel-Gläser
<i>Falcon® 6-well cell culture plate, nontreated polystyrene, flat-bottom with lid</i>	351146	BD
<i>Falcon® tubes 50 ml</i>	352074	BD
<i>Flasks 75 cm² 0,2 µm vented blue plugseal cap, tissue culture treated</i>	353136	BD
<i>Minisart® 0,2 µm</i>	16534K	Sartorius Stedim Biotech
<i>Nunclon™ D multidishes 4 well round</i>	D6789	Sigma
<i>Sterile scalpel blade de #10</i>	72044-10	Electron Microscopy Sciences

Tabla 3.6. Materiales.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación, se detalla la composición de los medios de cultivo que han sido utilizados en este trabajo, tanto para el mantenimiento y la diferenciación de la línea celular establecida PC12 como para el aislamiento, la proliferación y la diferenciación de los cultivos de células primarias derivadas de hipocampo, zona subventricular y piel de rata, respectivamente.

3.3.1. Medio de mantenimiento de la línea celular PC12

El medio de mantenimiento de la línea celular establecida PC12 está compuesto por F12K Medium suplementado con 2,5% de FBS, 15% de HS y 1% de P/S.

3.3.2. Medio de diferenciación de la línea celular PC12

El medio de diferenciación de la línea celular establecida PC12 presenta la misma composición basal que el medio de mantenimiento pero, en algunos casos (dependiendo del experimento) se encuentra suplementado con 50 ng/ml de rrNGFβ.

3.3.3. Medio de aislamiento y proliferación de células de hipocampo de rata embrionaria

El medio de aislamiento y proliferación de las células de hipocampo de rata embrionaria está compuesto por Neurobasal™ A Medium suplementado con 1% de P/S, 1% de L-glutamina 200 mM y 2% de B27 Supplement (50X).

3.3.4. Medio de aislamiento y proliferación de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata

El medio de aislamiento y proliferación de las células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata está compuesto por NeuroCult® NS-A Basal Medium (rat) suplementado con NeuroCult® NS-A Proliferation Supplements (rat), 1% de P/S, 1% de L-glutamina 200 mM, 20 ng/ml de rrEGF y 40 ng/ml de rrFGF2.

3.3.5. Medio de aislamiento y proliferación de células precursoras derivadas de piel de rata adulta

El medio de aislamiento y proliferación de las células precursoras derivadas de piel de rata adulta está compuesto por Neurobasal™ A Medium suplementado con 1% de P/S, 1% de L-glutamina 200 mM, 2% de B27 Supplement (50X) y 2% de LSGS.

3.3.6. Medio de diferenciación neuronal

El medio de diferenciación neuronal, tanto para las células de hipocampo como para las células de zona subventricular y de piel, está compuesto por Neurobasal™ A Medium suplementado con 1% de P/S, 1% de L-glutamina 200 mM, 2% de B27 Supplement (50X), 1% de N-2 Supplement (100X), 10% de FBS, 50 ng/ml de rrNGFβ y 50 ng/ml de rhBDNF.

3.3.7. Medio de diferenciación dopaminérgica

El medio de diferenciación dopaminérgica, tanto para las células de hipocampo como para las células de zona subventricular y de piel, está compuesto por Neurobasal™ A Medium suplementado con 1% de P/S, 1% de L-glutamina 200 mM, 2% de B27 Supplement (50X), 1% de N-2 Supplement (100X), 10% de FBS, 50 ng/ml de rrNGFβ, 50 ng/ml de rhBDNF, 200 ng/ml de rhShh y 200 ng/ml de rmFGF8b.

3.4. ANTICUERPOS

Todos los anticuerpos que han sido empleados para la inmunodetección de marcadores específicos en las células, junto con sus dianas, la casa comercial a la que pertenecen y la dilución a la que se utilizan, se presentan en las siguientes tablas (**Tablas 3.7 y 3.8**).

Antígeno	Isotipo	Origen	Especificidad*	Clon	Casa comercial	Referencia	Dilución
β-III-tubulin	-	Mouse	H, R, M	Monoclonal	R&D	964673	1:10
GFAP	-	Rabbit	H, R	Polyclonal	Millipore	AB5804	1:250
MAP2	IgG ₁	Mouse	H, R	Monoclonal (AP20)	Millipore	MAB3418	1:200
Nestin	-	Goat	R	Polyclonal	R&D	965224	1:10
Nestin	IgG ₁	Mouse	R, M	Monoclonal (Rat401)	Millipore	MAB353	1:200
NeuN	IgG ₁	Mouse	H, R, M	Monoclonal (A60)	Millipore	MAB377	1:200
NFL	IgG ₁	Mouse	H, R, M	Monoclonal (DA2)	Cell Signaling Technology®	2835	1:100
α-SMA	IgG2a	Mouse	H, R, M	Monoclonal (1A4)	Sigma	A2547	1:500
Sox2	-	Rabbit	H, R, M	Polyclonal	Millipore	AB5603	1:1000
TH	-	Rabbit	H, R, M	Polyclonal	Millipore	AB152	1:1000

Tabla 3.7. Anticuerpos primarios.

*Sólo se presta atención a las siguientes especificidades: H: human; R: rat; M: mouse.

Antígeno	Especificidad	Fluoróforo conjugado	Abs _{máx} (nm)	Em _{máx} (nm)	Casa comercial	Referencia	Dilución
Donkey	Goat IgG(H+L)	Cy TM 5 (rojo)	647	665	JIR Laboratories Inc	705-176-147	1:500
Donkey	Rabbit IgG(H+L)	Alexa Fluor® 546 (rojo)	556	573	Invitrogen	A10040	1:1000
Goat	Mouse IgG ₁	Alexa Fluor® 488 (verde)	495	519	Invitrogen	A21121	1:1000
Donkey	Mouse IgG(H+L)	Cy TM 5 (rojo)	647	665	JIR Laboratories Inc	715-176-151	1:400

Tabla 3.8. Anticuerpos secundarios.

3.5. MÉTODOS

3.5.1. Fabricación de los sustratos fotolitografiados

Para el proceso de microfabricación de los sustratos fotolitografiados se utilizaron cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm (cuadrados).

3.5.1.1. Ataque ácido de los cubreobjetos de vidrio

En primer lugar, los cubreobjetos de vidrio se lavaron con etanol al 70% para eliminar los restos de polvo de los mismos. A continuación, se sumergieron durante 5 minutos en una disolución 1:2 (v/v) de ácido fluorhídrico en agua (utilizando en todo momento material de plástico). Transcurrido este tiempo, se transfirieron a una disolución 1:100 (p/v) de carbonato sódico para neutralizar el exceso de ácido fluorhídrico, deteniendo de esta forma el ataque ácido. Finalmente, se eliminó el exceso de carbonato sódico lavando los cubreobjetos con agua destilada durante 2-5 minutos.

3.5.1.2. Fotolitografía

Antes de realizar el proceso de fotolitografiado propiamente dicho, se diseñó -mediante el programa de dibujo Autocad 2.000- una máscara con una microgeometría (del inglés, *pattern*) consiste en una serie de cuadrados y rectángulos de 300 x 300 μm y 300 x 400 μm , respectivamente, entre los que se sitúan unos canales interconectados de 200 x 200 μm , tal y como se puede observar en la **Figura 3.1**. Seguidamente, el diseño se transfirió a un papel transparente y éste se colocó con un adhesivo sobre un portaobjetos de vidrio.

Concluidos el diseño y la impresión de la máscara, el proceso de fotolitografiado de los cubreobjetos de vidrio previamente atacados con ácido fluorhídrico se llevó a cabo siguiendo el protocolo representado en la **Figura 3.2** y que se detalla a continuación. Para asegurar la correcta deposición de la resina, los cubreobjetos debían estar bien secos y bien limpios por lo que, de forma previa, se secaron por calor mediante exposición a luz infrarroja y se limpiaron con una pistola de nitrógeno gaseoso.

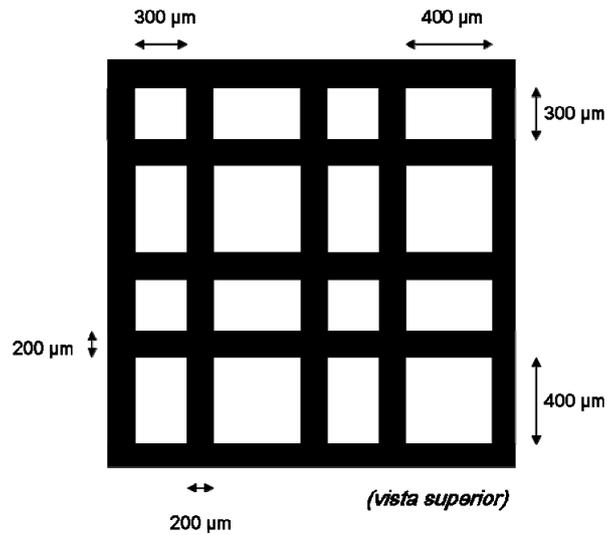


Figura 3.1. Microgeometría seleccionada para el diseño de la máscara utilizada en el proceso de fotolitografiado.

En primer lugar, la resina comercial SU-8 2100 fue depositada en los cubreobjetos mediante *spinner* a 4.000 rpm con una rampa de 1.000 rpm por segundo durante 60 segundos en el equipo EVG 620. Esta resina es una foto-resina negativa, es decir, las zonas de la misma que no sean expuestas a la luz UV serán las que se eliminen *a posteriori*. La cantidad de resina SU-8 2100 depositada manualmente en cada sustrato fue de 1 ml, aproximadamente. A continuación, se realizó un *prebake* de la resina, es decir, los sustratos con la resina se colocaron en una estufa durante 5 minutos a 65°C y, posteriormente, durante 35 minutos a 95°C. Seguidamente, los sustratos con la resina fueron cubiertos con la máscara diseñada previamente y expuestos a luz UV ($\lambda=365$ nm) durante 20 segundos. Transcurrido este tiempo, se realizó un *postbake* de la resina, es decir, los sustratos con la resina se colocaron en una estufa durante 1 minuto a 65°C y, posteriormente, durante 15 minutos a 95°C. Finalmente, se llevó a cabo el proceso de revelado. Para ello, los cubreobjetos con la resina se introdujeron en un pequeño volumen de revelador SU-8 comercial, donde se mantuvieron durante 10 minutos aproximadamente con agitación constante. A medida que los sustratos fotolitografiados se sacaron de este disolvente -comprobando que las zonas donde no había incidido la luz UV se encontraban sin resina-, se introdujeron en isopropanol durante unos minutos para su correcto aclarado. La eliminación de todo resto de disolvente se realizó mediante incubación de los sustratos fotolitografiados durante 30 minutos en una estufa a 150°C.

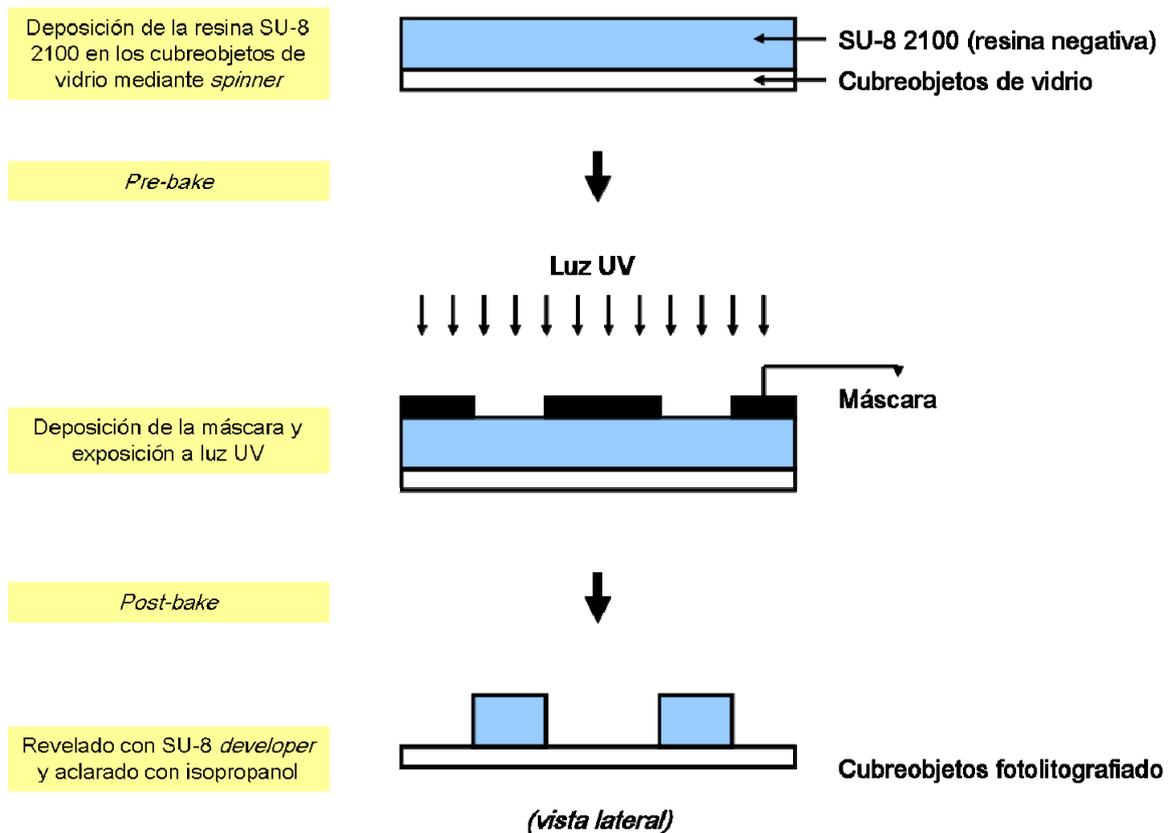


Figura 3.2. Representación esquemática del proceso de microfabricación del sustrato fotolitografiado.

Es importante señalar que, antes de la utilización de los sustratos fotolitografiados como soportes de deposición de la matriz extracelular neural, éstos fueron debidamente incubados durante 12 horas en agua destilada a temperatura ambiente, para la correcta lixiviación de los restos de reactivos que hubieran podido quedar en ellos tras el proceso de fotolitografiado.

3.5.2. Fabricación de la matriz extracelular neural

3.5.2.1. Formulación

En la siguiente tabla (**Tabla 3.9**) se especifican los componentes basales con los que se elaboró la matriz extracelular neural, indicándose las cantidades necesarias y las concentraciones tanto iniciales como finales de cada componente en 1 ml de la mezcla.

Componente	Volumen por ml de la mezcla	Concentración inicial	Concentración final
PBS pH 7.4 (1X)	200 µl		
Netrina-4	25 µl	100 µg /ml	25 µg /ml
Netrina-G1a	25 µl	100 µg /ml	25 µg /ml
Ácido hialurónico*	150 µl	50 mg/ml	7,5 mg/ml
Extracto de membrana basal	600 µl	13,87 mg/ml	8,32 mg/ml

Tabla 3.9. Formulación de la matriz extracelular neural.

*Ácido hialurónico de alto o de bajo peso molecular en función del caso.

Sólo en el caso de las matrices que serían utilizadas en cultivos con células de hipocampo de rata embrionaria, se introdujo en la composición basal de la matriz otro proteoglicano de alto peso molecular: el condroitín 4-sulfato. El volumen utilizado de este componente por cada ml de solución fue de 150 µl. La concentración final del mismo varió entre 15 mg/ml (a partir de una concentración inicial de 100 mg/ml) y 1,5 mg/ml (a partir de una concentración inicial de 10 mg/ml), dependiendo del caso.

3.5.2.2.Desarrollo

La matriz extracelular neural se preparó mezclando los componentes indicados en la formulación, en las cantidades mencionadas, en un tubo Falcon® de 50 ml mantenido en hielo para evitar la polimerización de la misma antes de su deposición. En el caso de preparar matrices extracelulares diluidas, se añadió PBS a la mezcla anterior en la proporción deseada (para una dilución 1:3 se añadieron 2 ml de PBS por cada ml de mezcla, y para una dilución 1:10 se añadieron 9 ml de PBS por cada ml de mezcla). En cualquier caso, la mezcla resultante fue agitada suavemente hasta su homogeneidad y, a continuación, fue depositada manualmente sobre cubreobjetos fotolitografiados o sin fotolitografiar (en ambos casos estériles), en función del experimento a realizar (**Figura 3.3**). Una vez depositada, los sustratos fueron incubados en una estufa de cultivos celulares a 37°C durante 24 horas para la correcta polimerización de la matriz extracelular. Transcurrido este tiempo, el exceso de PBS se retiró manualmente y los sustratos se dejaron secar en la campana de flujo laminar durante 1 hora con flujo de aire y luz ultravioleta. En caso de no ser utilizadas inmediatamente, los sustratos con las matrices se almacenaron en condiciones de esterilidad a una temperatura de 4°C hasta su uso.

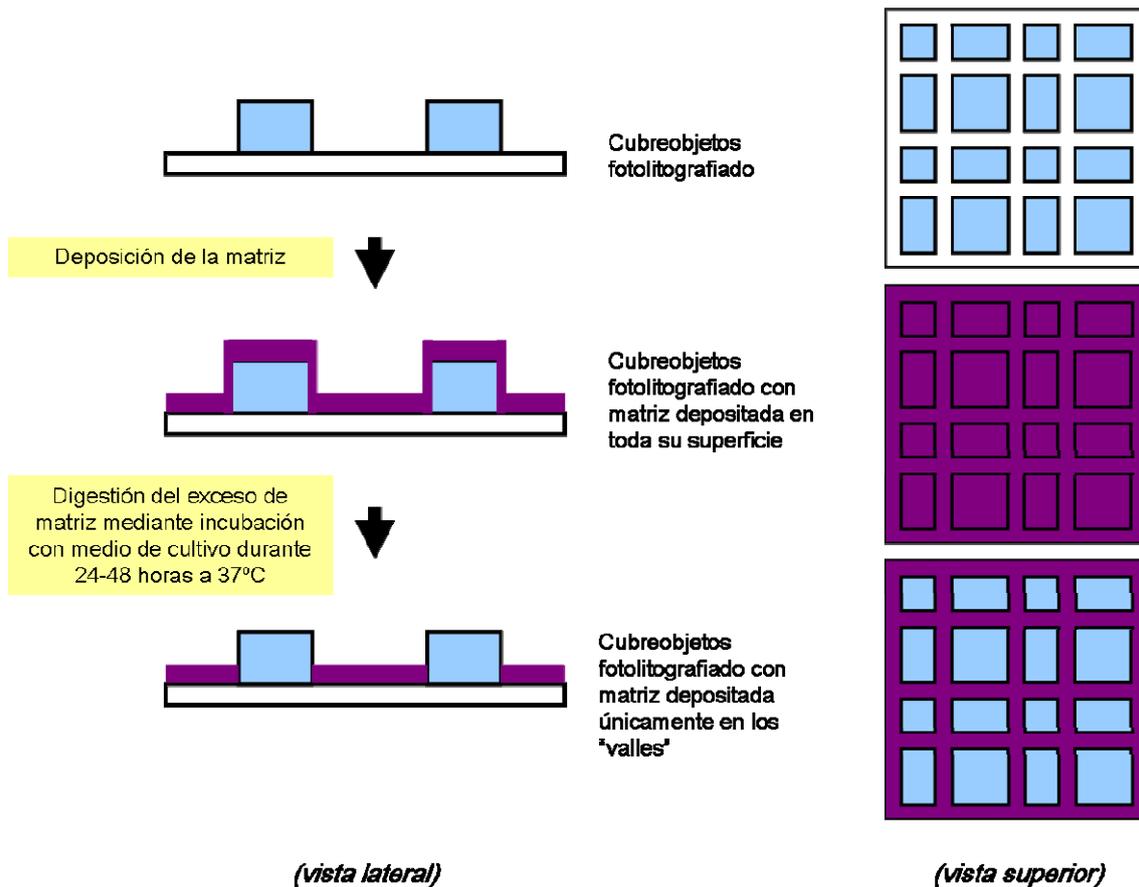


Figura 3.3. Representación esquemática del proceso de deposición manual de la matriz extracelular neuronal sobre el sustrato fotolitografiado y digestión del exceso de la misma antes de ser utilizado en cultivo celular.

Sólo en el caso de las matrices depositadas sobre el sustrato fotolitografiado, antes de que éstas fueran utilizadas para cultivo celular, el exceso de matriz fue digerido mediante incubación con medio de cultivo durante 24-48 horas a 37°C.

3.5.3. Caracterización del soporte de diferenciación neuronal

3.5.3.1. Tinción de la matriz con Azul de Coomassie

Las matrices fueron fijadas con Vitrosec® 70 durante 20 minutos a temperatura ambiente y teñidas con Azul de Coomassie durante 5 minutos también a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó mediante lavado de las matrices con agua corriente.

3.5.3.2. Técnicas microscópicas para la observación del soporte

3.5.3.2.1. *Microscopía óptica*

Para la observación y el registro de imágenes tanto del sustrato fotolitografiado como de las matrices extracelulares mediante microscopía óptica se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TS100 (con objetivos de 4x, 10x, 20x y 40x) al que se acopló una cámara Nikon DSFi1 con Nikon Digital Sight y el programa informático Nikon NIS-Elements F 2.30.

3.5.3.2.2. *Microscopía de fluorescencia*

Para la observación y el registro de imágenes del sustrato fotolitografiado mediante microscopía de fluorescencia gracias a la fluorescencia intrínseca de la resina SU-8 2100 utilizada en el proceso de fotolitografiado, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600 FN (con objetivos de 10x y 40x) al que se acopló una cámara Nikon DSFi1 con Nikon Digital Sight y el programa informático Nikon NIS-Elements F 2.30.

3.5.3.2.3. *Microscopía electrónica de barrido*

Para el análisis de las matrices mediante microscopía electrónica de barrido (del inglés, *Scanning Electron Microscopy, SEM*) éstas fueron fijadas con Vitrosec[®] 70 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas y totalmente secas, se recubrieron con una capa de oro con el fin de crear una diferencia de densidades electrónicas en la superficie de las muestras que las hiciera ser conductoras. El equipo utilizado para ello fue un equipo Polaron y la técnica utilizada fue la llamada *magnetron sputtering*, consistente en el bombardeo con iones de argón de un ánodo de oro, de manera que éste desprende partículas que se depositan en la superficie de la preparación metalizándola. De esta forma, se consiguió que las muestras presentaran en su superficie una fina capa de oro (5-30 nm de espesor) que permitió la circulación a tierra de los electrones cargados. Las muestras metalizadas se analizaron utilizando un sistema de análisis de energías dispersadas (del inglés, *Energy Dispersed System, EDS*) modelo INCA-300, acoplado a un microscopio JEOL JSM5910-LV, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Este sistema permitió la detección de elementos situados por encima del carbono (incluido) en la tabla periódica de elementos, en concentraciones superiores al 0,2% en peso.

3.5.3.2.4. Microscopía de fuerzas atómicas

Para el análisis de las matrices mediante microscopía de fuerzas atómicas (del inglés, *Atomic Force Microscopy, AFM*) éstas fueron fijadas con Vitrosec[®] 70 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas y totalmente secas, las muestras se analizaron en condiciones secas en un microscopio Digital Instruments Nanoscope[®] MM-AFM-2, que operó en modo discontinuo (del inglés, *tapping mode*) a una frecuencia de 300KHz con punta de silicio, y con el programa informático Nanoscope[®] III. Finalizado el análisis, las mismas muestras fueron incubadas durante 1 hora en agua destilada y volvieron a ser analizadas, esta vez en condiciones húmedas (cámara con agua destilada), en el mismo microscopio.

3.5.3.3. Perfilometría de la matriz

Para el análisis del espesor de las matrices mediante perfilometría, éstas fueron fijadas con Vitrosec[®] 70 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas y totalmente secas, las muestras se analizaron en condiciones secas en un equipo Veeco Dektak 150. Las condiciones con las que operó el equipo fueron: punta de 12,5 μm , longitud igual a 7.000 μm , duración igual a 60 segundos, resolución de 0,389 μm /muestra, fuerza de 1 mg, *display range auto* y perfil de “colinas y valles”.

3.5.3.4. Ensayo colorimétrico de Bradford para la determinación de proteína total

Distintas matrices fueron incubadas durante diferentes tiempos (4, 8, 24 horas y 1 semana) con PBS. Al finalizar cada tiempo de incubación, cada uno de los sobrenadantes fueron mantenidos a -20°C hasta su uso. Concluida la recolección de muestras, éstas fueron descongeladas y atemperadas para su análisis mediante ensayo colorimétrico de Bradford. Mientras tanto, se preparó una disolución de 0,2 mg/ml de BSA en agua destilada y, a partir de ella, se prepararon las distintas disoluciones de BSA necesarias para obtener una recta patrón de calibrado (por duplicado), tal y como se muestra en la siguiente tabla (**Tabla 3.10**).

A continuación, se prepararon distintas diluciones (1:1, 1:10 y 1:100) de las muestras a analizar (también por duplicado).

N° de réplicas	Muestra de BSA	N° de µl de BSA (0,2 mg/ml)	N° de µl de H ₂ O milliQ	Concentración final de la muestra de BSA (µg/ml)
2	Blanco	0	800	0
2	1	10	790	2
2	2	20	780	4
2	3	40	760	8
2	4	60	740	12
2	5	80	720	16
2	6	100	700	20
2	7	120	680	24

Tabla 3.10. Preparación de disoluciones de BSA necesarias para obtener una recta de calibrado.

Finalmente, se añadieron 200 µl de BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate a cada muestra estándar de la recta patrón de BSA y a cada dilución de muestra problema. El reactivo de Bradford es una disolución compuesta por 10 mg de azul de Coomassie G250, 5 ml de etanol y 10 ml de ácido fosfórico por cada 100 ml de disolución. Después de homogeneizar todas las mezclas con ayuda del vórtex y de incubarlas a temperatura ambiente durante 5-10 minutos, la absorbancia de cada una de ellas se midió a 595 nm con ayuda de un espectrofotómetro Kontron Instruments UVIKON 922.

3.5.3.5. Ensayo ELISA para la detección de moléculas de señalización

Para llevar a cabo este ensayo se prepararon previamente dos conjuntos de muestras:

- Matrices que contenían distintas concentraciones de Shh en su composición basal (100, 250, 500 y 750 ng/ml) pero que fueron incubadas durante el mismo tiempo (4 horas) con Neurobasal™ A Medium.
- Matrices que contenían la misma concentración de Shh (250 ng/ml) pero que fueron incubadas durante diferentes tiempos (½, 2, 4, 8, 24 y 48 horas y 1 semana) con Neurobasal™ A Medium. En este caso, a medida que se recogió todo el volumen de cada medio (500 µl), se repuso el mismo volumen con medio fresco.

En cualquier caso, una vez finalizadas las incubaciones correspondientes, las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su uso.

La determinación de la cantidad de Shh presente en las distintas muestras se llevó a cabo mediante ensayo ELISA utilizando el RayBio® Human Shh-N ELISA Kit.

Antes de empezar el ensayo, tanto los distintos componentes del kit (mantenidos a 4°C hasta su uso, excepto la proteína Shh-N humana estándar que se mantuvo a -20°C) como las distintas muestras, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Trascurrido este tiempo, se prepararon las disoluciones necesarias para el ensayo de la siguiente manera:

- Reactivo E1X (*Assay Diluent B 1X*): 15 ml de reactivo E5X + 60 ml de agua destilada.
- Reactivo B1X (*Wash Buffer Concentrate 1X*): 20 ml de reactivo B 20X + 380 ml de agua destilada.
- Reactivo F (*Detection Antibody Shh-N*): 100 µl de reactivo E1X + 1 vial de Shh-N; después de agitar hasta su completa disolución, la mezcla se diluyó 80 veces añadiendo 100 µl de la misma por cada 7.900 µl de reactivo E1X.
- Reactivo G (*HRP-Streptavidin*): 2 µl de reactivo G 10.000X + 198 µl de reactivo E1X; después de agitar hasta su completa disolución, la mezcla se diluyó 100 veces añadiendo 100 µl de la misma por cada 7.900 µl de reactivo E1X.

En caso necesario, también se llevó a cabo la dilución de las muestras problema con el reactivo E1X.

Una vez preparadas todas las disoluciones, se añadieron 100 µl de cada estándar y de cada muestra (diluida en caso necesario) en sus pocillos correspondientes. Después de incubar la placa durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente con una suave agitación y de realizar 4 lavados sucesivos de los distintos pocillos con 300 µl/pocillo de reactivo B1X, se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo F y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Después de volver a realizar 4 lavados sucesivos de los distintos pocillos con 300 µl/pocillo de reactivo B1X, se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo G y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Trascurrido este tiempo, y tras repetir los mismos lavados, se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo H (*TMB one-step substrate reagent*) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación. En este punto ya se pudo observar la presencia de proteína Shh-N humana en las muestras por presencia de color azul en los distintos pocillos. La reacción se paró, transcurridos los 30 minutos, mediante la adición de 50 µl/pocillo de reactivo I (*Stop Solution*). Finalmente, y tras observar el viraje de

color de azul a amarillo, la absorbancia a 450 nm de los diferentes pocillos se midió inmediatamente con ayuda del lector de microplacas Bio-Tek Instruments PowerWave XS y del software Bio-Tek Instruments KC Junior acoplado a él. Una representación esquemática del protocolo descrito se puede observar en la **Figura 3.4**.

La normalización de la cantidad de proteína Shh-N humana presente en las distintas muestras se realizó en base a la cantidad de proteína total presente en las mismas, determinada mediante ensayo colorimétrico de Bradford, tal y como se ha comentado en el apartado anterior.

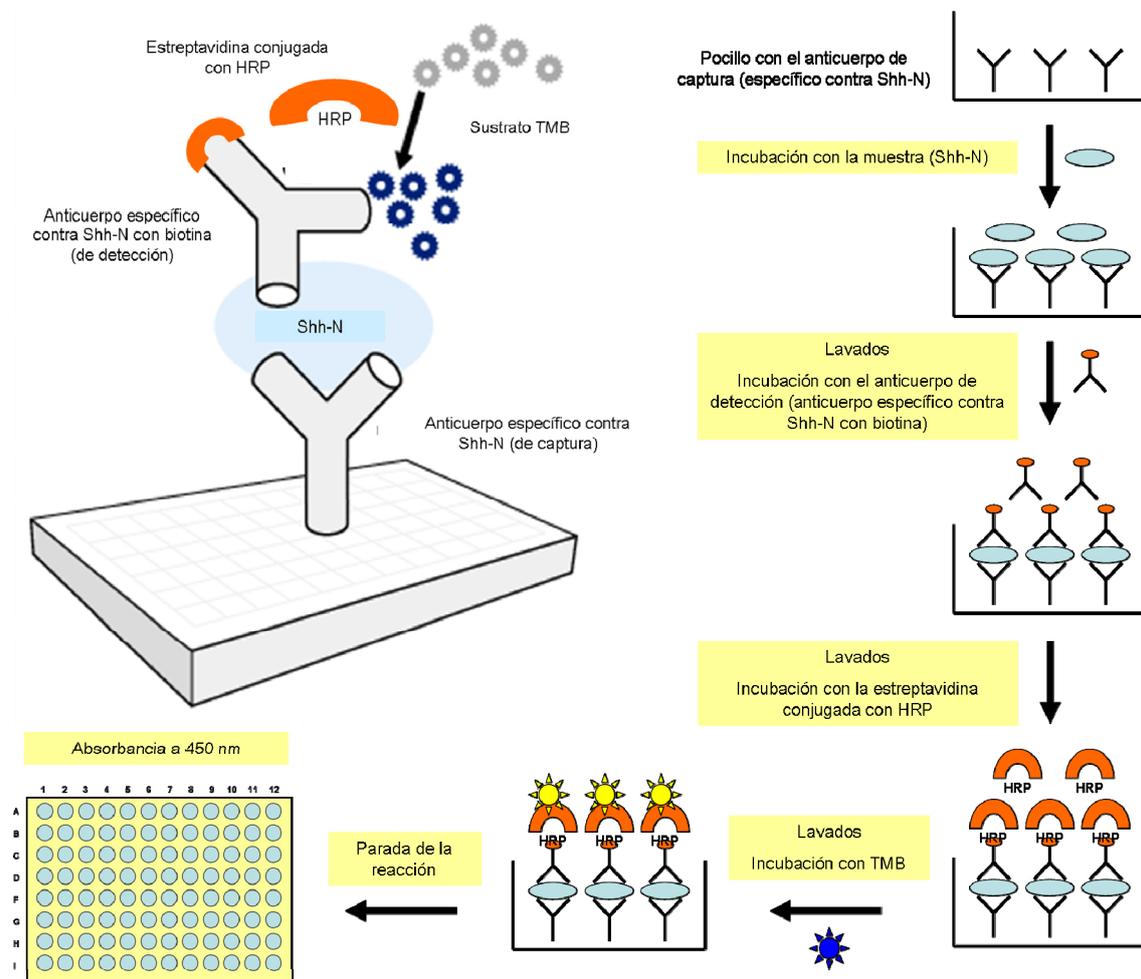


Figura 3.4. Representación esquemática del ensayo ELISA contra Shh.

3.5.4. Cultivos celulares

Durante el desarrollo de los cultivos celulares, se mantuvieron en todo momento unas estrictas condiciones de esterilidad gracias al trabajo en una campana de flujo laminar Telstar BioIIA; a la previa esterilización del material reutilizable y de las disoluciones preparadas en condiciones de no esterilidad, y a la utilización de material esterilizado de un solo uso. Todos los cultivos celulares, tanto de la línea celular establecida como de las células primarias, se mantuvieron en incubadores del tipo ThermoElectron Corporation HEPA Class 100 e Igo150 Jouan, respectivamente, a una temperatura constante de 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂ con humedad saturada (90%).

3.5.4.1. Línea celular establecida PC12

La línea celular PC12 (CRL-1721™, ATCC®) es una línea celular derivada de un feocromocitoma de glándula adrenal de rata (*Rattus norvegicus*, macho), establecida por Greene y Tischler en 1976 (Greene y Tischler, 1976) y depositada en la Colección de Cultivos Tipo americana (del inglés, *American Type Culture Collection, ATCC*) por el Dr. Patterson. Como se puede observar en la **Figura 3.5**, estas células presentan una morfología poligonal poco adherente y tienden a formar agregados multicelulares. En presencia de NGF, se produce su inducción reversible hacia fenotipo neuronal catecolaminérgico, con síntesis de dopamina y norepinefrina (pero no de epinefrina).

3.5.4.1.1. Mantenimiento

Las células PC12 se caracterizan por su baja adherencia a los botes de cultivo, lo que dificulta su cultivo como línea celular adherente. Para aumentar su adherencia, estas células se mantuvieron en botes de cultivo tratados con colágeno bovino de tipo I del tipo Corning® CellBIND® Surface Flasks, con el medio de mantenimiento descrito en el apartado 3.3.1. de este capítulo. Al alcanzar el 80% de confluencia (aproximadamente, 10 x 10⁶ células / 75 cm²), las células se levantaron con ayuda de un cell scraper y, bien se subcultivaron para su mantenimiento (a una concentración aproximada de 1 x 10⁶ células / 75 cm²), o bien se utilizaron en los experimentos de diferenciación (a la concentración celular deseada en cada caso). Las células sobrantes se congelaron en medio de mantenimiento suplementado con 5% (v/v) de DMSO, manteniéndose a -80°C hasta su uso.

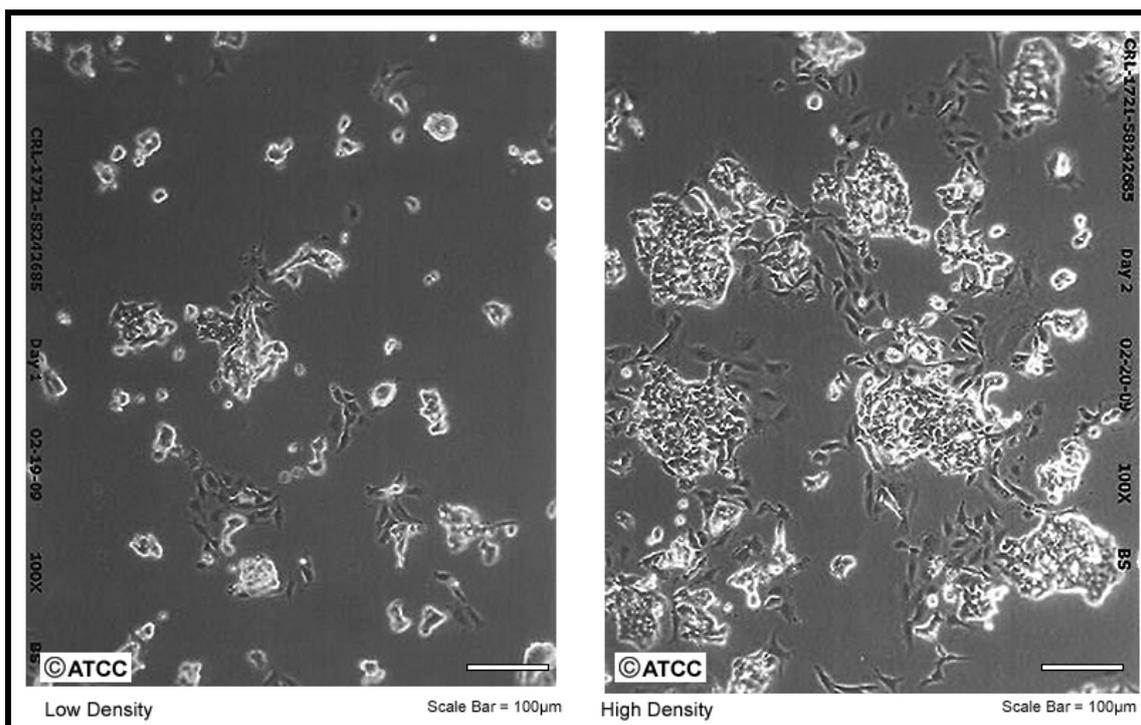


Figura 3.5. Morfología de un cultivo de células PC12 en condiciones de proliferación. Imagen proporcionada por LGC Standards (distribuidor de la ATCC).

3.5.4.1.2. Diferenciación

Para su diferenciación, las células PC12 fueron cultivadas a una concentración de entre 2.500 células/ml (12.500 células totales) y 120.000 células/ml (600.000 células totales) sobre los sustratos biofuncionalizados, con el medio de diferenciación descrito en el apartado 3.3.2. de este capítulo. Como control comparativo de la diferenciación alcanzada en los sustratos en estudio, las células se diferenciaron de forma paralela y bajo las mismas condiciones de cultivo sobre cubreobjetos de vidrio tratados previamente con solución de polilisina. Para ello, los cubreobjetos fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente con la solución de polilisina en condiciones de esterilidad. A continuación, se retiró la solución y la placa que contenía los cubreobjetos se mantuvo en la campana de flujo laminar durante 10 minutos para la completa evaporación de los restos de la misma. Antes de realizar la deposición de las células, los cubreobjetos fueron lavados con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

3.5.4.2. Cultivos primarios

En todos los casos, las muestras de tejido a partir de las cuales se establecieron los cultivos de células primarias se obtuvieron bajo estricto cumplimiento de la normativa estipulada por la legislación vigente respecto al uso y cuidado de animales de laboratorio (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; *European Communities Council Directive of 24 November 1986, 86/609/EEC*).

Concretamente, las células de hipocampo de rata embrionaria fueron obtenidas en colaboración con el grupo del Doctor Antonio García García del Departamento de Farmacología del Instituto Teófilo Hernando de la Universidad Autónoma de Madrid. Todos los experimentos con estas células se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa establecida por el Comité Nacional para el cuidado de los animales de experimentación y que fue aprobada por el Comité de experimentación animal de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.5.4.2.1. Aislamiento y proliferación de células de hipocampo de rata embrionaria

Los embriones de rata de 18 días post-fertilización (E18) utilizados para el aislamiento de neuronas hipocampales, se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley (Charles River) en estado de gestación, a las que se les practicó una operación de cesárea inmediatamente después de ser sometidas a inhalación de una mezcla de CO₂ y O₂ (70%+30%). En condiciones de esterilidad, los embriones fueron sacados del saco vitelino y situados en una placa de Petri con PBS frío. Una vez extraídos los cerebros, el hipocampo de cada embrión fue separado rápidamente del resto de estructuras cerebrales (sobre todo, teniendo cuidado de no arrastrar las meninges) con ayuda de una lupa Leica CLX 150x con fuente de luz fría y unas pinzas de relojero rectas, conservándolo en todo momento en PBS frío y en hielo para mantener la integridad del tejido. Inmediatamente después de la disección, el tejido fue digerido enzimáticamente durante 20 minutos a 37°C con una solución 0,5 mg/ml de papaína en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y con 1 mg/ml de BSA y 10 mM de glucosa. Transcurrido este tiempo, la solución enzimática fue reemplazada por 5 ml del medio de aislamiento/proliferación correspondiente -descrito en el apartado 3.3.3 del presente capítulo-, y el tejido fue disgregado mecánicamente con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estirada por calor. A continuación, la suspensión celular se centrifugó durante 4 minutos a 1.200 rpm. Tras la eliminación del sobrenadante, el

precipitado celular fue resuspendido en 5 ml de medio de aislamiento/proliferación y el número total de células fue determinado con ayuda de una cámara de Neubauer y trypan blue stain 0,4%. Finalmente, las células se cultivaron a una concentración de 200.000 células/ml en frascos de cultivo tratados para cultivo celular durante 24 horas antes de ser utilizadas en los experimentos de diferenciación. Un esquema del protocolo descrito se puede observar en la **Figura 3.6**.

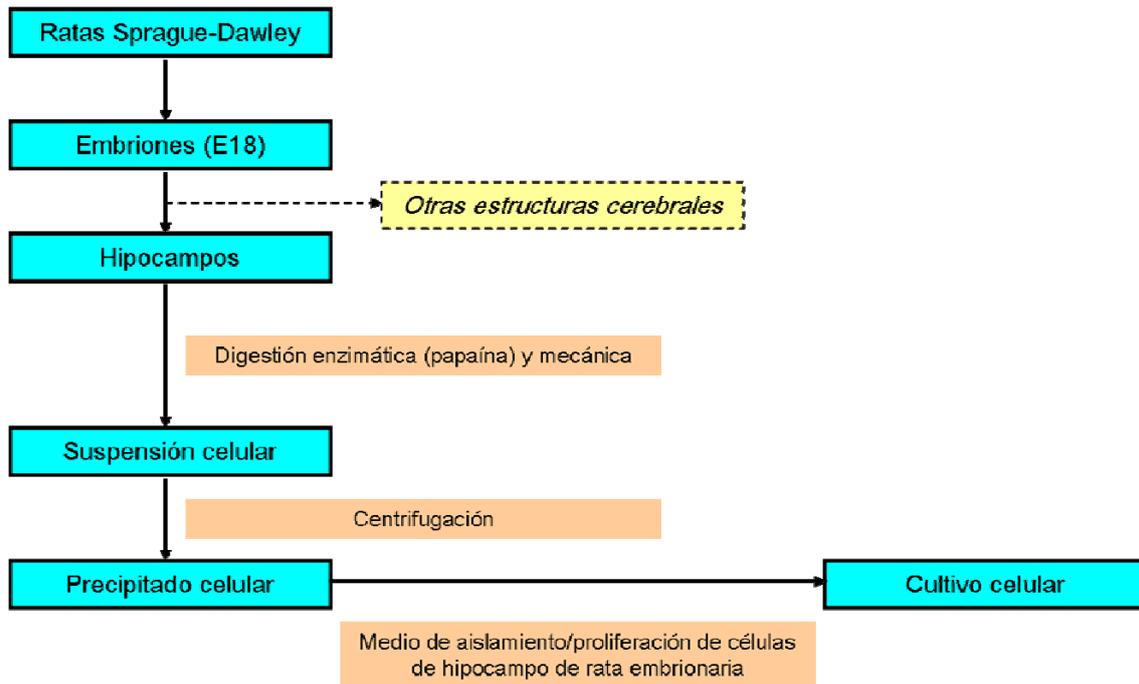


Figura 3.6. Esquema del protocolo de aislamiento y proliferación de neuronas hipocámpicas de rata embrionaria (E18).

3.5.4.2.2. Aislamiento y proliferación de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata

Las células progenitoras neurales fueron aisladas a partir de zonas subventriculares de cerebros de ratas Wistar de 2-3 días post-nacimiento (P2-P3, Charles River). Cada zona subventricular fue separada del resto de estructuras cerebrales bajo una lupa Leica CLX 150x y cortada en láminas finas con ayuda de un procesador de tejidos (McIlwain Campden Instruments). Seguidamente, las láminas de tejido fueron incubadas durante 7 minutos a 37°C en una solución al 0,25% de tripsina-EDTA. Una vez finalizado el tiempo de incubación, la actividad enzimática de la tripsina fue inhibida mediante la adición de una solución inhibidora

de la misma con 0,001% de DNaseI durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el tejido disgregado fue centrifugado a 1.000 rpm durante 10 minutos, fue lavado 3 veces con PBS, y fue disgregado mecánicamente con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y una micropipeta con punta de 1 ml. Finalmente, la suspensión celular resultante fue resuspendida en el medio de aislamiento/proliferación correspondiente -descrito en el apartado 3.3.4 del presente capítulo-, a una concentración de 4×10^5 células/cm² en botes de cultivo no tratados para cultivo celular (no adherentes). Las células fueron mantenidas durante un mínimo de 7 días bajo estas condiciones, con adición de 10 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de FGF2 cada 2 días, para la correcta selección y proliferación de las células progenitoras neurales en forma de neuroesferas. Un esquema del protocolo descrito se puede observar en la **Figura 3.7**.

Una vez formadas las neuroesferas, éstas fueron utilizadas inmediatamente en los experimentos de diferenciación. Las neuroesferas sobrantes fueron disgregadas enzimáticamente, mediante incubación de las mismas con Accumax™ solution durante 5 minutos a temperatura ambiente, y mecánicamente, mediante una micropipeta con punta de 1 ml. La suspensión celular resultante fue centrifugada a 1.500 rpm durante 5 minutos y el precipitado celular fue resuspendido en medio de proliferación fresco, bajo las mismas condiciones mencionadas en el párrafo anterior, para la formación de nuevas neuroesferas (neuroesferas secundarias).

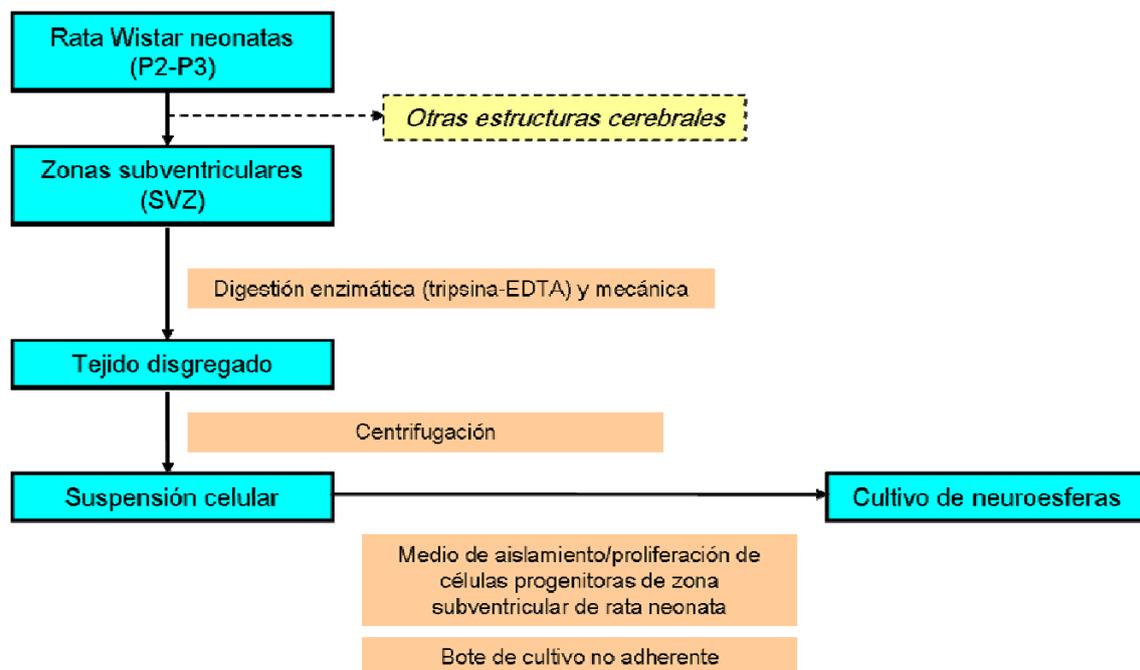


Figura 3.7. Esquema del protocolo de aislamiento y proliferación de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata (P2-P3).

3.5.4.2.3. *Aislamiento y proliferación de células precursoras derivadas de piel de rata adulta*

Las células precursoras derivadas de piel de rata adulta se aislaron siguiendo el protocolo descrito en 2006 por el grupo de la Dra. Miller (Biernaskie y col., 2006) con ciertas modificaciones, teniendo en cuenta otros protocolos descritos en la literatura para el aislamiento de este tipo de células a partir de piel de rata (Fernandes y col., 2004; Hunt y col., 2008) y la normativa estipulada por la legislación vigente respecto al uso y cuidado de animales de laboratorio, citada anteriormente.

Las muestras de piel se obtuvieron a partir de ratas Wistar hembras adultas de aproximadamente 200 g (Charles River) a las que se les practicó la extracción de un fragmento de piel dorsal de aproximadamente 5 cm² en condiciones de esterilidad, después de ser sometidas durante 20 minutos a inhalación de una mezcla de CO₂ y O₂ (70%+30%). Para minimizar la presencia de pelo presente en el cultivo celular *a posteriori*, los pelos presentes en la zona de piel a extraer fueron eliminados con ayuda de una cuchilla de afeitar, de agua y de jabón neutro. Seguidamente a la extracción, la muestra de piel fue incubada durante 30 minutos a 4°C en una solución de HBSS con 2% de P/S y 2% de Fungizone™ antimycotic, para evitar una contaminación por bacterias y hongos/levaduras, respectivamente. Durante estos 30 minutos, esta solución fue agitada vigorosamente cada 5 minutos para la apropiada oxigenación del tejido. A continuación, y una vez eliminados los restos de tejido graso subcutáneo, la muestra de piel fue cortada manualmente en pequeños fragmentos de aproximadamente 2-3 mm² con ayuda de unas pinzas y un bisturí quirúrgico. Posteriormente, estos fragmentos fueron sometidos a digestión enzimática durante 2 horas a 37°C y en agitación con una solución de 2 mg/ml de collagenase cruda type IA en HBSS, debidamente filtrada antes de uso. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo una disgregación mecánica del tejido incompletamente digerido con ayuda de una micropipeta con punta de 1 ml. A la suspensión celular resultante se le añadió medio de aislamiento/proliferación correspondiente (el mismo volumen que el volumen de solución de collagenasa de partida) -descrito en el apartado 3.3.5 del presente capítulo- para diluir la actividad enzimática. A continuación, esta suspensión fue filtrada a través de un cell strainer de 40 µm para la eliminación de los restos de piel no digeridos y los pelos que hubiesen podido permanecer en la preparación. Después de varias centrifugaciones de la suspensión celular a 1.500 rpm durante 5 minutos cada vez, el precipitado celular resultante fue resuspendido en medio de aislamiento/proliferación y depositado en placas de 6 pocillos no tratadas para cultivo celular (no adherentes) para facilitar la no adhesión de las células a la placa de cultivo y propiciar, de esta manera, la formación de estructuras similares a neuroesferas. Las células se mantuvieron durante un mínimo de 7 días bajo estas condiciones, con cambios del

50% del medio de cultivo cada 2 días, para la correcta selección y proliferación de las células precursoras neurales en forma de estructuras similares a neuroesferas. Un esquema del protocolo descrito se puede observar en la **Figura 3.8**.

Una vez formadas las ESNs, éstas fueron utilizadas inmediatamente en los experimentos de diferenciación. Las ESNs sobrantes fueron o bien disgregadas enzimática/mecánicamente o bien mantenidas en cultivo con una renovación del 50% del medio de cultivo cada 5 días.

En el primer caso, las ESNs fueron disgregadas enzimáticamente, mediante incubación de las mismas con Accumax™ solution durante 5 minutos a temperatura ambiente, y mecánicamente, mediante una micropipeta con punta de 1 ml. La suspensión celular resultante fue centrifugada a 1.500 rpm durante 5 minutos y el precipitado celular fue resuspendido en medio de proliferación fresco, bajo las mismas condiciones mencionadas en el párrafo anterior, para la formación de nuevas ESNs (ESNs secundarias).

En el segundo caso, se hizo un reparto equitativo del medio de cultivo que albergaba a las ESNs sobrantes en dos pocillos iguales y, ambos, fueron suplementados con la misma cantidad de medio de proliferación fresco hasta alcanzar el volumen de partida (mitad medio condicionado, mitad medio fresco). Nuevamente, se mantuvieron las mismas condiciones de proliferación mencionadas con anterioridad.

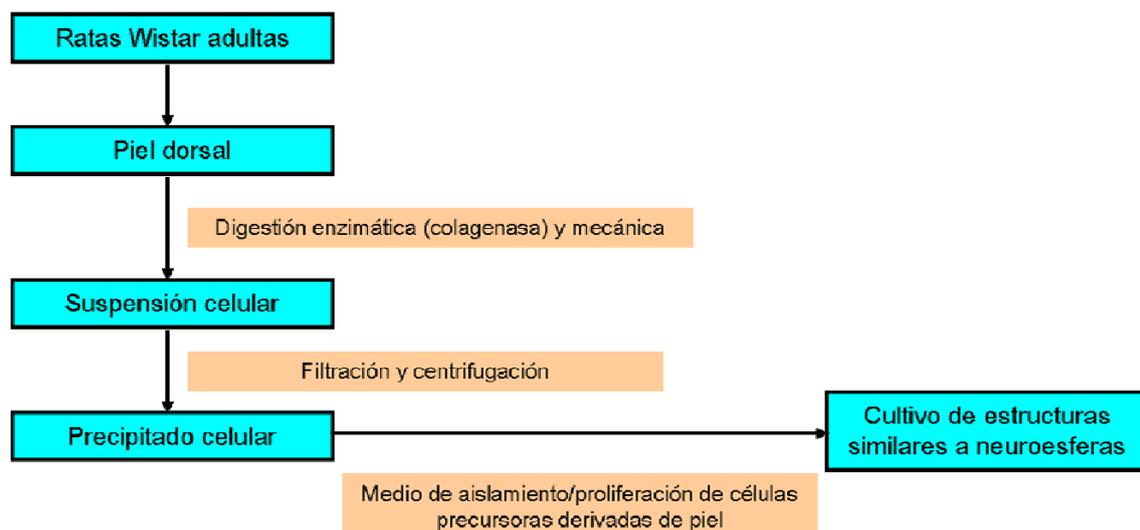


Figura 3.8. Esquema del protocolo de aislamiento y proliferación de células precursoras derivadas de piel de rata adulta.

3.5.4.2.4. *Diferenciación de cultivos primarios*

La diferenciación de las células de hipocampo de rata embrionaria se llevó a cabo mediante la deposición de las mismas a una concentración de 200.000 células/ml en la matriz desarrollada previamente (depositada en este caso sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro situados en placas de 4 pocillos) con el medio de diferenciación neuronal descrito en el apartado 3.3.6 de este capítulo.

Tanto en el caso de las células madre de zona subventricular de rata neonata como en el caso de las células precursoras derivadas de piel de rata adulta, la diferenciación se llevó a cabo mediante la deposición de entre 1 y 10 neuroesferas o estructuras similares a neuroesferas, respectivamente, en la matriz desarrollada previamente (también depositada sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro situados en placas de 4 pocillos), con el medio de diferenciación neuronal, primero, y el medio de diferenciación dopaminérgico, segundo, descritos en los apartados 3.3.7 y 3.3.8, respectivamente, de este capítulo.

En todos los casos, los cultivos fueron mantenidos en condiciones de diferenciación durante un mínimo de 10 días en el caso de la diferenciación puramente neuronal, y de 20 días en el caso de la diferenciación dopaminérgica. En cualquier caso, la mitad del medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días (50% medio de cultivo preexistente, 50% medio de cultivo fresco).

3.5.5. Caracterización celular

3.5.5.1. Tinciones celulares

3.5.5.1.1. *Tinción de eosina-azul de metileno según May-Grünwald*

Una vez retirado el medio de diferenciación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con Vitrosec® 70 durante 2-5 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células fueron teñidas con la solución de eosina-azul de metileno según May-Grünwald durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el exceso de colorante fue eliminado mediante lavado con agua corriente, y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.5.5.1.2. Tinción de Bodian modificada (proteinato de plata)

El proteinato de plata permite la visualización específica de neurofibrillas por lo que fue utilizada por Bodian para la tinción específica de axones neuronales (Bodian, 1936). La tinción utilizada en este trabajo es una tinción de Bodian modificada (Russell, 1973).

A continuación, se detalla la forma en la que se prepararon las distintas soluciones necesarias para realizar esta tinción.

La solución de proteinato de plata se preparó dispersando, lentamente y sin remover, 1 gramo de proteinato de plata en 100 ml de agua destilada a 37°C, que contenía un trozo de chapa de cobre de aproximadamente 5 gramos de peso (previamente sumergida en ácido nítrico para eliminar la capa de óxido corrosivo y, posteriormente, enjuagada en agua destilada para eliminar el exceso ácido nítrico).

La solución reductora se preparó mezclando 1 gramo de hidroquinona y 5 gramos de sulfato sódico en 100 ml de agua destilada.

La solución de cloruro aúrico se preparó añadiendo 1 gramo de ácido tetracloroaúrico trihidratado en 100 ml de agua destilada. Una vez diluido, se añadieron 2 gotas de ácido acético glacial.

La solución de ácido oxálico se preparó añadiendo 1 gramo de ácido oxálico dihidratado en 100 ml de agua destilada.

La solución de tiosulfato sódico se preparó añadiendo 5 gramos de tiosulfato sódico pentahidratado en 100 ml de agua destilada.

Tanto la solución reductora, como la solución de cloruro aúrico, la solución de ácido oxálico y la solución de tiosulfato sódico, se prepararon de forma previa a la tinción, almacenándose a temperatura ambiente hasta su uso. Sólo la solución de proteinato de plata tuvo que ser preparada forzosamente justo antes de su uso debido a su termosensibilidad y fotosensibilidad, manteniéndola por ello en todo momento a una temperatura de 37°C y en oscuridad.

Antes de proceder a la tinción de las células diferenciadas, éstas se lavaron con PBS y se incubaron con Vitrosec® 70 durante 2-5 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las

células se lavaron con agua destilada y se incubaron durante 12 horas a 37°C y en oscuridad con la solución de proteinato de plata. Finalizada la incubación, las células se lavaron con agua destilada y se incubaron durante 10 minutos con la solución reductora (viraje de color amarillo a color pardo tabaco). A continuación, las células se volvieron a lavar 3-4 veces de 1 minuto cada vez con agua destilada y se incubaron durante 3 minutos con la solución de cloruro aúrico. Tras realizar un nuevo lavado con agua destilada, las células se incubaron durante 3 minutos con la solución de ácido oxálico. Nuevamente, las células se lavaron 3-4 veces de 1 minutos cada vez con agua destilada y se incubaron durante 5 minutos con la solución de tiosulfato sódico. Finalmente, se realizó un lavado con agua destilada y se dejó secar para su posterior observación y registro mediante técnicas microscópicas.

3.5.5.1.3. Tinción con el colorante fluorescente vital PKH67

PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Labeling consta de dos reactivos: PKH67 fluorescent dye y Diluent C. El colorante vital PKH67 es un colorante fluorescente verde con largas colas alifáticas que se insertan en la zona lipídica de la membrana celular. El diluyente C es una solución acuosa isosmótica que vehiculiza el colorante a la vez que mantiene la integridad celular. La intensidad del marcaje celular depende de la concentración celular y de la concentración del colorante pero no es saturable; sin embargo, un exceso de marcaje puede afectar a la integridad de la membrana celular traduciéndose en una baja recuperabilidad de las células.

Las estructuras similares a neuroesferas derivadas de piel de rata adulta fueron marcadas con el colorante vital PKH67 antes de llevar a cabo su diferenciación. Como se partió de una suspensión de células en un medio de cultivo sin suero, no fue necesario lavarlas con PBS antes de realizar el marcaje (si las células se hubiesen mantenido en adhesión en un medio con suero hubiese sido imprescindible levantarlas mediante digestión enzimática con tripsina y lavarlas con PBS para eliminar los restos de suero presente en el medio, ya que las proteínas presentes en el suero se unen al colorante reduciendo la concentración del mismo disponible para el marcaje celular). Por lo tanto, la suspensión celular fue centrifugada a 1.500 rpm durante 5 minutos y, tras eliminar completamente el sobrenadante con ayuda de una pipeta, el precipitado celular fue resuspendido en 1 ml de diluyente C. Inmediatamente después, esta resuspensión celular se mezcló (sin agitación) con una solución de colorante 2X preparada justo antes de su uso (4 µl de PKH67 + 1 ml de diluyente C), y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para que no se produjera el apagamiento del fluoróforo. A continuación, el marcaje se detuvo añadiendo 2 ml de suero a la mezcla anterior e incubando

la mezcla resultante durante 1 minuto a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, la suspensión celular fue centrifugada a 1.500 rpm durante 10 minutos a 25°C y, tras la eliminación del sobrenadante, el precipitado celular fue resuspendido en medio de diferenciación neuronal.

3.5.5.2. Inmunofluorescencias

Las células a caracterizar fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% en agua destilada durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Con el objetivo de bloquear los grupos aldehído que quedan libres tras la fijación con paraformaldehído al 4% (y que pueden interferir en las preparaciones aumentando el fondo inespecífico de las mismas tras el marcaje con los anticuerpos), una vez finalizada la fijación de las células, se realizó un paso adicional en el protocolo de inmunofluorescencia consistente en la incubación de las preparaciones durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con una solución de *quenching*, tras un lavado previo de las mismas con PBS. La solución de *quenching* es una solución 50 mM de cloruro amónico (solución de trabajo) que se preparó en el momento de su utilización a partir de una solución 1M de cloruro amónico (solución madre) diluyendo 500 µl de la solución madre en 9,5 ml de PBS (dilución 1:20). La solución madre fue preparada previamente mezclando 5,35 g de cloruro amónico por cada 100 ml de disolución.

A continuación, las células fueron lavadas 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con PBS. Como todas las proteínas seleccionadas para ser detectadas mediante reacción antígeno-anticuerpo específica eran intracelulares, las células fueron permeabilizadas durante 60 minutos a temperatura ambiente con una solución de PBS con 0,3% de Triton[®] X-100 (PBST) a la que se añadió un 5% de suero de burro para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario. Seguidamente, las células fueron incubadas con la solución de anticuerpo primario (**Tabla 3.7**) correspondiente a la proteína a detectar en PBST durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada vez, para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido específicamente a la proteína a detectar. Dado el carácter indirecto del ensayo, las proteínas que reaccionaron específicamente con el anticuerpo primario fueron detectadas mediante incubación de las células con una solución de anticuerpo secundario (**Tabla 3.8**) en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, durante 5 minutos cada vez, para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido específicamente al complejo anticuerpo primario-proteína. La visualización de los núcleos celulares se realizó

mediante incubación de las células con una solución de 10 µg/ml de Hoechst 33258 (bisbenzimidide H 33258; absorción máxima a 352 nm y emisión máxima a 461 nm; dilución 1:1000) en agua destilada durante 3-5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS. Las muestras fueron montadas sobre cubreobjetos de vidrio con una gota de Mowiol[®] o de Vectashield[®] Mounting Medium y selladas mediante la adición de una gota de laca de uñas en los bordes de las preparaciones.

La determinación del número de células que expresaron un antígeno específico frente a las que no lo expresaron, se realizó mediante recuento de las células positivas para ese marcaje en 10 campos aleatorios de distintas preparaciones. Además, con el fin de determinar el porcentaje que supone ese número de células frente al total, se contaron el número total de núcleos presentes en dichos campos aleatorios de las distintas preparaciones. Como se indicará al final de este capítulo, los resultados se expresaron como la media ± el error estándar del número de réplicas del experimento en cuestión en cada caso.

3.5.5.3. Técnicas microscópicas

3.5.5.3.1. *Microscopía óptica*

Para la observación y el registro de imágenes de las células mediante microscopía óptica se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TS100 (con objetivos de 4x, 10x, 20x y 40x) al que se acopló una cámara Nikon DSFi1 con Nikon Digital Sight y el programa informático Nikon NIS-Elements F 2.30.

3.5.5.3.2. *Microscopía de fluorescencia*

Para la observación y el registro de imágenes de las células marcadas con fluoróforos (tanto de forma específica como inespecífica) mediante microscopía de fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600 FN (con objetivos de 10x y 40x) al que se acopló una cámara Nikon DSFi1 con Nikon Digital Sight y el programa informático Nikon NIS-Elements F 2.30.

3.5.5.3.3. *Microscopía confocal*

Para la observación y el registro de imágenes de las células inmunomarcadas mediante microscopía confocal, se utilizó un microscopio Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510 (con objetivos de 10x, 20x, 40x-*water*, 40x-*oil* y 63x-*oil*) al que se acopló una cámara Zeiss Axion y el programa informático Zeiss ZEN 2008 SP1.1. Este microscopio cuenta con un láser de argón (458, 477, 488 y 514 nm), dos láseres de helio-neón (543 y 633 nm, respectivamente) y un láser de diodo azul (405 nm). La captación de las imágenes con marcaje doble y triple se realizó seleccionando la configuración *multitrack*, que impide el solapamiento de los distintos fluorocromos para descartar falsos dobles y triples positivos. Todas las imágenes se realizaron a alta resolución (1024 *pixels*; formato *.tiff*). Para la observación de las células con el objetivo de inmersión 63x-*oil* se utilizaron unas gotas de Immersol™ 518F (Zeiss).

3.5.5.3.4. *Microscopía electrónica de barrido*

Para el análisis de las células mediante microscopía electrónica de barrido, éstas fueron fijadas con Vitrosec® 70 durante 20 minutos a temperatura ambiente y teñidas con solución de eosina-azul de metileno según May-Grünwald durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez lavadas con agua destilada y totalmente secas, fueron recubiertas con una fina capa de oro en un equipo Polaron, tal y como se ha comentado en el apartado 3.5.3.2.3 de este capítulo. Las muestras metalizadas fueron analizadas mediante un EDS INCA-300 acoplado a un microscopio JEOL JSM5910-LV, un voltaje de aceleración de 20 kV. En este caso, también se detectaron los elementos situados por encima del carbono (incluido) en la tabla periódica de elementos, en concentraciones superiores al 0,2% en peso.

3.5.6. Medida de la viabilidad celular mediante ensayo con MTT

El ensayo con MTT es un ensayo colorimétrico cuantitativo que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Este método se basa en la capacidad que presenta el enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células eucariotas vivas para convertir el sustrato bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT, de color amarillo) en el producto formazán (de color azul oscuro), lo cual se traduce en un incremento en los valores de absorbancia de la muestra a 540 nm.

En este trabajo el ensayo con MTT se realizó en base al protocolo descrito por Denizot y Lang en 1986 (Denizot y Lang, 1986). Antes de realizar el ensayo, las células de hipocampo de rata embrionaria cultivadas sobre matrices sin y con condroitín 4-sulfato (15 y 1,5 mg/ml) fueron sometidas durante 7 días a tratamiento con distintos compuestos citotóxicos (glutamato, rotenona/oligomicina A, β -amiloide y veratridina). A continuación, las células fueron tratadas con una disolución de MTT (M2003, Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/ml en Neurobasal™ A Medium y se mantuvieron durante 2 horas en el incubador a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂ con humedad saturada (90%). Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue eliminado y las células fueron lisadas con DMSO para promover la disolución de los cristales de formazán formados. Finalmente, la absorbancia de cada pocillo fue determinada a 540 nm con ayuda de un espectrofotómetro Kontron Instruments UVIKON 922. Como control del ensayo se utilizaron células sólo tratadas con medio de cultivo (100% de viabilidad), de manera que los resultados fueron expresados en % respecto al control.

3.5.7. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm el error estándar y el número de réplicas analizadas en cada caso (n) fue de un mínimo de 3, salvo indicación contraria. La significancia estadística de los resultados fue calculada mediante la prueba de t de Student pareada. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como significativos (*); además, entre de los valores considerados significativos, se distinguieron los valores de $0,001 < p < 0,01$ (**) de los valores de $p < 0,001$ (***)

CAPÍTULO IV
RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DEL SOPORTE DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Como se ha indicado anteriormente, el primer objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un soporte celular con unas características adecuadas, tanto topográficas como bioquímicas, para llevar a cabo una diferenciación neuronal guiada sobre el mismo. Para ello, el primer punto que se trató fue el procedimiento a seguir para fabricar un soporte con una microgeometría superficial definida.

4.1.1. Sustrato fotolitografiado

Como se ha visto en el apartado 1.2.3 de la introducción, existen diversas técnicas que se pueden utilizar para crear microestructuras en la superficie de un sustrato con el objetivo de que actúen como guías de diferenciación neural, por ejemplo, la microestampación por contacto y la fotolitografía. En este trabajo, después de realizar varios ensayos preliminares con una y otra técnica, la microestampación por contacto -utilizando los componentes de la matriz extracelular neural que se describirán más adelante-, no demostró los resultados deseados por lo que se decidió realizar las microgeometrías de superficie mediante la técnica de fotolitografía (Gunn y col., 2010).

Como se ha mostrado en el apartado 3.5.1 de los materiales y métodos, en primer lugar se fabricó una máscara y se seleccionaron tanto la resina como el tipo de sustrato que se utilizarían en el proceso. Por un lado, la resina seleccionada fue la SU-8 2100 de MicroChem, por estar descrita en la literatura como una resina biocompatible (Zhang y col., 2006), estable tanto química como térmicamente, y con una elevada transmisión óptica alrededor de los 360 nm (facilidad de modelado); por otro lado, los sustratos seleccionados fueron cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm, tamaño suficiente tanto para una correcta manipulación de las muestras durante todo el proceso de fotolitografiado como para su posterior utilización en cultivo celular (insertos en placas de 6 pocillos para cultivo celular). Finalmente, después de llevar a cabo varias pruebas de deposición de la resina sobre el sustrato, se ajustaron las condiciones del proceso de manera que éste fue reproducido de manera sistemática y repetitiva (*véase el apartado 3.5.1.2 de los materiales y métodos*).

Como se puede observar tanto en la representación esquemática como en la imagen de la **Figura 4.1**, la microgeometría superficial grabada en los cubreobjetos de vidrio está basada en “picos” de $300 \times 300 \mu\text{m}$ y de $300 \times 400 \mu\text{m}$ donde está presente la resina hidrofóbica SU-8 2100, y “valles” de $200 \mu\text{m}$ de ancho donde la misma resina no está presente. La finalidad de esta microestructura fue crear unos canales interconectados de tamaño suficiente para poder albergar entre 2 y 3 células neuronales en ellos, de manera que éstas se dispusieran de forma alineada y conectada respecto a las estructuras diseñadas.

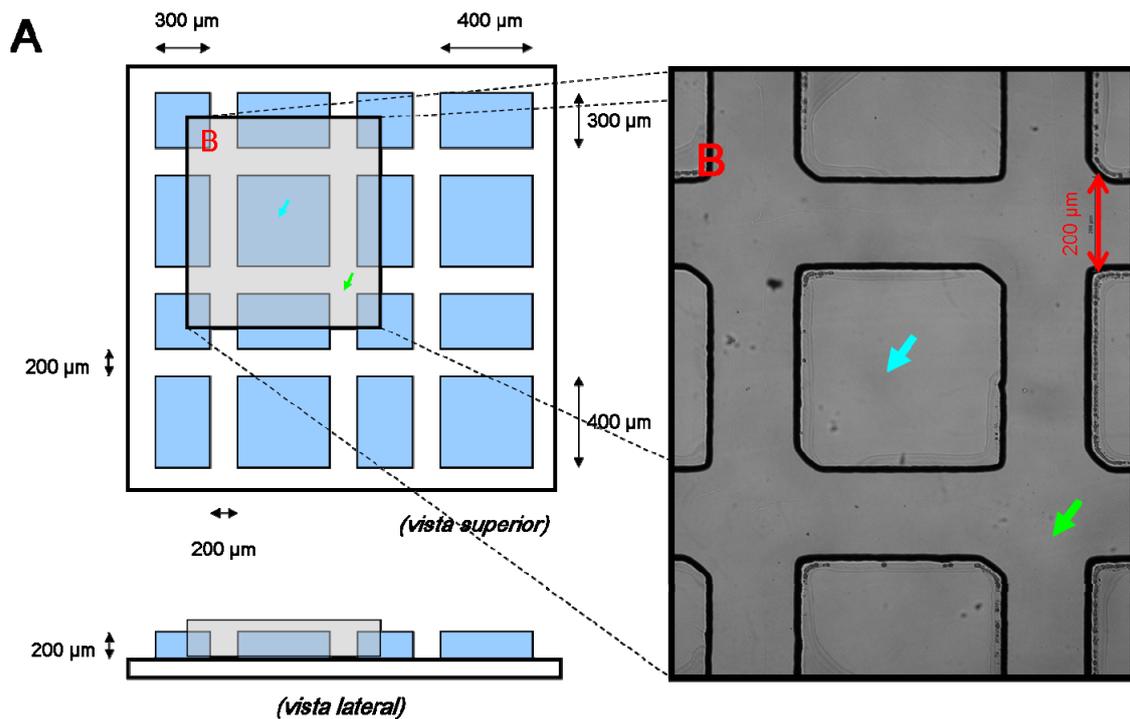


Figura 4.1. Sustrato fotolitografiado. A) Representación esquemática que ilustra las microgeometrías grabadas en la superficie de los cubreobjetos mediante la técnica de fotolitografía, con indicación de las dimensiones tanto de los “picos” (resina SU-8 2100, flecha azul) como de los “valles” (cubreobjetos de vidrio, flecha verde). B) Imagen de una parte del sustrato fotolitografiado tomada con el microscopio óptico (objetivo 10x).

Un problema que se planteó en este punto fue la fragilidad de adhesión de los “picos” de resina a los cubreobjetos de vidrio, ya que provocaba el desplazamiento de los mismos tanto durante el proceso de manipulación de las muestras como durante el cultivo celular (**Figuras 4.2.A y 4.2.B**). Este problema se solucionó atacando los cubreobjetos de vidrio con ácido fluorhídrico de forma previa al proceso de fotolitografiado. El ácido fluorhídrico produce excavaciones en el vidrio (a medida que “lo come”) de manera que se genera una superficie rugosa en el cubreobjetos a la que la resina se adhiere más firmemente. En la **Figura 4.2** se

puede observar la morfología superficial de los cubreobjetos de vidrio sometidos a ataque ácido tanto antes (**Figura 4.2.C**) como después de ser fotolitografiados (**Figura 4.2.D**).

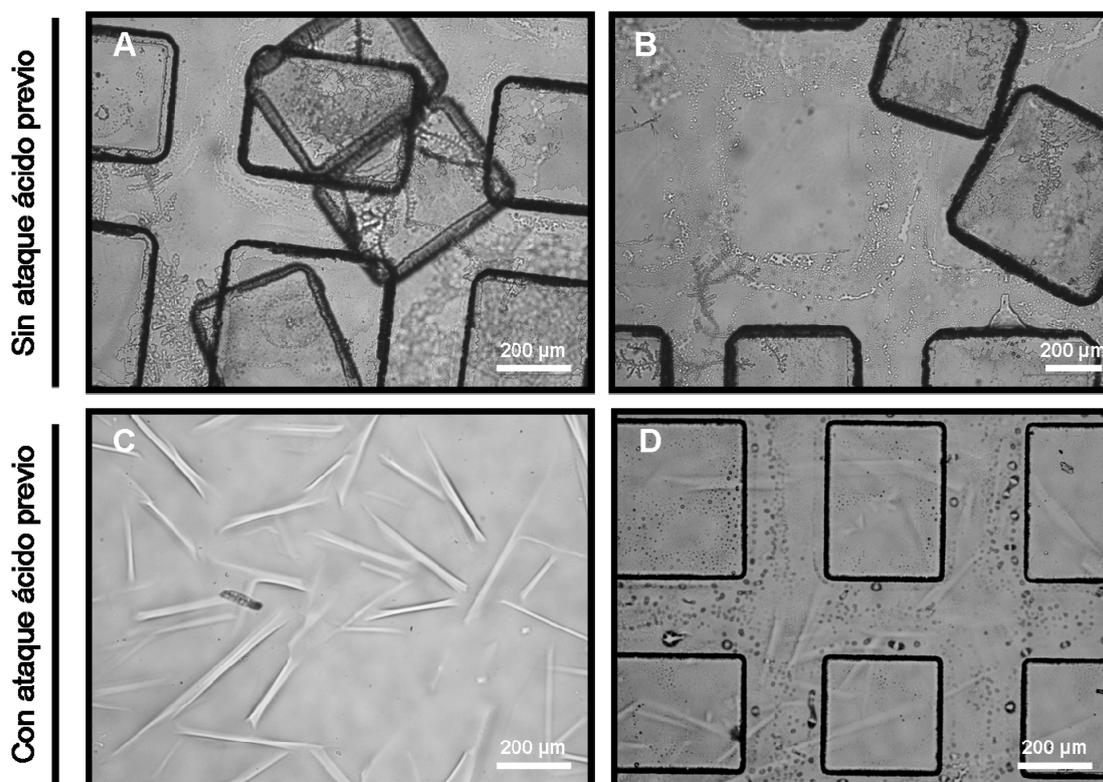


Figura 4.2. Aumento de la adherencia de la resina al sustrato mediante tratamiento previo de los cubreobjetos con ácido fluorhídrico. Sin ataque ácido previo, la resina SU-8 2100 no se adhiere firmemente al cubreobjetos de vidrio por lo que se produce un desplazamiento y superposición de los “picos” (A) durante la manipulación posterior de las muestras, dejando lugares vacíos que rompen con la delimitación y conectividad de los “valles” (B). El ataque ácido previo, aumenta la rugosidad superficial de los cubreobjetos (C) haciendo que la resina se adhiera más firmemente al sustrato y que no haya desplazamiento de “picos” (D). Imágenes tomadas con el microscopio óptico (objetivo 10x).

De esta manera, se obtuvieron cubreobjetos fotolitografiados adecuados para poder depositar en ellos la matriz extracelular neural. Antes de pasar a este apartado, es importante señalar que la resina SU-8 2100 presenta la característica intrínseca de ser autofluorescente al ser excitada tanto con el láser de 450-490 nm (verde) como el láser de 510-560 nm (rojo) (**Figura 4.3**). Es importante tener esto cuenta a la hora de cultivar células en los soportes siempre que el objetivo sea detectar proteínas específicas en las células mediante técnicas inmunofluorescentes, debido a que los fluoróforos utilizados habitualmente en los marcajes inmunoespecíficos presentan las mismas longitudes de onda de excitación-emisión de la resina, lo que dificultará el análisis.

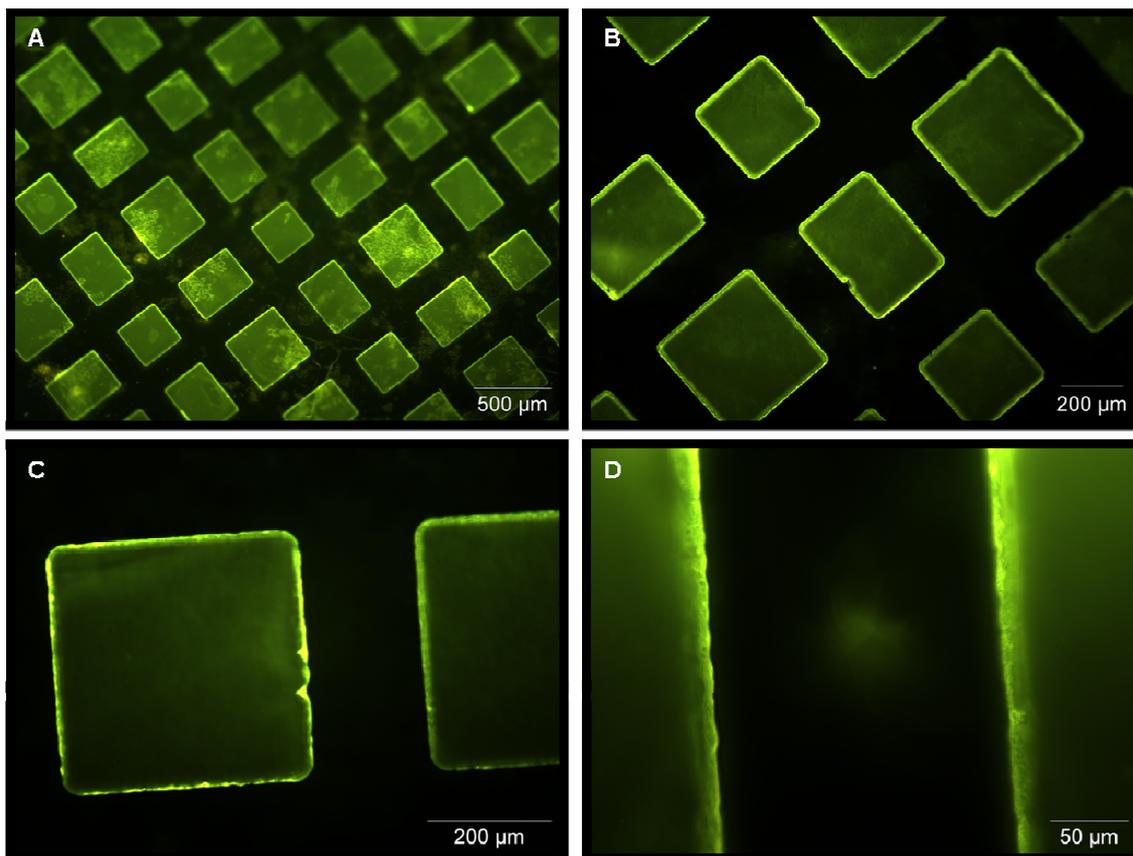


Figura 4.3. Autofluorescencia de la resina SU-8 2100. Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia a 5 (A), 10 (B), 20 (C) y 50 (D) aumentos, respectivamente, al ser excitado el sustrato fotolitografiado con el láser de 450-490 nm de longitud de onda de excitación (verde). Si la excitación se produce con el láser de 510-560 nm de longitud de onda de excitación (rojo), se obtienen los mismos resultados (imágenes no registradas).

4.1.2. Matriz extracelular neural

A pesar de que algunas células se adhieren a superficies de biomateriales no tratados con proteínas de adhesión, la mayoría de los polímeros sintéticos no permiten la adhesión de las células en ausencia de estas moléculas (Yu y col., 2008); por ello, se decidió que la deposición de proteínas específicas -involucradas tanto en la adhesión como en la migración neuronal y en la extensión neurítica- en los “valles” del sustrato fotolitografiado, resultaba fundamental para promover la diferenciación neuronal de las células en los mismos.

Aunque los tratamientos adhesivos más ampliamente utilizados en los cultivos neuronales se realizan con polilisina o con poliornitina, se decidió llevar a cabo un recubrimiento con componentes presentes en la propia matriz extracelular neural (en el caso de los tratamientos anteriores sólo se consiguen depositar grupos funcionales de lisina o de ornitina, no proteínas completas), de forma que se generara una verdadera matriz que simulara en la mayor medida

posible las condiciones con las que las células se encuentran durante el proceso de diferenciación neuronal *in vivo*. Por ello, se decidió combinar ciertas proteínas estructurales con moléculas involucradas tanto en el movimiento y en la orientación celular como en la extensión neurítica. Como se esquematizó en la **Tabla 3.9** del apartado correspondiente a materiales y métodos, los componentes que se utilizaron en la formulación de la matriz extracelular neural de este trabajo son los que se describen a continuación.

El extracto de membrana basal Cultrex[®] es un extracto soluble, purificado a partir de un sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón (Kleinman y col., 1993; Kleinman, 1998), que forma una membrana basal reconstituida (gel) a 37°C. Este extracto presenta una concentración de proteína total de entre 12 y 18 mg/ml; concretamente la utilizada en este trabajo ha sido en todo momento de 13,87 mg/ml. Entre estas proteínas, la laminina es el componente mayoritario pero también están presentes otras proteínas como el colágeno tipo IV, el heparán sulfato, la entactina y otros componentes minoritarios. Además, este extracto presenta bajos niveles de factores de crecimiento; está tratado con cloroformo para prevenir el crecimiento de microorganismos tanto aeróbicos como anaeróbicos, y se presenta en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sin rojo fenol y con 10 µg/ml de gentamicina para evitar el crecimiento tanto de bacterias *Gram-positivas*/*Gram-negativas* como de *Mycoplasma*. Como se comentaba en el apartado 1.2.2.1 de la introducción, distintas variantes de este tipo de membrana basal han sido comercializadas recientemente por otras casas comerciales (por ejemplo, Matrigel[™] de BD Biosciences) y utilizadas por otros grupos de investigación en ensayos epiteliales (Sodunke y col., 2007) y neurales (Dewitt y col., 2009; Uemura y col., 2010).

El ácido hialurónico es un polímero producto de la repetición del disacárido ácido D-glucurónico 1,3-N-acetilglucosamina-β-1,4. Este glucosaminoglicano resulta fundamental para mantener a la matriz extracelular altamente hidratada, por lo que está relacionado con la adhesión y la migración celular; además, desencadena diversas respuestas celulares en las células a través de su interacción con diversas proteínas de unión y receptores de superficie (Turley y col., 2002). Estas respuestas dependen del peso molecular del ácido hialurónico; así, mientras que el ácido hialurónico de alto peso molecular (> 500 kDa) resulta antiangiogénico, antiinflamatorio e inmunosupresor, el ácido hialurónico de bajo peso molecular (10-500 kDa) resulta altamente angiogénico y proinflamatorio. En este trabajo se han utilizado dos tipos de ácido hialurónico, uno de alto (980 kDa) y otro de bajo (31 kDa) peso molecular, ambos obtenidos por fermentación de *Streptococcus pyogenes*. A diferencia de otros glucosaminoglicanos como el condroitín sulfato, el dermatán sulfato o el heparán sulfato, el ácido hialurónico no presenta grupos sulfato y, a excepción de la unión covalente con la cadena

pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina, el ácido hialurónico no se asocia covalentemente a otras proteínas. En el cerebro, las neuronas pueden producirlo, ya que se detecta su presencia mediante microscopía electrónica en el citoplasma y en el núcleo de neuronas cerebrales maduras. Durante el desarrollo del Sistema Nervioso, tiene una función esencial en la proliferación y en la migración de las células neurales.

Las netrinas son unos neuropéptidos relacionados con la laminina que están involucrados con el crecimiento neurítico y la orientación axonal (en su conjunto, con la plasticidad neuronal). Como se indicó en el apartado 1.3.3.3.1 de la introducción, se han identificado como moléculas quimioatrayentes (a diferencia de las semaforinas identificadas como quimiorrepulsivas) derivadas de la línea media embrionaria, que guían a los axones de las neuronas durante el desarrollo embrionario, mediante interacción con receptores específicos como los DCC (**Figura 1.10**). De entre los distintos tipos identificados, las netrinas utilizadas en este trabajo han sido la netrina-G1a (de membrana) y la netrina 4 (secretable). Por un lado, la netrina-G1a se ha obtenido por expresión de la secuencia de ADN codificante para la netrina-G1a de ratón (Met 1-Gly 513) en células Sf21, utilizando un sistema de expresión con baculovirus. Presenta 539 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 70 kDa; en su secuencia se encuentran 18 aminoácidos de secuencia señal, 399 aminoácidos de una región relacionada con la laminina (cadena γ), y 122 aminoácidos de secuencia hidrofóbica para la unión del lípido glicosilfosfatidilinositol (del inglés, *Glycosyl Phosphatidylinositol*, *GPI*). Esta netrina es expresada por células mitrales olfatorias, células del colículo inferior, células del tálamo dorsal y células del núcleo cerebelar profundo y de la oliva inferior. Por otro lado, la netrina-4 se ha obtenido por expresión de la secuencia de ADN codificante para la netrina-4 humana (Met 1-Lys 628) en la línea celular de mieloma de ratón NS0. Presenta 628 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 90 kDa; en su secuencia se encuentran 19 aminoácidos de secuencia señal, 443 aminoácidos de una región relacionada con la laminina (cadena β), y 166 aminoácidos de secuencia de unión a la heparina (rica en aminoácidos básicos). Esta netrina es expresada por células de la placa basal embrionaria, células granulares cerebelares y células piramidales del hipocampo. Además, su expresión está asociada con la membrana basal y es iniciadora del crecimiento axonal en explantes de bulbo olfatorio (Rajasekharan y Kennedy, 2009).

Una vez formulada la composición de la matriz, la pregunta que se planteó fue en qué proporciones mezclar los componentes para conseguir que la matriz extracelular neural generada penetrara por todo el conjunto de “valles” del soporte fotolitografiado, manteniendo una estructura tridimensional adecuada para el cultivo celular. Para ello, y dado que el ácido hialurónico es la molécula que se entrecruza entre los componentes de la membrana basal

confiriendo hidratación (y, por lo tanto, capacidad de expansión y retracción a la matriz), se probó la combinación de la membrana basal con dos tipos de ácido hialurónico, uno de alto y otro de bajo peso molecular (HHMW y HLMW, respectivamente). En estos experimentos se prescindió de las netrinas por no resultar limitantes en el ensayo. Además, se probaron distintas diluciones de la matriz completa, tal y como se indica en la **Figura 4.4**. En todos los casos, la forma de depositar la matriz en el soporte fotolitografiado fue mediante deposición manual en condiciones frías.

Como se puede observar gracias a la tinción inespecífica de las proteínas de la matriz con azul de Coomassie, la matriz sin diluir con HLMW quedó depositada a lo largo de todos los “valles” del sustrato (**Figura 4.4.B**), a diferencia de lo que ocurre con la matriz sin diluir con HHMW, que colapsó en ciertos puntos sin llegar a extenderse uniformemente (**Figura 4.4.A**). Sin embargo, en ninguno de los dos casos se observó la estructura fibrosa esperada para una matriz de este tipo, debido a que, al no estar diluida, no polimeriza adecuadamente. Esta hipótesis fue verificada preparando distintas diluciones de la matriz con PBS, tanto con HHMW como con HLMW. Así, se observó que, al hacer una dilución 1:10 de la mezcla de membrana basal con HHMW, la matriz seguía colapsando debido al HHMW (**Figura 4.4.C**); al hacer una dilución 1:10 de la mezcla de membrana basal con HHMW en combinación con una dilución 1:3 de la mezcla de membrana basal con HLMW, se producía el mismo efecto que en el caso de la matriz sin diluir sólo con HHMW, debido nuevamente al efecto del HHMW (**Figura 4.4.D**); y que, sólo al hacer una dilución 1:3 de membrana basal con HLMW, la matriz presentaba una estructura fibrosa adecuada y homogénea a lo largo de todos los “valles” del sustrato fotolitografiado (**Figura 4.4.E**). Por todo ello, se seleccionó el HLMW como molécula que confiriera hidratación a la matriz sin afectar a su polimerización, y la dilución 1:3 de la mezcla completa como dilución que permitiera la adecuada polimerización de la matriz, presentando la estructura fibrosa esperada y penetrando homogéneamente por todo el sustrato fotolitografiado.

Una vez alcanzado el objetivo de desarrollar un soporte fotolitografiado con una matriz extracelular neural depositada en su superficie, se procedió a la caracterización del mismo tanto a nivel nanométrico como micrométrico, tal y como se muestra a continuación.

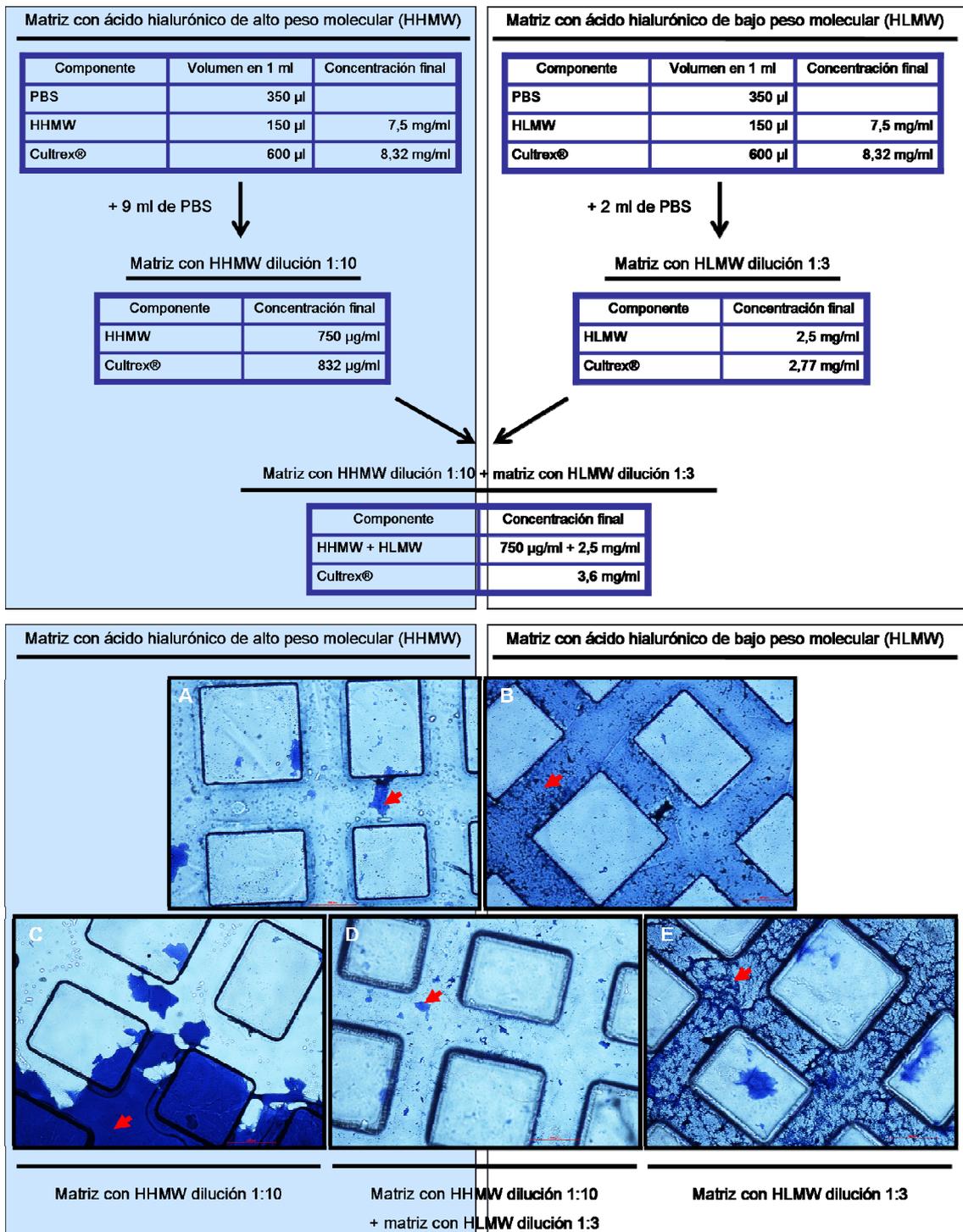


Figura 4.4. Distintas combinaciones de membrana basal y ácido hialurónico para conseguir la polimerización y penetración adecuadas de la matriz en los soportes fotolitografiados. El HHMW impide la correcta polimerización de la matriz, tanto si ésta se encuentra diluida (C, D) como sin diluir (A). El HLMW permite que haya una dispersión de la matriz a lo largo de todos los “valles” del soporte fotolitografiado (B), pero es necesario preparar una dilución 1:3 de las misma para que la matriz presente la estructura fibrosa esperada (E). Las matrices fueron fijadas con una mezcla de etanol-metanol comercial y fueron teñidas con azul de Coomassie para su correcta visualización. Imágenes tomadas con el microscopio óptico (objetivo 10x).

4.1.2.1. Análisis de la morfología nanoestructural de la matriz mediante microscopía de fuerzas atómicas

Con el fin de estudiar la morfología de la matriz a escala nanométrica, algunos sustratos fotolitografiados en los que se había depositado la mezcla diluida 1:3 de membrana basal y HLMW, fueron fijados con una mezcla de etanol-metanol comercial, y, una vez secos, se observaron con el microscopio de fuerzas atómicas. En la **Figura 4.5.A** se puede apreciar el aspecto poroso de la matriz. Las zonas más oscuras corresponden a zonas de menor densidad proteica, mientras que las zonas más claras corresponden a zonas de mayor densidad proteica y, por lo tanto, mayor altura. Entre ambas, se encuentran zonas de tonalidad intermedia correspondientes a zonas de transición, que proporcionan la estructura porosa a la matriz. La rugosidad superficial media (R_{ms}) de la misma es de 125,91 nm. Finalizada la observación de la matriz en condiciones secas, las mismas muestras fueron hidratadas mediante incubación en agua destilada, con el fin de observar la morfología de la matriz en condiciones húmedas. En comparación con la imagen anterior, en la **Figura 4.5.B** se puede apreciar que la matriz se hincha en condiciones húmedas debido a la capacidad de hidratación conferida, principalmente, por el ácido hialurónico. Por ello, la rugosidad superficial media (R_{ms}) de la misma asciende a 235,63 nm.

Una vez terminado el análisis mediante AFM, las muestras fueron conservadas a 4°C tanto en condiciones secas como en condiciones húmedas, observándose la no degradación de las mismas con el paso de los días, lo cual resulta indicativo de su posibilidad de almacenaje en condiciones frías hasta su utilización para cultivo celular.

4.1.2.2. Análisis de la morfología microestructural de la matriz mediante microscopía electrónica de barrido y perfilometría

Con el fin de estudiar la morfología microestructural de la matriz, algunos sustratos fotolitografiados en los que se había depositado la mezcla diluida 1:3 de membrana basal y HLMW, fueron fijados con una mezcla de etanol-metanol comercial, teñidos con azul de Coomassie, y recubiertos con una fina capa de oro para la correcta visualización de la estructura de la matriz mediante microscopía electrónica de barrido.

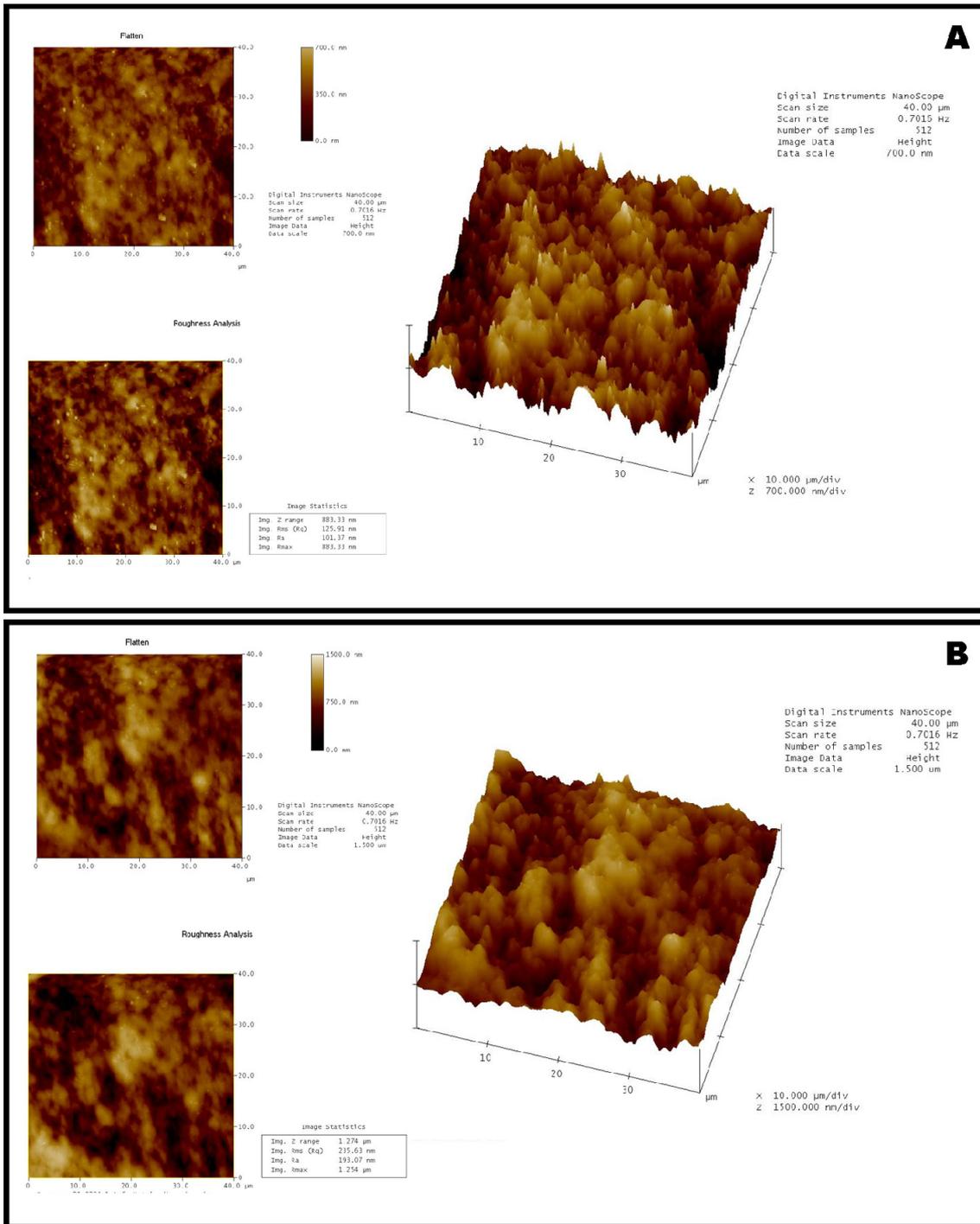


Figura 4.5. Topografía de la matriz de diferenciación neural a escala nanométrica. Una vez fijadas, las muestras fueron analizadas en un microscopio de fuerzas atómicas tanto en condiciones secas (A) como en condiciones húmedas (B). Como era de esperar, la matriz adquiere volumen al hidratarse debido, principalmente, a la presencia de ácido hialurónico en la misma. En ambos casos, se puede apreciar la estructura porosa de la matriz.

En la **Figura 4.6** se puede observar una de las muestras metalizadas con oro antes de ser cargada en el SEM.

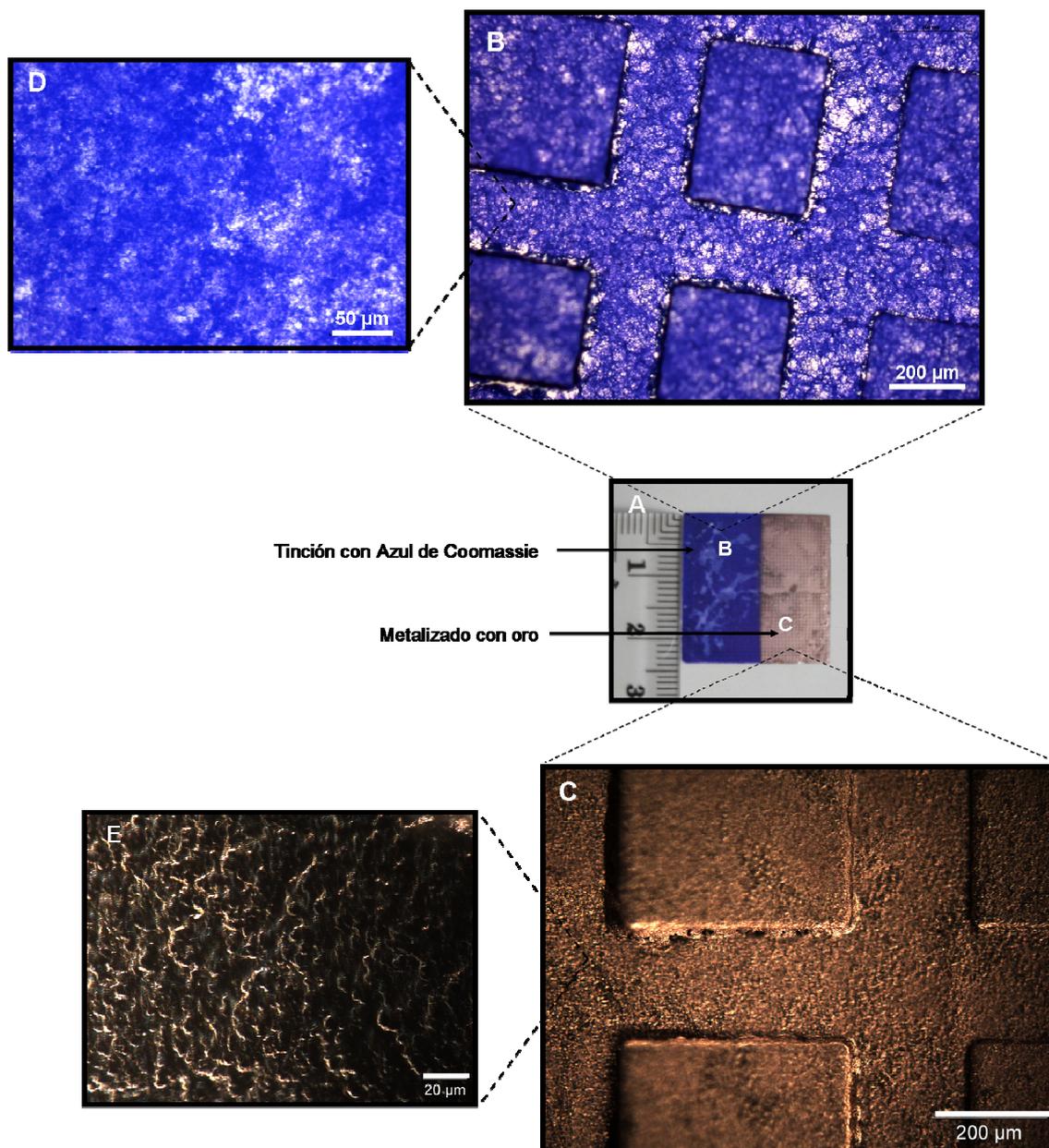


Figura 4.6. Muestras metalizadas para su observación mediante microscopía electrónica de barrido. Por un lado (A), se muestra una imagen del soporte en el que sólo se ha metalizado la mitad de su superficie (C) (la otra mitad presenta la tinción con azul de Coomassie anterior al metalizado, B). Esta parte de la preparación se observa con más detalle gracias al microscopio óptico de campo oscuro (C), donde se aprecia notablemente la estructura fibrosa de la matriz (E) (esta estructura también se observa al teñir con azul de Coomassie pero sin apreciación del relieve, D).

A continuación, la muestra fue cargada en el SEM y se tomaron imágenes de la matriz a distintos aumentos. Como se puede observar en la **Figura 4.7**, la matriz presenta una estructura de red fibrosa -repartida de manera homogénea por los “valles” del cubreobjetos fotolitografiado-, en cuyo interior se aprecian poros de tamaño variable.

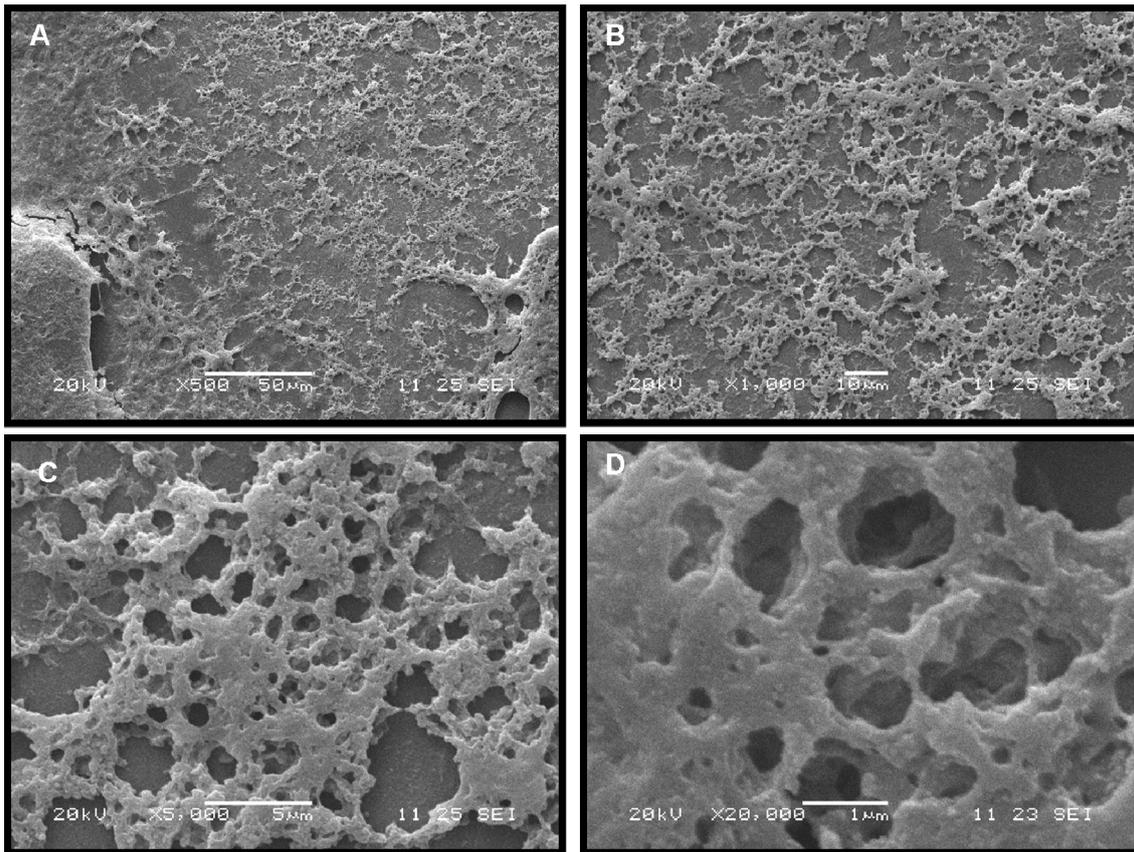


Figura 4.7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la matriz de diferenciación neural. A pocos aumentos (A, 500x), se observa el recubrimiento homogéneo de la matriz por los “valles” del sustrato fotolitografiado; a medida que se sube en aumentos (B, y C; 1.000x y 5.000x), se observa que la matriz presenta una estructura fibrosa en la que se aprecian poros de tamaño variable (observados con detalle a 20.000x, D).

Si se compara la estructura de esta matriz con la estructura de la matriz del cerebro de una rata, se aprecia la existencia de una notable homología estructural entre ambas, presentándose en ambos casos poros de tamaño variable (**Figura 4.8**).

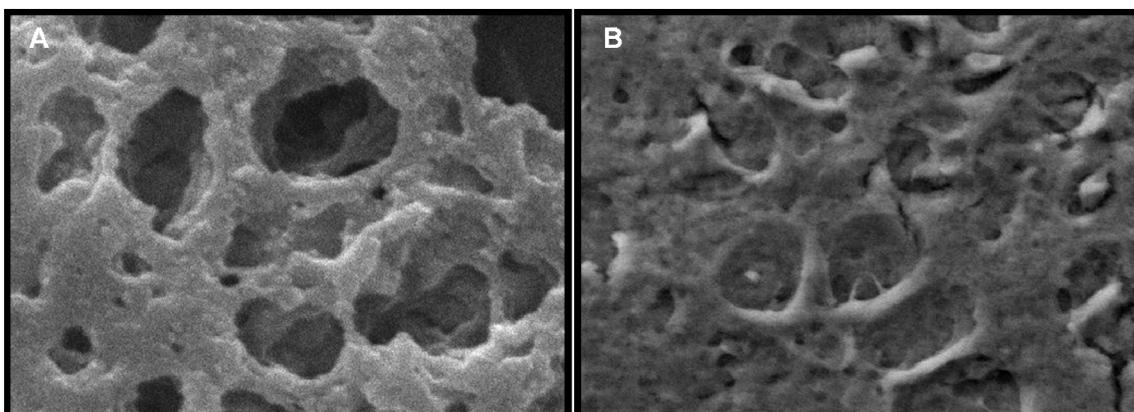


Figura 4.8. Imágenes comparativas de microscopía electrónica de barrido entre la matriz en estudio (A) y un fragmento de cerebro de rata (B).

Otro aspecto importante fue determinar el grosor que presentaba la capa de matriz al ser depositada manualmente sobre el sustrato, así como la reproducibilidad de la técnica. Para ello, se prepararon varios cubreobjetos con la mezcla diluida 1:3 de membrana basal y HLMW. Una vez fijadas y secas, se determinó el grosor de 3 muestras independientes con ayuda de un perfilómetro, obteniéndose un grosor medio de 817 nm, con una desviación estándar de 122 nm (**Figura 4.9.A**). Con estos datos se puede afirmar que se consigue depositar la matriz sobre los sustratos con un grosor relativamente constante. Además, se prepararon otros cubreobjetos en los que se hizo una doble deposición de matriz, es decir, primero se depositó una capa de matriz diluida 1:3 y, una vez polimerizada y seca, se depositó otra capa de matriz diluida 1:3 en las mismas condiciones. Como en el caso anterior, se determinó el grosor de cada matriz doble de 3 muestras independientes con ayuda de un perfilómetro, obteniéndose un grosor medio de 2453 nm con una desviación estándar de 677 nm (**Figura 4.9.B**). Teniendo en cuenta el grosor medio anterior, estos resultados indican que el grosor de la segunda capa depositada no varía sustancialmente a la primera, volviendo a corroborarse el hecho de que la deposición y polimerización de la matriz resulta repetitiva y estandarizable a pesar de que sea depositada sobre otra capa de matriz preexistente en lugar de sobre vidrio.

En base a estos resultados, se puede afirmar que es posible realizar una matriz extracelular neural “multicapa”; en el caso analizado, todas las capas presentan la misma composición basal (membrana basal, HLMW y netrinas) pero se podría pensar en preparar distintas capas con moléculas inductoras específicas que cumplieran una función determinada en un momento concreto del proceso de diferenciación. Por ejemplo, se podría pensar en preparar una matriz extracelular “multicapa” en la que la última capa depositada (pero que sería la que las células encontrarían en primer lugar) tuviera NGF y BDNF, mientras que la primera capa depositada (pero que sería la que las células encontrarían en último lugar) tuviera NGF, BDNF, Shh y FGF8. De esta manera, y pensando en el protocolo de diferenciación dopaminérgica utilizado en este trabajo y que se describirá más adelante, las células se podrían encontrar de una manera progresiva con ciertas moléculas implicadas en su proceso diferenciador, a medida que se van diferenciando y van degradando la matriz extracelular. Esta situación sería muy similar a lo que ocurre en un tejido *in vivo*.

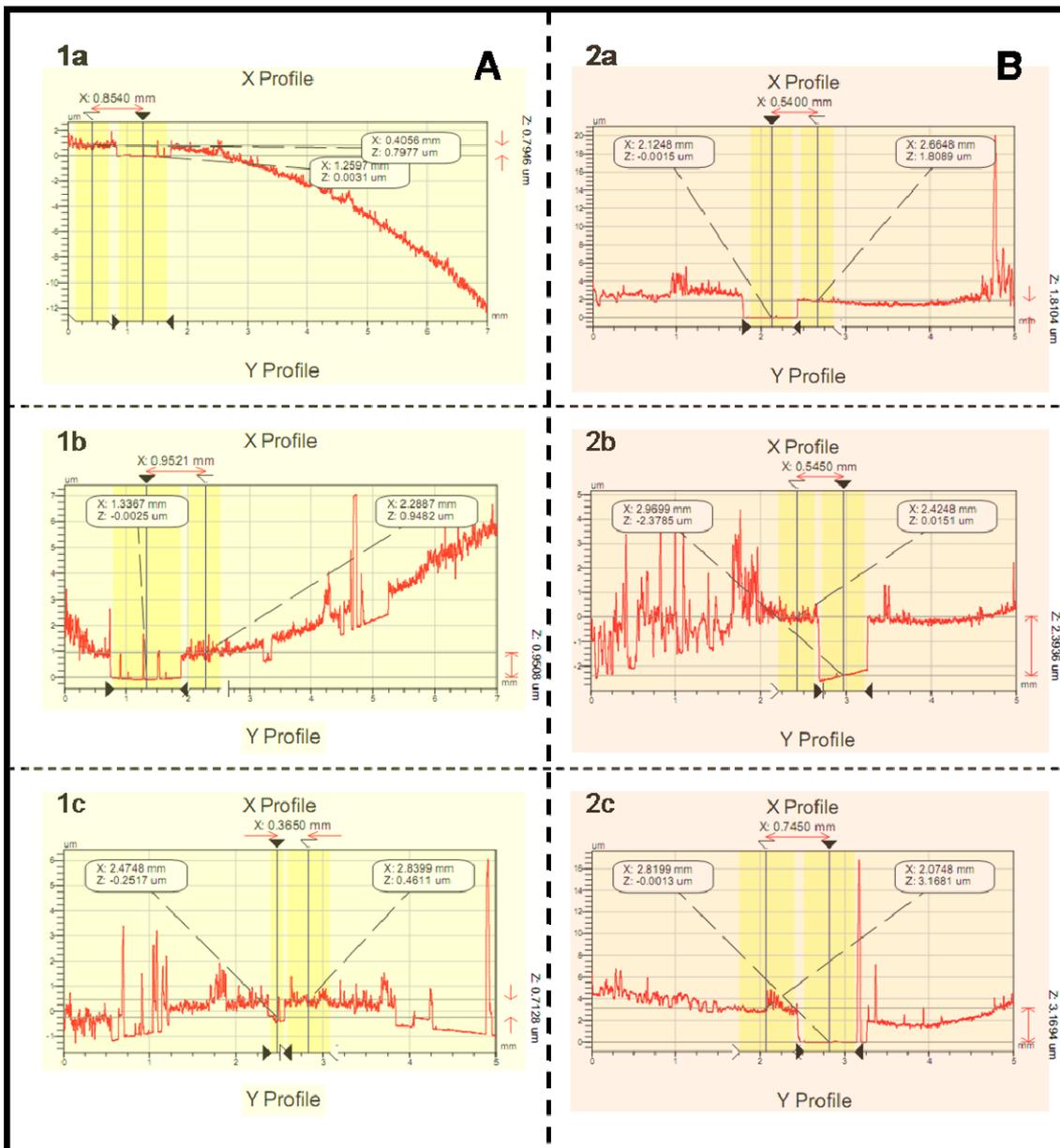


Figura 4.9. Análisis perfilométrico de la matriz de diferenciación neural. Por un lado (A), se analizaron 3 muestras independientes en las que se había depositado una sola capa de matriz, mientras que, por otro lado (B), se analizaron 3 muestras independientes en las que se habían depositado, secuencialmente, dos capas de matriz (matriz “multicapa”).

4.1.2.3. Determinación de la cantidad de proteína total liberada de la matriz mediante ensayo colorimétrico de Bradford

Para poder determinar si la cantidad de proteína total que se libera de la matriz con el tiempo de cultivo permanece constante, se realizó un ensayo colorimétrico de Bradford con los sobrenadantes recogidos tras la incubación de distintas matrices con PBS durante diferentes

tiempos (4, 8, 24 horas y 1 semana), tal y como se indicó en el apartado 3.5.3.4 de materiales y métodos. Este ensayo consiste en el empleo de un colorante hidrofóbico cuya disolución acuosa, en presencia de ácido fosfórico, tiene un color pardo pero que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de las proteínas, vira a un color azul intenso, que se puede medir fácilmente con ayuda de una curva de calibrado empleando una proteína patrón (en este caso BSA).

Como se puede observar en la **Figura 4.10**, durante las primeras 24 horas de incubación se produce una liberación gradual de proteína de la matriz (hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína total en el medio) pero esta liberación se hace de manera constante durante los siguientes días y hasta una semana de cultivo, liberándose una cantidad total de proteína de la matriz que no excede de 350 $\mu\text{g/ml}$ de medio. Este dato indica que la matriz no se encuentra totalmente degradada por lo que soportará el cultivo celular durante más de una semana *in vitro*.

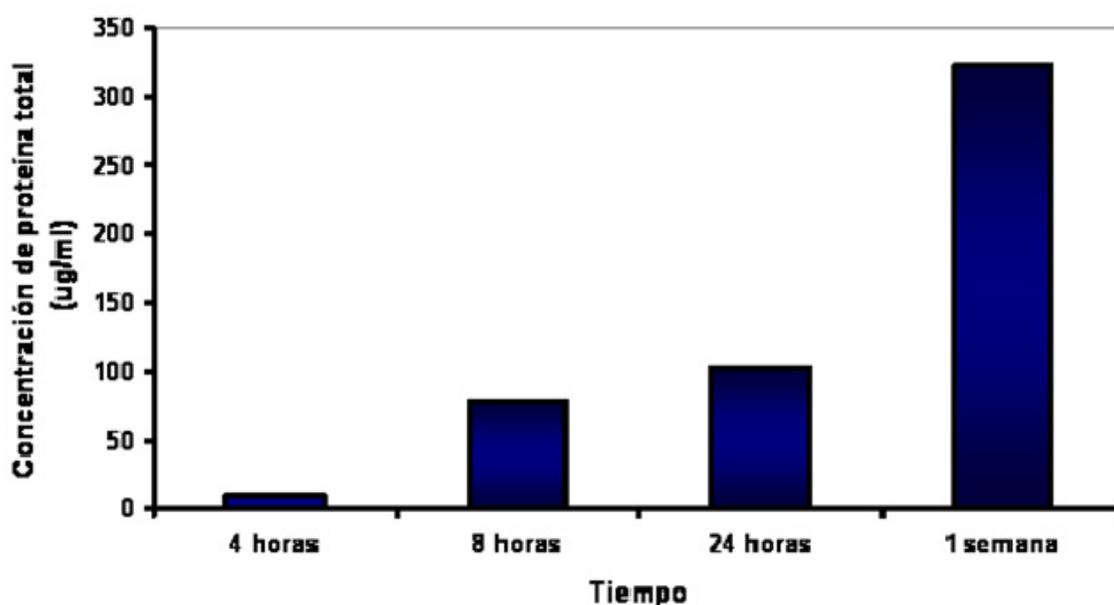


Figura 4.10. Concentración de proteína total liberada de la matriz con respecto al tiempo de incubación.

4.1.2.4. Análisis de la liberación de Shh de la matriz mediante ensayo ELISA

Como se ha indicado en el apartado 3.5.3.5 de los materiales y métodos, la determinación de la cantidad de Shh liberada de la matriz con respecto al tiempo (en función de la concentración utilizada en la elaboración de la matriz) se llevó a cabo mediante ensayo ELISA utilizando el RayBio® Human Shh-N ELISA Kit de RayBiotech Inc. En este caso se utiliza Shh como prototipo de molécula de señalización atrapada en la matriz -porque, como se apuntó en la introducción, es una de las moléculas fundamentales en la inducción de la diferenciación dopaminérgica mesencefálica-, pero los resultados podrían extrapolarse a cualquier otra molécula que fuera incorporada en la composición basal de la misma durante su elaboración.

En la **Figura 4.11**, se muestran los resultados obtenidos para dos conjuntos de muestras:

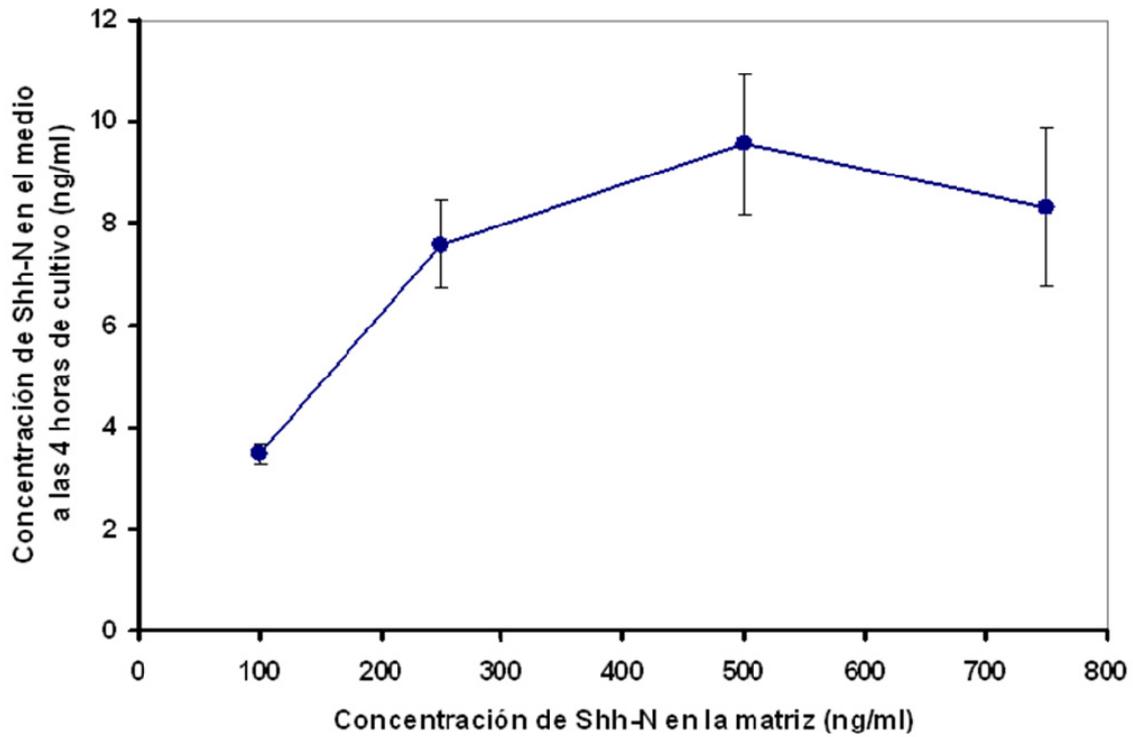
- 1) matrices que contenían distintas concentraciones de Shh en su composición basal (100, 250, 500 y 750 ng/ml) pero que fueron incubadas durante el mismo tiempo (4 horas) con Neurobasal™ A Medium.
- 2) matrices que contenían la misma concentración de Shh (250 ng/ml) pero que fueron incubadas durante diferentes tiempos (½, 2, 4, 8, 24 y 48 horas y 1 semana) con Neurobasal™ A Medium. En este caso, a medida que se recogió todo el volumen de cada medio (500 µl), se repuso el mismo volumen con medio fresco.

Con el primer conjunto de muestras, se obtiene la concentración de Shh liberado al medio a las 4 horas de cultivo en función de la concentración de Shh utilizado en la composición basal de la matriz. Como se aprecia en la **Figura 4.11.A**, la concentración óptima a la que el Shh debe ser incorporado en la matriz para obtener una concentración máxima en el medio en las primeras horas de cultivo se encuentra entre 250 y 500 ng/ml, ya que a concentraciones mayores disminuye la liberación y a concentraciones inferiores la liberación resulta insuficiente.

Con el segundo conjunto de muestras, se obtiene la cinética de liberación de Shh de la matriz con respecto al tiempo de incubación. Como se aprecia en la **Figura 4.11.C**, en las primeras 8 horas de cultivo hay una liberación estable y continuada de Shh de la matriz al medio de cultivo que no supera el 20% del total de Shh de la matriz; a partir de las 8 horas de cultivo la liberación disminuye progresivamente a niveles mínimos (< 5 ng/ml) pero continuados hasta la semana de cultivo.

Con estos datos se demuestra que el *rhShh* queda atrapado en la matriz durante su desarrollo y que éste se libera de forma progresiva al medio de cultivo a medida que la matriz se degrada. Además, con este sistema, la cantidad total de Shh necesario con los días de cultivo será menor que adicionándolo directamente en el medio de cultivo ya que, al encontrarse este factor anclado en un soporte físico y no en disolución, la efectividad del mismo en las células que se cultiven sobre la matriz será mayor debido a una interacción más efectiva con los receptores celulares.

A



B

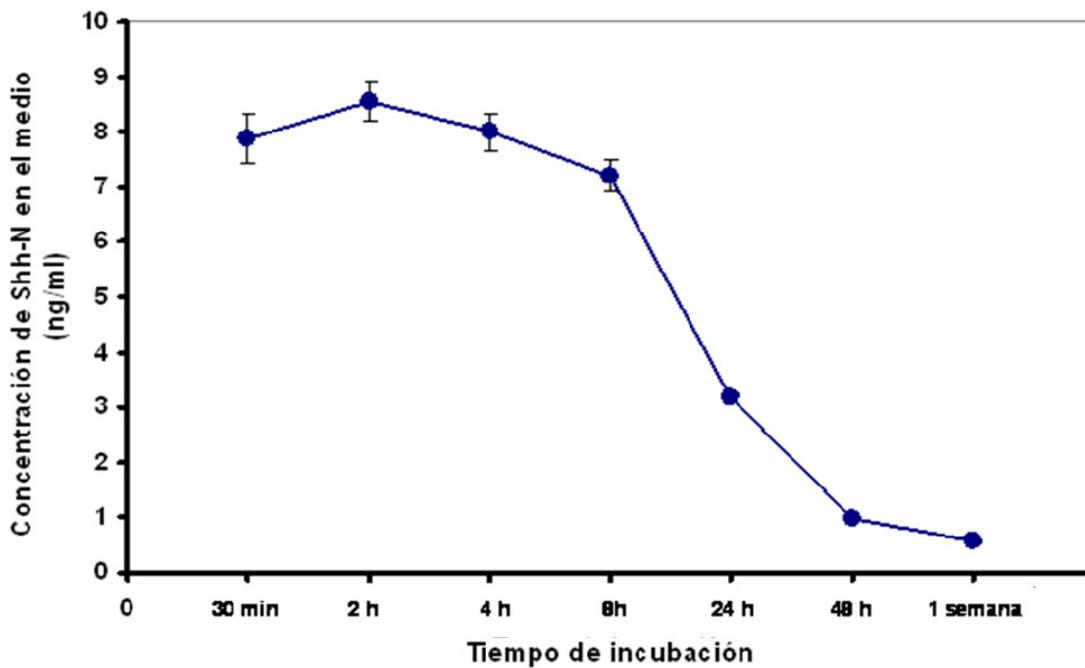


Figura 4.11. Análisis de la liberación de Shh de la matriz mediante ensayo ELISA. A) Concentración de Shh liberado al medio a las 4 horas de cultivo en función de la concentración del mismo incorporado en la composición basal de la matriz. B) Concentración efectiva de Shh en el medio con respecto al tiempo de cultivo. C) Cinética de liberación de Shh de la matriz al medio con respecto al tiempo de cultivo.

4.2. VALIDACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA EN EL SOPORTE DESARROLLADO CON LA LÍNEA CELULAR PC12

Una vez alcanzado el primer objetivo de este trabajo, y con el fin de determinar tanto la biocompatibilidad como la capacidad de diferenciación neuronal dirigida del soporte desarrollado, se realizaron cultivos de células PC12 sobre distintas variaciones del soporte durante 7 días *in vitro* (DIV). En cualquier caso, el medio de diferenciación utilizado carecía del factor inductor de la diferenciación NGF β para observar si, realmente, la diferenciación era debida a la matriz y no a la potenciación de la misma por parte del NGF β .

4.2.1. Observación de la formación de redes pseudo-neuronales mediante tinciones y técnicas microscópicas

En primer lugar, se prepararon cubreobjetos fotolitografiados en los que no se depositó matriz. Estas muestras se prepararon con el objetivo de observar únicamente la influencia de las microgeometrías de superficie en la diferenciación de las células PC12. Como se puede observar en el **Figura 4.12.A**, en ausencia de la matriz, el cubreobjetos fotolitografiado no resulta tóxico para las células ya que éstas se depositan de forma adecuada en el mismo, pero lo hacen tanto a nivel de “picos” como de “valles” y sin una organización concreta.

En segundo lugar, se prepararon cubreobjetos sin fotolitografiar en los que se depositó manualmente matriz completa (membrana basal, HLMW y netrinas) diluida 1:3. Estas muestras se prepararon con el objetivo de observar únicamente la biocompatibilidad e influencia de la matriz en la diferenciación de las células PC12. Como se puede observar en el **Figura 4.12.B**, la matriz por sí sola (en ausencia de NGF β) induce la diferenciación terminal de las células PC12 en fenotipos morfológicamente neuronales (pseudo-neuronas), pero, al no haber microgeometrías de superficie capaces de actuar como guías, las células se disponen de una manera desordenada y, en algunos casos, poco “productiva”, ya que no establecen conexiones entre ellas.

En tercer y último lugar, se prepararon cubreobjetos fotolitografiados en los que se depositó manualmente matriz completa diluida 1:3. Una vez depositada y polimerizada, estas muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C con medio de mantenimiento de PC12, con el fin de eliminar el exceso de matriz que no hubiera penetrado en los “valles” del sustrato

fotolitografiado. Estas muestras se prepararon con el objetivo de observar tanto la influencia de la matriz como de las microgeometrías de superficie en la diferenciación guiada de las células PC12. Como se puede observar en el **Figura 4.12.C**, las células PC12 se localizan únicamente en los “valles” del sustrato fotolitografiado, que es donde se encuentra depositada la matriz. En ellos, las células se diferencian apropiadamente a células con morfología neuronal y conectadas entre sí, formando una red pseudo-neuronal bastante organizada (**Figura 4.12.C**, 40x). Concretamente, en la **Figura 4.13**, se muestra el grado de desarrollo y orientación alcanzado por una de las redes pseudo-neuronales diferenciada en este último tipo de muestras después de 10 DIV.

Si se observa una de estas redes pseudo-neuronales con el microscopio electrónico de barrido (**Figura 4.14**), se pueden apreciar con mayor detalle las prolongaciones pseudo-neuríticas emitidas por las células PC12, así como los restos de matriz extracelular que quedan en el soporte después de 14 días de diferenciación *in vitro* (**Figura 4.14.B**). Este último dato corrobora la idea de que la matriz tarda más de 14 días en degradarse completamente, tal y como se apuntó al observar la cantidad total de proteína liberada de la matriz después de 10 DIV. Este hecho resulta de vital importancia ya que, teniendo en cuenta que la mayoría de los procesos de diferenciación celulares tardan más de 14 DIV en llevarse a cabo, se necesita una matriz que se degrade progresivamente y, en ningún caso, antes de 14 DIV, ya que es durante su degradación cuando se va a producir la liberación gradual de las moléculas señalizadoras que incorpore (en este caso, netrinas). En la **Figura 4.14.C** se observa con detalle un punto de conexión entre pseudo-neuritas que, posiblemente, coincida con un punto de conexión sináptica entre pseudo-neuronas, lo que indicaría la funcionalidad de la red pseudo-neuronal. Como se mencionó en el apartado 3.5.4.1 de los materiales y métodos, las células PC12 diferenciadas muestran un fenotipo pseudo-neuronal capaz de producir catecolaminas del tipo dopamina y norepinefrina.

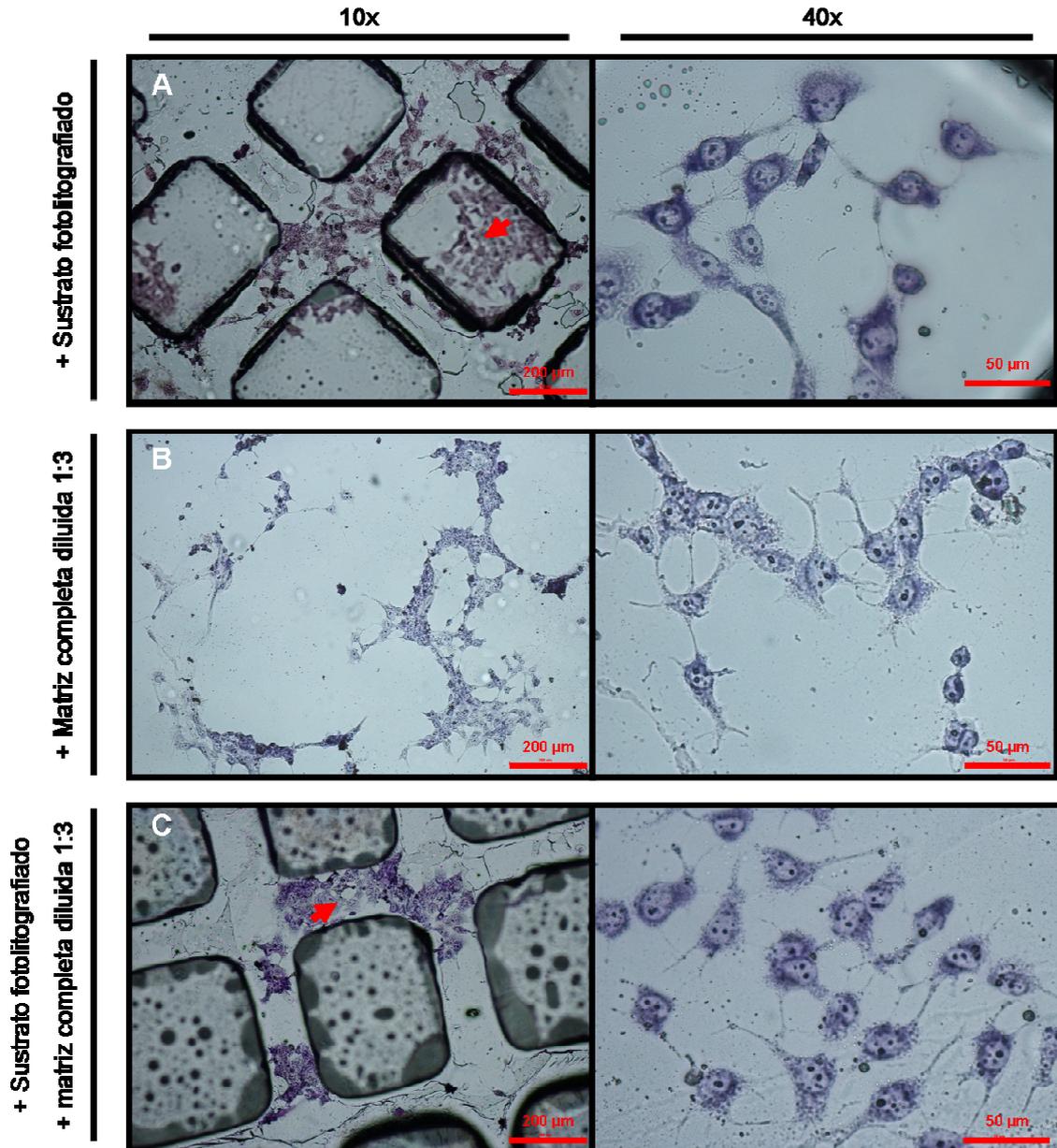


Figura 4.12. Efectos del sustrato fotolitografiado y de la matriz extracelular en la diferenciación de células PC12. En todos los casos se ha utilizado medio de cultivo de PC12 sin NGF β . Las células se visualizan en el microscopio óptico después de 7 DIV gracias a una tinción con eosina-azul de metileno según May-Gründwald.

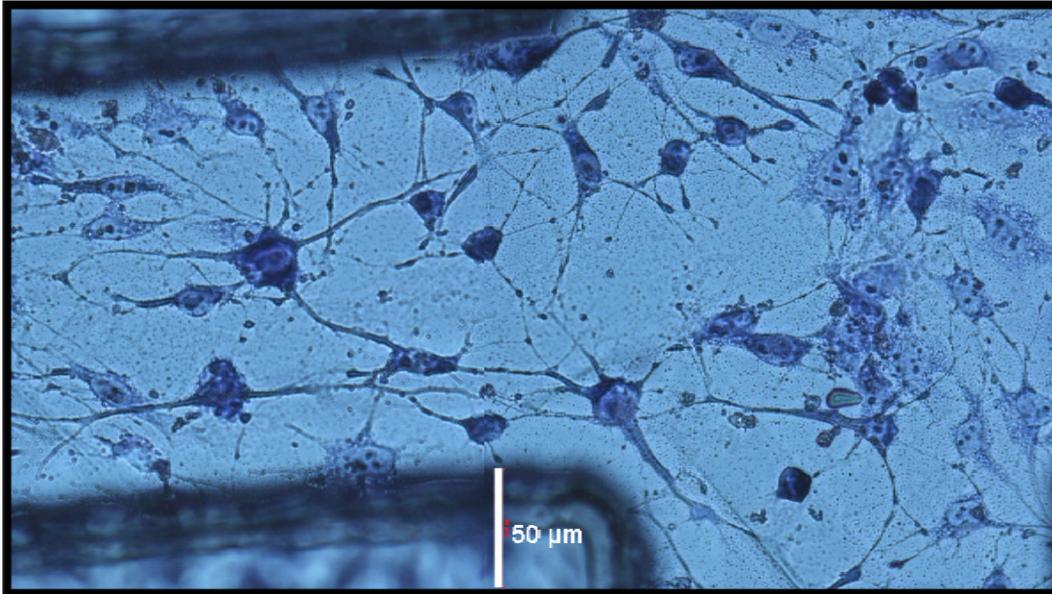


Figura 4.13. Red pseudo-neuronal formada por las células PC12 diferenciadas en un soporte fotolitografiado con matriz extracelular. Las células se visualizan en el microscopio óptico gracias a una tinción con eosina-azul de metileno según May-Gründwald.

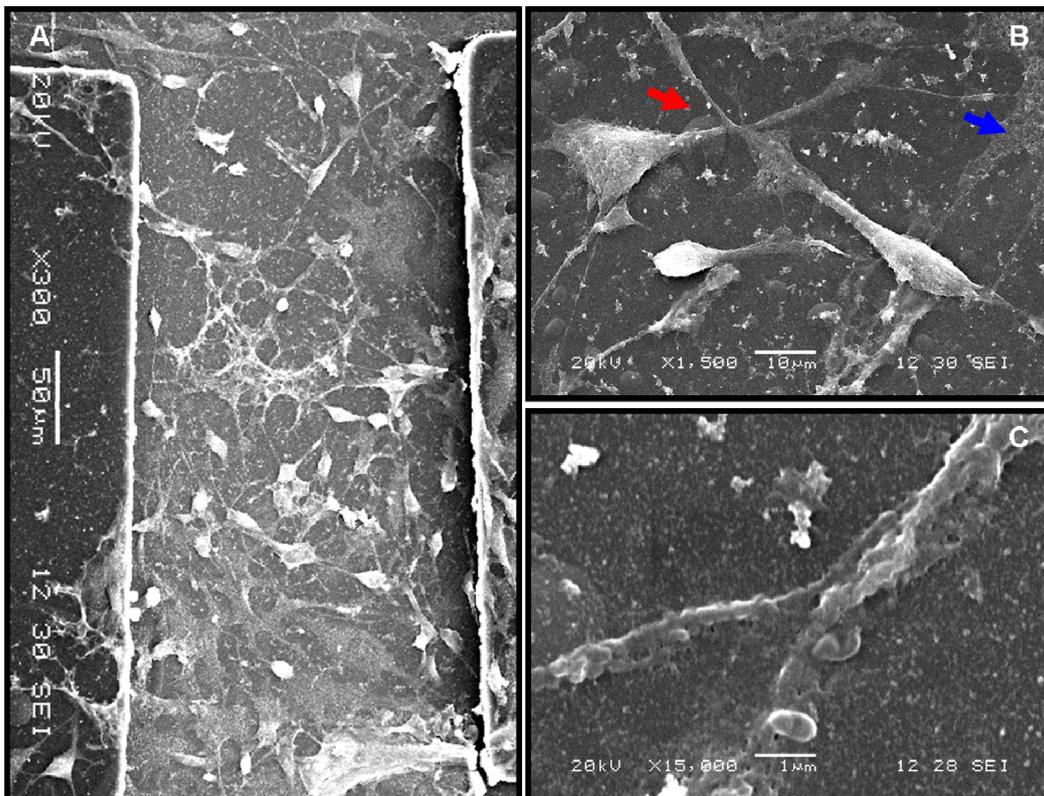


Figura 4.14. Imagen de SEM de la red pseudo-neuronal formada por las células PC12 diferenciadas en un soporte fotolitografiado con matriz extracelular. Además de observarse la red pseudo-neuronal formada después de 14 DIV (A), se aprecia la emisión de pseudo-neuritas por parte de las células PC12 diferenciadas (B, flecha roja), así como la conexión entre ellas (C). Nótese la presencia de restos de matriz extracelular neural en la preparación (B, flecha azul) después de 14 DIV.

4.2.2. Determinación de la concentración celular necesaria para obtener una diferenciación neuronal óptima

Una vez observado que el soporte fotolitografiado con matriz favorece la diferenciación guiada de las células PC12, otra cuestión importante a resolver era la concentración celular a la que había que cultivar las células para alcanzar una diferenciación óptima, tanto respecto al número de pseudo-neuronas diferenciadas que participan en redes pseudo-neuronales como respecto a número de conexiones pseudo-neuríticas entre ellas.

Para ello, se sembraron distintas concentraciones de células PC12 en los soportes completos (fotolitografía y matriz). Después de 10 DIV, las preparaciones se tiñeron con proteinato de plata (tinción de Bodian modificada) para la observación detallada de las prolongaciones pseudo-neuríticas. La cuantificación tanto del número total de pseudo-neuronas, como de pseudo-neuritas por pseudo-neurona y de pseudo-neuritas conectadas por pseudo-neurona en cada concentración, se realizó tomando 10 imágenes representativas de tres preparaciones independientes de cada concentración (**Figura 4.16**).

En todos los casos, se utilizó medio de cultivo de PC12 suplementado con 50 ng/ml de NGF β . La razón de añadir NGF β al medio de cultivo, a pesar de haberse comprobado que la matriz por sí sola induce la diferenciación de las células PC12, es que, en un experimento adicional de diferenciación de PC12 sobre el soporte sin y con NGF β en la que se partía de la misma concentración celular, se pudo comprobar que el NGF β reforzaba el efecto diferenciador de la matriz, como era de esperar (**Figura 4.15**).

Como se puede deducir del análisis morfológico de las preparaciones (**Figura 4.16**), concentraciones celulares inferiores a 40.000 células/ml resultan deficientes en la formación de una red pseudo-neuronal apropiada, mientras que concentraciones celulares superiores a 80.000 células/ml resultan demasiado elevadas ya que se observa sobrecrecimiento celular después de 10 DIV. Con estos datos se puede pensar que la concentración celular óptima se encuentra entre 40.000 y 80.000 células/ml. Esta hipótesis se confirma haciendo un promedio del número de pseudo-neuronas por campo de las preparaciones correspondientes a cada concentración celular. Como se puede observar en la **Figura 4.17.A**, la concentración óptima para obtener el número máximo de pseudo-neuronas por campo se encuentra entre las 40.000 y las 80.000 células/ml.

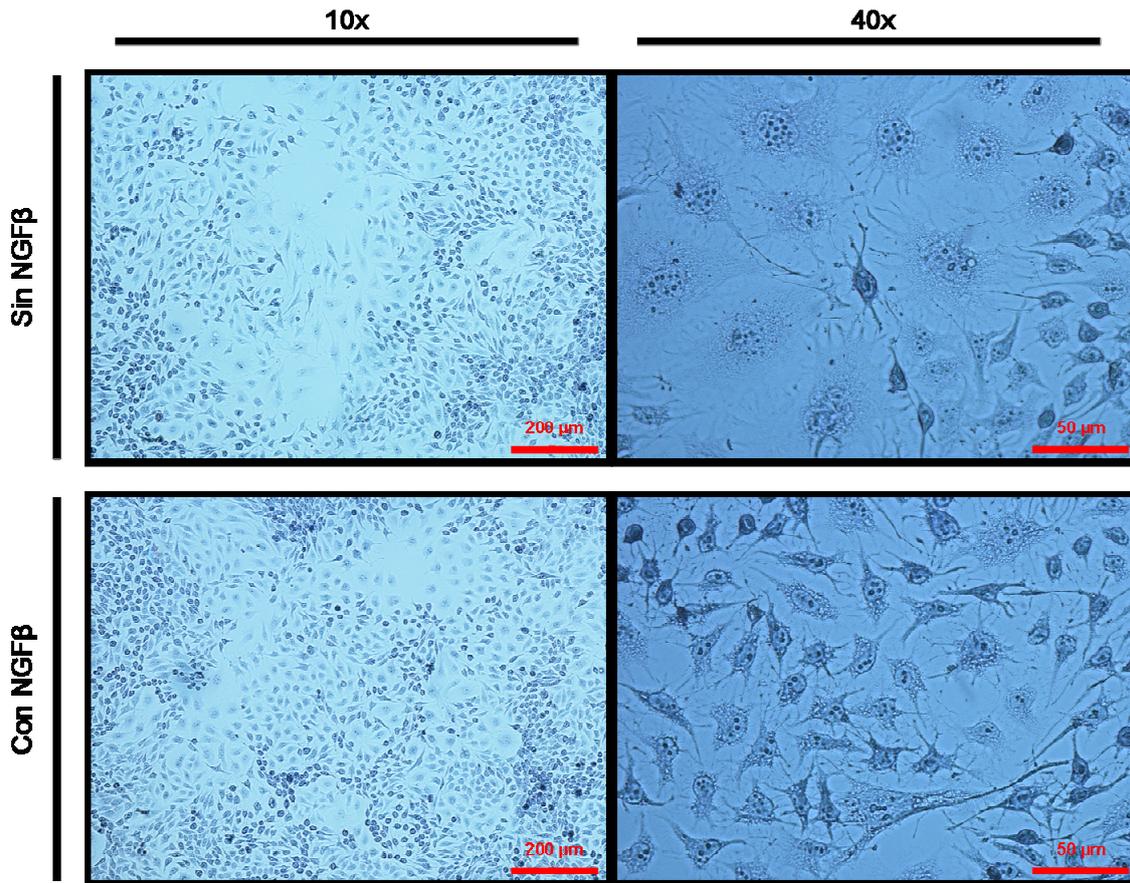


Figura 4.15. Diferenciación de células PC12 sobre el soporte desarrollado en medio de cultivo sin (A) y con (B) NGF β . Como cabía esperar, NGF β refuerza el efecto diferenciador de la matriz. Las pseudo-neuronas se visualizan en el microscopio óptico gracias a una tinción con eosina-azul de metileno según May-Gründwald.

Sin embargo, si se tiene en cuenta el número promedio de pseudo-neuritas que expresa cada pseudo-neurona en las diferentes concentraciones, se observa que éste número se incrementa a medida que aumenta la concentración de células sembradas hasta alcanzar una fase estable a partir de 40.000 células/ml, a partir de la cual las pseudo-neuronas no presentan más pseudo-neuritas aunque haya más células con las que establecer contactos (**Figura 4.17.B**). Esto se puede deber a que, además de las moléculas de señalización incorporadas en la matriz, las propias células liberan moléculas de señalización que hacen que sus “vecinas” emitan prolongaciones de su citoplasma para establecer contactos con ellas. Sin embargo, un exceso en el número de células hace que éstas se encuentren demasiado próximas y que haya una inhibición por simple contacto (habitual en cualquier cultivo celular sobrecrecido).

Esta hipótesis se corrobora al observar el número promedio de pseudo-neuritas conectadas por pseudo-neurona en cada concentración. En este caso, se vuelve a observar un aumento creciente en función de la concentración con un pico máximo en torno a las 40.000 células/ml (Figura 4.17.C).

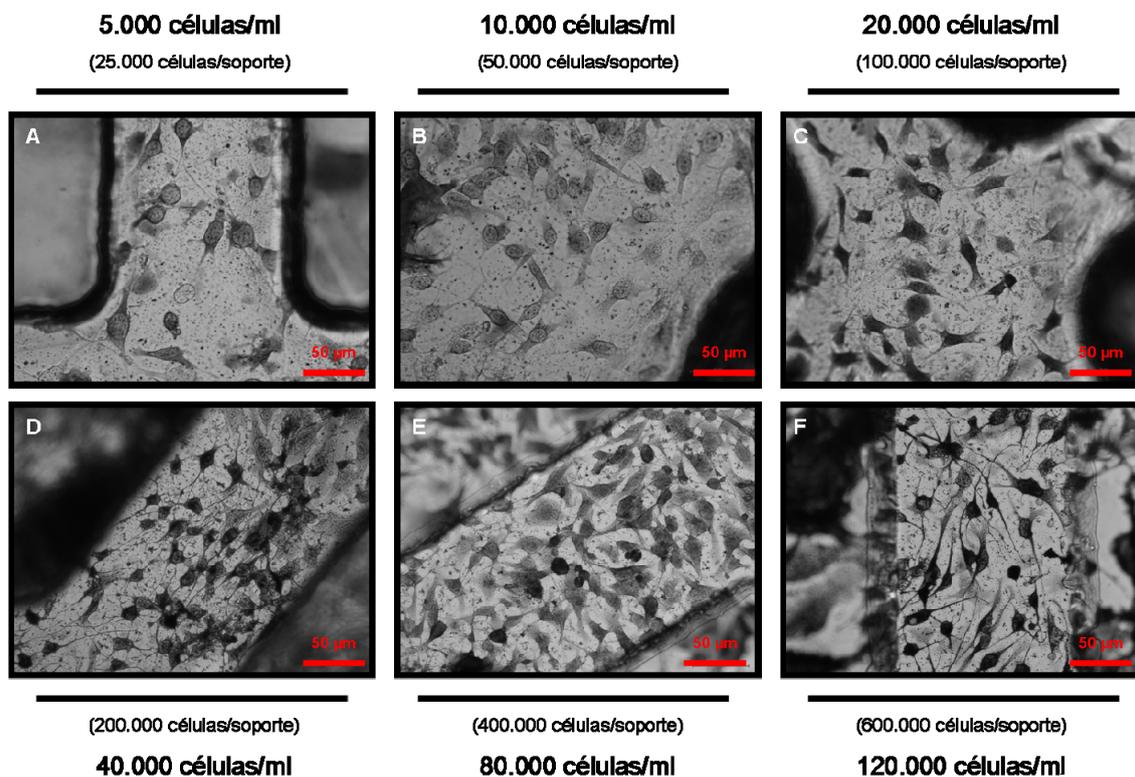
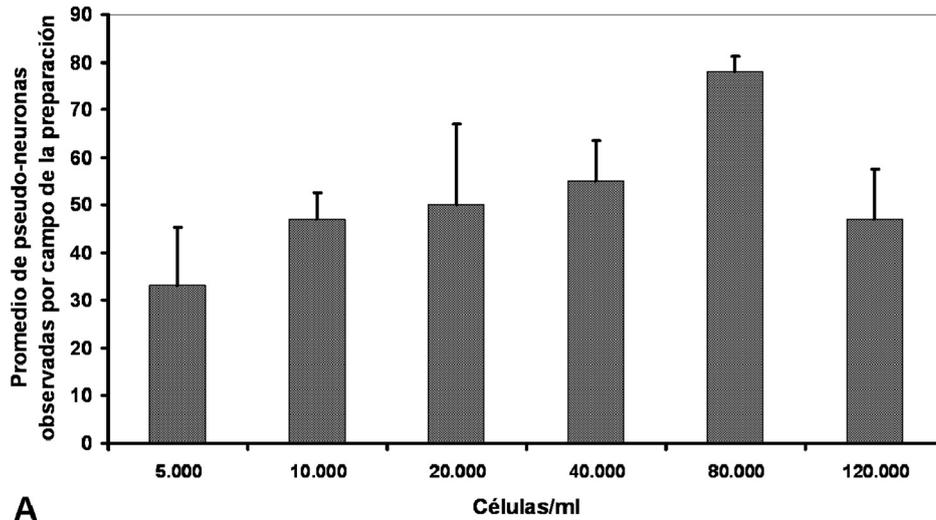
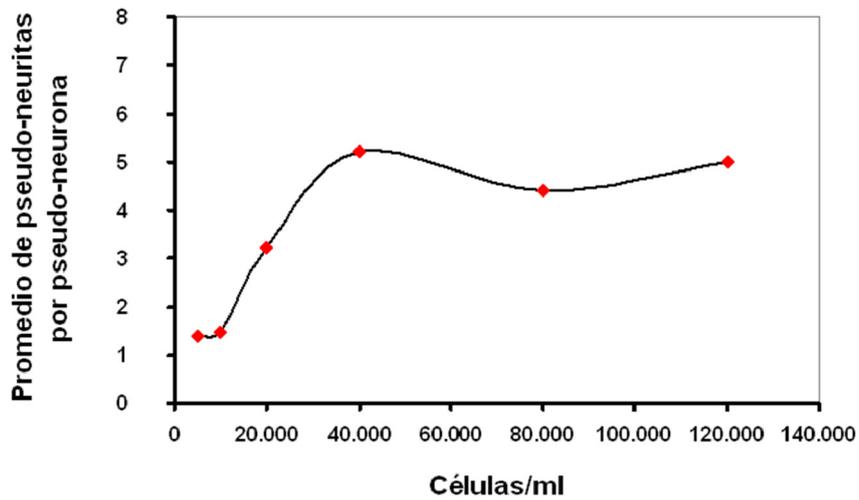


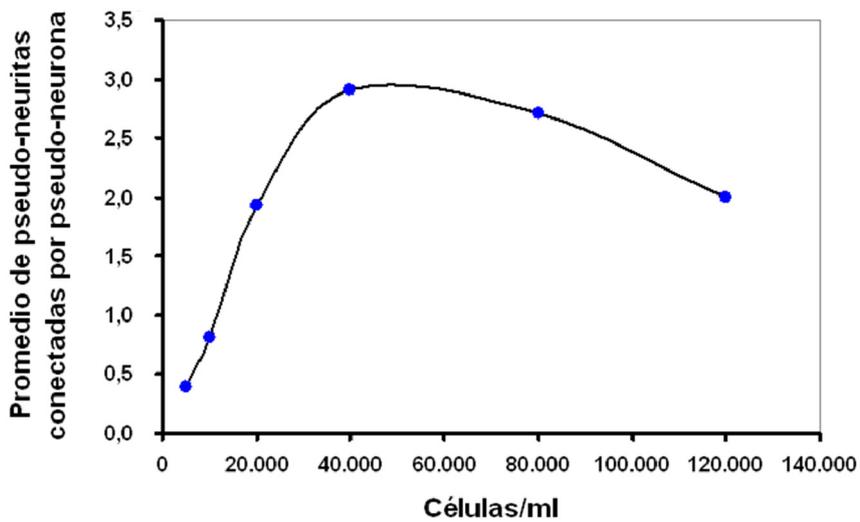
Figura 4.16. Diferenciación de células PC12 sobre el soporte desarrollado a diferentes concentraciones. Las pseudo-neuronas se visualizan en el microscopio óptico gracias a una tinción específica con proteinato de plata (tinción de Bodian modificada). Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.



A



B



C

Figura 4.17. Determinación de la concentración celular necesaria para llevar a cabo una diferenciación óptima de las células PC12 sobre el soporte desarrollado. Esta determinación se realiza en función tanto del número de pseudo-neuronas diferenciadas que participan en redes pseudo-neuronales como del número de conexiones pseudo-neuríticas entre ellas.

4.2.3. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y dopaminérgica mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal

Un último punto importante con las células PC12, fue verificar el grado de diferenciación neuronal alcanzado sobre el soporte desarrollado, es decir, verificar que se conseguía una expresión del fenotipo pseudo-neuronal dopaminérgico por parte de estas células al ser diferenciadas *in vitro*.

Para ello, se realizó un marcaje inmuno-específico contra la proteína NFL y la proteína TH, respectivamente, en células PC12 diferenciadas sobre 3 matrices independientes. Como se ha mostrado en la **Figura 4.3** del presente capítulo, el sustrato fotolitografiado presenta una fluorescencia intrínseca que impide utilizarlo en preparaciones donde, *a posteriori*, se pretende visualizar el resultado de una inmunofluorescencia específica. Por ello, todos los sustratos utilizados para este fin fueron cubreobjetos en los que sí hubo deposición de la matriz completa diluida 1:3 pero en los que no hubo proceso de fotolitografiado previo.

Como se puede observar en la **Figura 4.18**, las células PC12 diferenciadas sobre la matriz expresan tanto el marcador neuronal NFL ($95,7\% \pm 4,2$) como el marcador dopaminérgico TH ($84,4\% \pm 7,5$) después de 7 DIV (**Tabla 4.1**). La proteína NFL es una proteína del citoesqueleto específica de células neuronales. Por su parte, la proteína TH juega un papel muy importante en la fisiología de las células adrenérgicas, ya que es el enzima que limita la biosíntesis de las catecolaminas (dopamina y norepinefrina) a partir de tirosina. Por ello, las dos proteínas de forma conjunta se utilizan como marcadores de neuronas dopaminérgicas (en este caso pseudo-neuronas dopaminérgicas).

Marcaje a los 7 DIV	% de células positivas
NFL	$95,7\% \pm 4,2$
TH	$84,4\% \pm 7,5$

Tabla 4.1. Porcentaje de células PC12 positivas para NFL y TH después de 7 DIV. A los 7 DIV todavía no se ha producido el 100% de la inducción dopaminérgica de las células PC12.

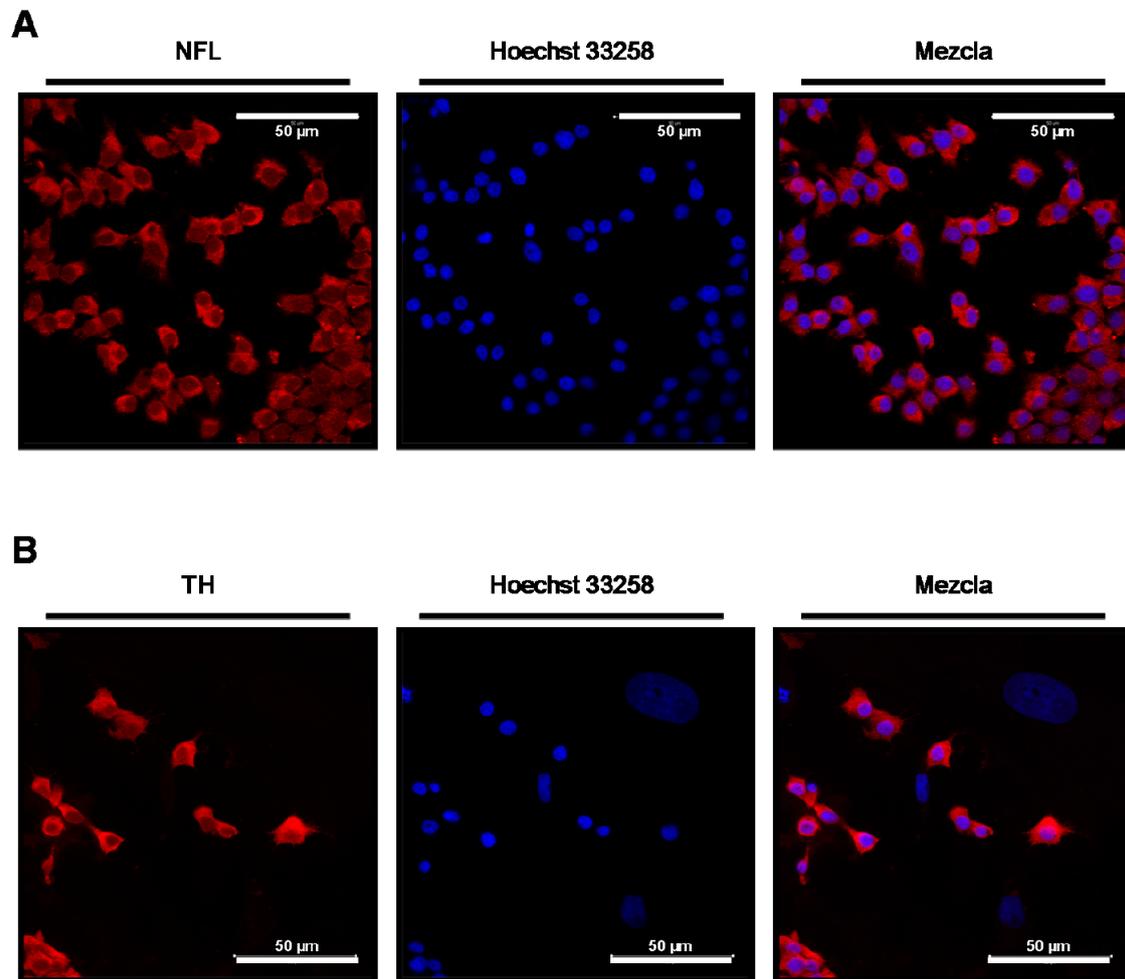


Figura 4.18. Expresión de NFL y TH por células PC12 diferenciadas sobre la matriz después de 7 DIV. La expresión de ambas proteínas intracelulares se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra NFL y TH, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 546 (rojo). Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

4.3. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS DE HIPOCAMPO DE RATA EMBRIONARIA (E18)

Una vez establecida la biocompatibilidad y la potencialidad de diferenciación del soporte desarrollado con la línea celular establecida PC12, la siguiente pregunta que se planteó fue si las células primarias neuronales presentarían el mismo tipo de respuesta.

Para resolver esta cuestión, se decidió comprobar la diferenciación neuronal alcanzada al cultivar células de hipocampo de rata embrionaria (E18) sobre la matriz desarrollada, obviando en este apartado el sustrato fotolitografiado (partiendo de la base de que es la matriz la parte del soporte responsable del grado de diferenciación alcanzado, y el sustrato fotolitografiado la parte del soporte responsable de la ordenación de la red neuronal formada).

Las células de hipocampo de rata embrionaria (E18) fueron aisladas de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.5.4.2.1 de los materiales y métodos y, a continuación, fueron cultivadas durante 8 DIV sobre la matriz con el medio de diferenciación correspondiente -descrito en el apartado 3.3.6 de los materiales y métodos-.

Es necesario recordar en este punto que esta matriz presenta en su composición un proteoglicano adicional, el condroitín 4-sulfato. El motivo por el que se añadió el condroitín 4-sulfato a la composición basal de la matriz deriva del carácter colaborativo en el que se enmarca este apartado del presente trabajo de investigación. El grupo del Dr. Antonio García García, del Departamento de Farmacología del Instituto Teófilo Hernando de la Universidad Autónoma de Madrid, se encuentra trabajando en el papel neuroprotector que puede ejercer el condroitín 4-sulfato y sus correspondientes dímeros en el Sistema Nervioso. La matriz desarrollada resulta muy útil en estudios de neuroprotección *in vitro* ya que, como ha sido el caso, permite la incorporación del compuesto en estudio en su composición basal. Por lo tanto, en estos experimentos se prepararon matrices con condroitín 4-sulfato en su composición basal a diferentes concentraciones (CS 10: 0,5 mg/ml; CS 100: 5 mg/ml; No CS: 0 mg/ml).

Después de mantener las células de hipocampo durante 8 DIV en las diferentes matrices, éstas fueron sometidas durante 7 días a tratamiento con distintos compuestos citotóxicos (glutamato, rotenona/oligomicina A, β -amiloide y veratridina) y, posteriormente, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante la técnica de MTT. Como se puede observar en la **Figura 4.19**, en ausencia de agente tóxico, la presencia de condroitín 4-sulfato en la matriz hace disminuir la viabilidad de las células de hipocampo de rata embrionaria, siendo ésta significativa en el caso de encontrarse el condroitín 4-sulfato a una concentración de 5 mg/ml (CS100).

Sin embargo, en presencia de agente tóxico, el condroitín 4-sulfato ejerce un efecto neuroprotector (significativo en el caso del tratamiento con glutamato) en las mismas, al encontrarse éste en la matriz a una concentración de 5 mg/ml, y no resultando significativo el efecto del mismo a la otra concentración estudiada (0,5 mg/ml).

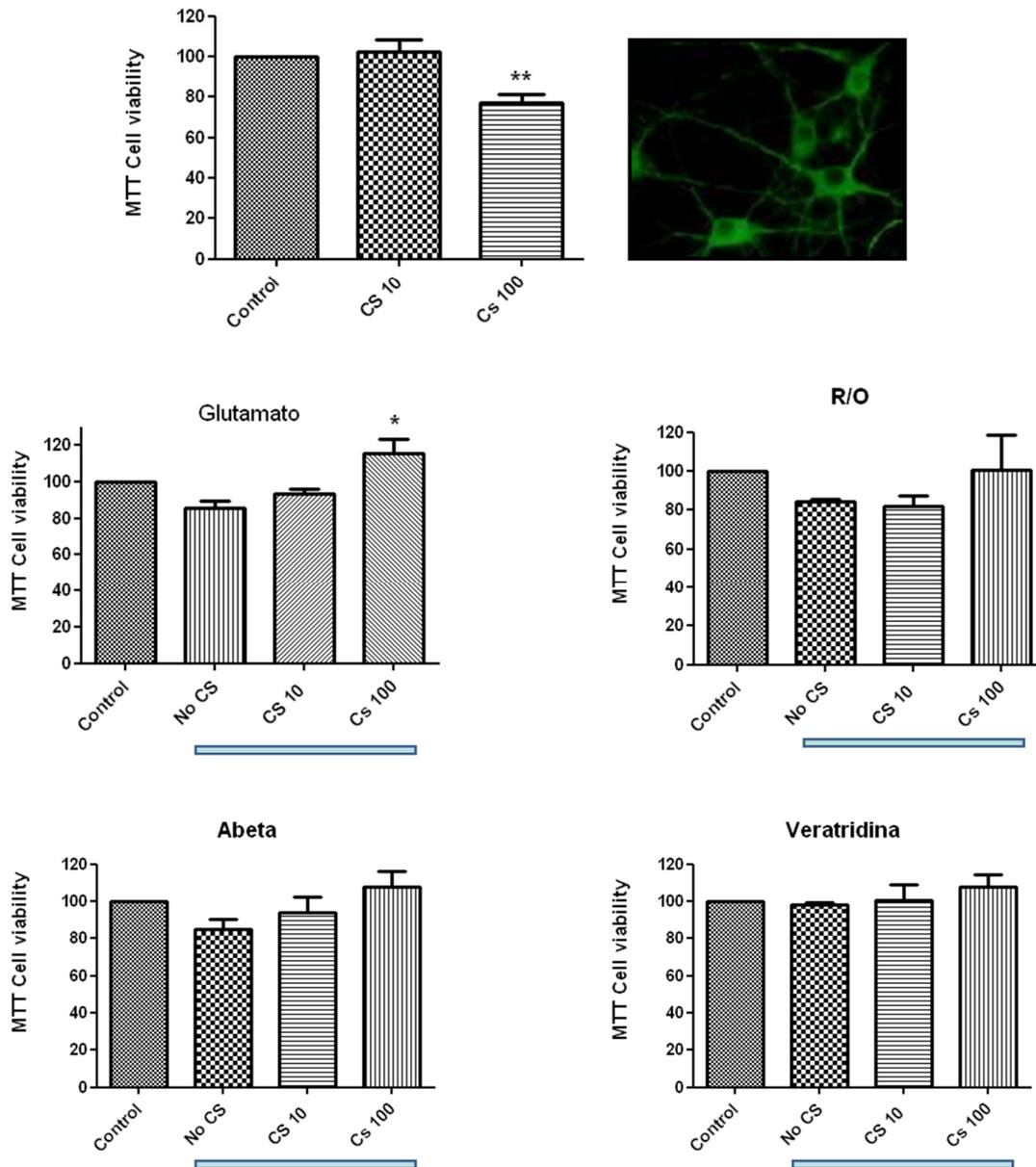


Figura 4.19. Neuroprotección inducida por el condroitín 4-sulfato en neuronas de hipocampo embrionario cultivadas sobre matrices que llevan este proteoglicano en su composición basal. Las células de hipocampo de rata embrionaria se cultivaron sobre las matrices preparadas con distintas concentraciones de condroitín 4-sulfato (CS 10: 0,5mg/ml; CS 100: 5 mg/ml) y sin él, respectivamente durante 8 DIV. A continuación, fueron sometidas a tratamiento durante 7 días con distintos compuestos citotóxicos (glutamato, rotenona/oligomicina A, β -amiloide=abeta y veratridina) y, posteriormente, se realizó un ensayo de viabilidad celular con MTT. El control de cada experimento fue cada tipo de matriz en ausencia de agente tóxico. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$.

4.3.1. Observación de la formación de redes neuronales mediante microscopía óptica

Como se puede observar en la **Figura 4.20**, la velocidad de diferenciación de estas células en la matriz (con cualquiera de las concentraciones de condroitín 4-sulfato) es extremadamente rápida, observándose neuronas interconectadas con tan sólo 24 horas de cultivo. A los 8 DIV se observa una importante red neuronal (más desarrollada que la que cabría esperar en las mismas condiciones de diferenciación en ausencia de la matriz y similar a la que se obtendría en sustratos tratados con polilisina a los 20 DIV) en la que cada neurona establece diversas conexiones neuríticas con células adyacentes. En esta emisión de prolongaciones neuríticas pueden jugar un papel muy importante las netrinas contenidas en la matriz y liberadas de forma gradual al medio de cultivo, tal y como ocurriría en el cerebro embrionario en desarrollo *in vivo*.

4.3.2. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal mediante marcajes inmunofluorescentes y microscopía confocal

Transcurridos 10 DIV, se realizó un marcaje de las células diferenciadas sobre la matriz con un anticuerpo contra la proteína MAP2, una proteína que se expresa en el citoesqueleto de las células neuronales maduras.

Como cabía esperar, las células de hipocampo de rata embrionaria diferenciadas en la matriz expresan MAP2, por lo que se puede afirmar que la red celular mostrada en la **Figura 4.20** es una red muy desarrollada de neuronas maduras de hipocampo (**Figura 4.21**). Dado el carácter tridimensional del cultivo, se puede decir que la combinación de la matriz con la red de neuronas maduras se asemeja notablemente con un tejido neuronal de hipocampo *in vitro*.

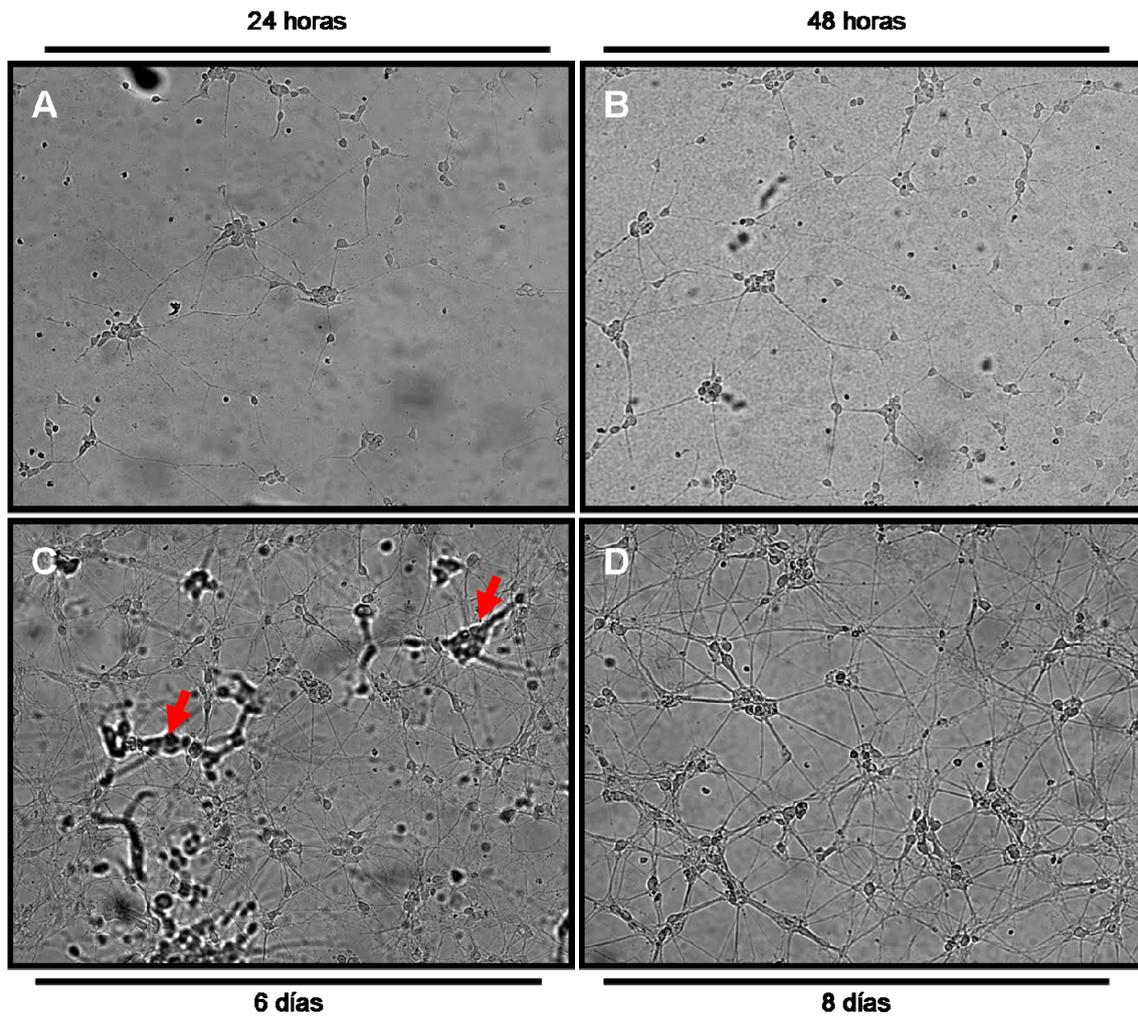


Figura 4.20. Diferenciación de células de hipocampo de rata embrionaria (E18) sobre las matrices desarrolladas previamente (con condroitín 4-sulfato). La formación de redes neuronales complejas en estas matrices es increíblemente rápida, asemejándose el cultivo obtenido después de 8 DIV al cultivo que se obtendría en otras condiciones después de 20 DIV. En una de la imágenes (C) se puede observar el carácter tridimensional del cultivo ya que, al enfocar unas células de la red, otras quedan desenfocadas. Imágenes tomadas con el microscopio óptico (objetivo 10x).

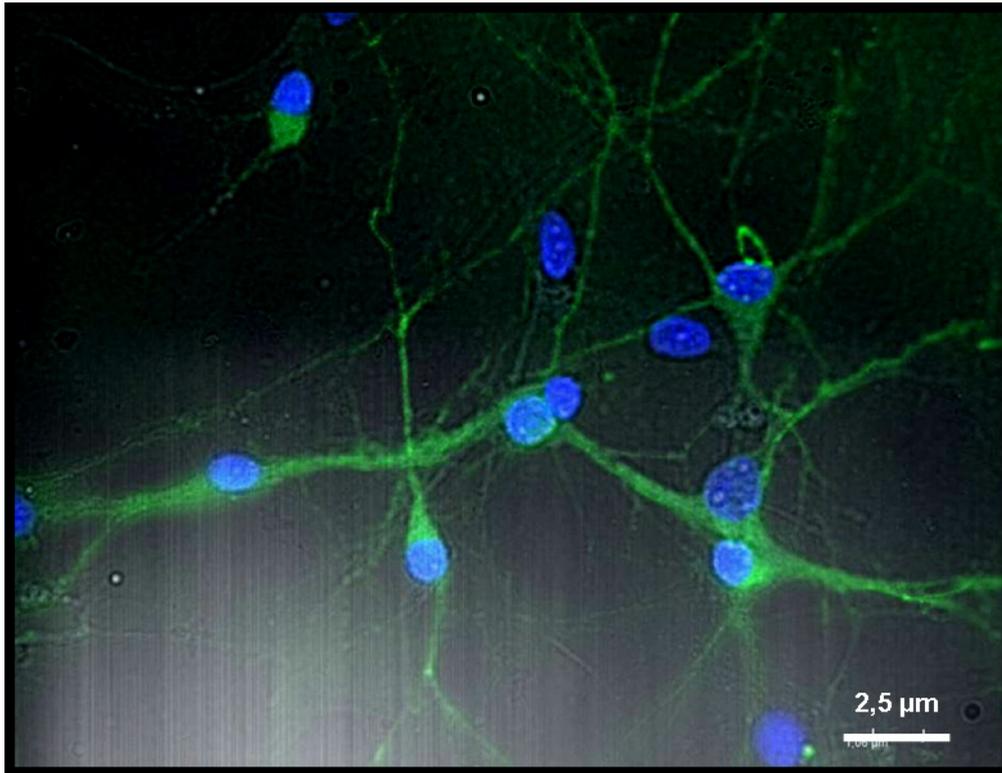


Figura 4.21. Expresión de MAP2 en células de hipocampo de rata embrionaria (E18) diferenciadas sobre las matrices desarrolladas previamente (con condroitín 4-sulfato) durante 10 DIV. La expresión de esta proteína del citoesqueleto de neuronas maduras se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra MAP2 y un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde). Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes.

4.4. AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES DE ZONA SUBVENTRICULAR DE RATA NEONATA (P2-P3)

Una vez comprobado que las neuronas de hipocampo de rata embrionaria se diferencian en la matriz desarrollada de una manera más eficiente que en los sustratos clásicos de cultivo, la siguiente pregunta planteada fue si esta matriz también potenciaría la diferenciación de células madre/progenitoras en células con fenotipo neuronal y dopaminérgico.

Para contestar a esta pregunta, se decidió utilizar células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata (P2-P3) como sistema celular indiferenciado pero con potencialidad neural. Como se comentó en el apartado 1.3.2 de la introducción, la zona subventricular es una de las zonas neurogénicas del cerebro adulto, por lo que representa una buena fuente de obtención de células progenitoras neurales. Además, el hecho de utilizar cerebros de ratas neonatas en lugar de ratas adultas hace que la facilidad de obtención de estas células sea mayor -ya que el grado de desarrollo del cerebro neonato es menor que el del cerebro adulto-, así como su plasticidad neuronal.

4.4.1. Cultivo en suspensión de células madre de zona subventricular de rata neonata (P2-P3): formación de neuroesferas

Como se apuntó en el apartado 1.3.3.2 de la introducción, la forma de enriquecer y expandir células progenitoras neurales *in vitro* consiste en realizar un cultivo de estas células en condiciones no adherentes (sin suero) y en presencia de dos factores mitogénicos claves, el EGF y el FGF2. En estas condiciones, las células progenitoras neurales forman unas estructuras esféricas flotantes -conocidas con el nombre de neuroesferas-, que están formadas por células en diferentes estadios de potencialidad y de determinación neural.

Por ello, una vez disgregadas la zonas subventriculares de ratas neonatas (P2-P3), la suspensión celular resultante fue mantenida durante 7 DIV en las condiciones descritas en el párrafo anterior, con la consecuente formación de neuroesferas en este intervalo de tiempo (**Figura 4.22**). El tamaño que muestran las neuroesferas después de estos días de proliferación resulta muy heterogéneo, siendo el tamaño óptimo que deben presentar las mismas para ser utilizadas en procesos de diferenciación de entre 50 y 200 μm de diámetro (**Figura 4.22.B**), ya que neuroesferas de tamaños superiores o inferiores a estos representan a neuroesferas que se

encuentran envejecidas o sin el grado de madurez necesario, respectivamente. El envejecimiento de las neuroesferas de tamaños superiores a $\geq 200 \mu\text{m}$ se puede apreciar en la oscuridad del núcleo de la neuroesfera, debido a que el tamaño de diámetro de la misma debe impedir la correcta difusión del oxígeno y de los nutrientes del medio de cultivo hasta él. Así, las células que se encuentran en esa posición central de la neuroesfera, deben estar sufriendo procesos de hipoxia o anoxia, por lo que podrían estar entrando en senescencia o iniciando procesos de apoptosis celular. En las neuroesferas nacientes, el número de células madre/progenitoras neurales es muy bajo debido a que todavía no han tenido lugar los procesos de división clonal suficientes como para que la neuroesfera crezca y se compacte. Suele ser frecuente que el tamaño de las neuroesferas aumente no por divisiones celulares internas sino por fusión entre neuroesferas que se encuentran próximas y que, finalmente, contactan y se fusionan (**Figura 4.22.C**).

4.4.2. Diferenciación de neuroesferas en la matriz extracelular desarrollada

Una vez obtenido el cultivo de neuroesferas, se llevó a cabo su diferenciación sobre la matriz extracelular neural (depositada en esta ocasión sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro, tal y como se señaló en el apartado 3.5.4.2.4 de materiales y métodos). Las neuroesferas (de entre 50 y 200 μm de diámetro) fueron seleccionadas con ayuda de una micropipeta de 200 μl en condiciones de esterilidad, y depositadas en cantidades similares en todas las matrices ensayadas, a razón de 5-10 neuroesferas por matriz.

Una representación esquemática del protocolo que se utilizó para la diferenciación de estas neuroesferas en células con fenotipo neuronal-dopaminérgico se ilustra en la **Figura 4.23**, con indicación de los marcadores utilizados en cada momento para la identificación de las células diferenciadas, como se comentará más adelante (**Figura 4.27**).

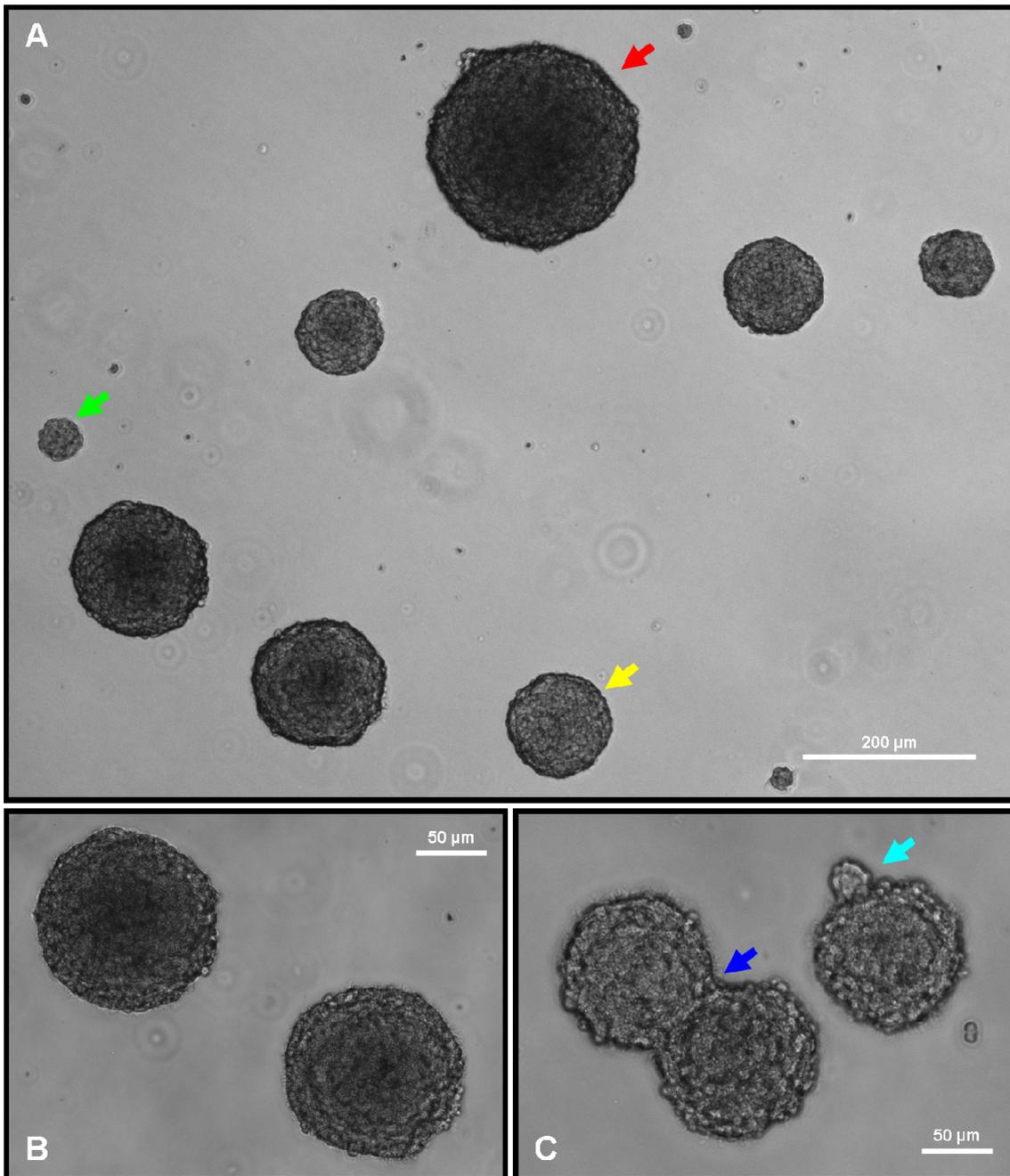


Figura 4.22. Enriquecimiento y expansión de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata mediante cultivo de neuroesferas. Después de 7 DIV y con suplementación del medio con EGF y FGF2 cada 2 días, se obtiene un cultivo de neuroesferas (A) heterogéneo en cuanto al tamaño de las mismas: $\leq 50 \mu\text{m}$ (flecha verde), $50\text{-}200 \mu\text{m}$ (flecha amarilla) y $\geq 200 \mu\text{m}$ (flecha roja). La composición celular de las neuroesferas se aprecia con más detalle a mayores aumentos (B). Resulta frecuente encontrar neuroesferas, tanto de tamaño similar (C, flecha azul oscuro) como de tamaño diferente (C, flecha azul claro), fusionándose. Imágenes tomadas con el microscopio óptico con los objetivos de 4x (A) y 10x (B y C), respectivamente, y representativas de 3 experimentos independientes.

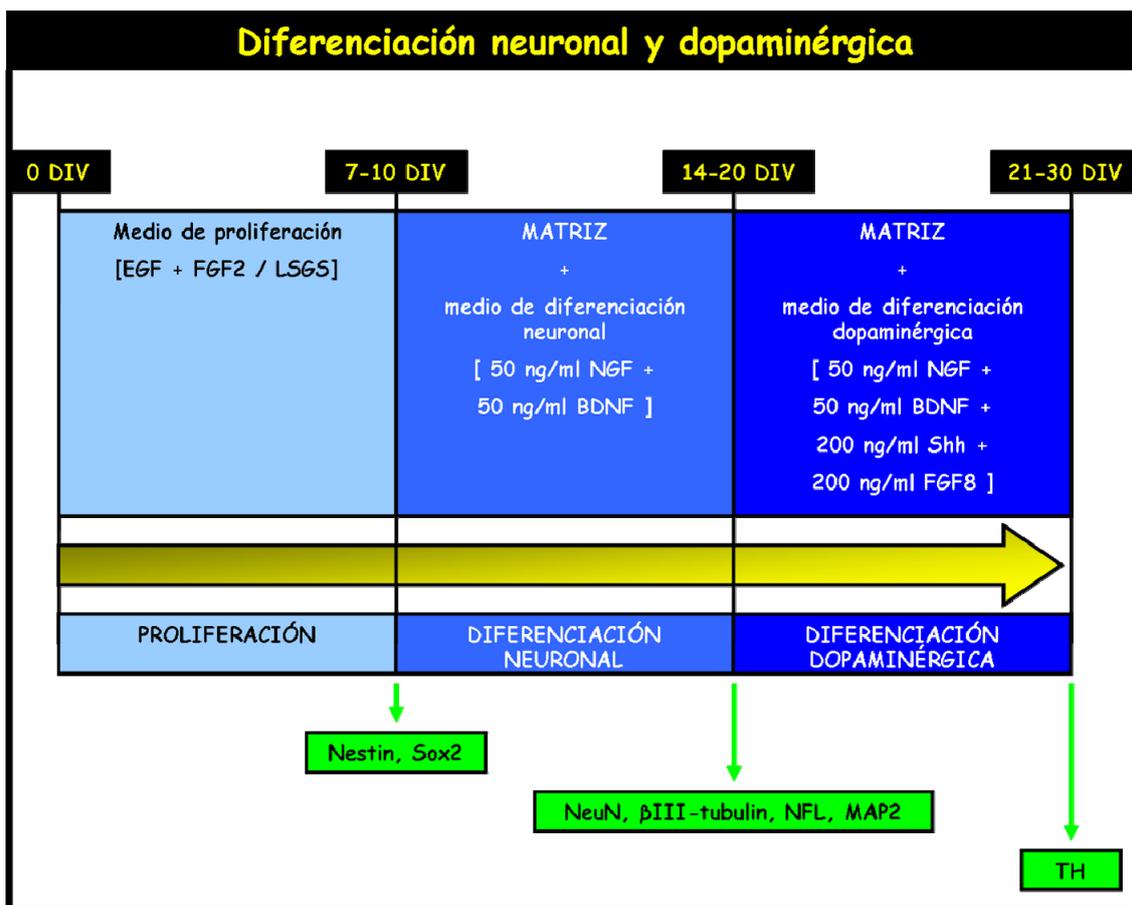


Figura 4.23. Representación esquemática del protocolo de diferenciación neuronal y dopaminérgica utilizado en este trabajo. En el esquema se especifican tanto las moléculas utilizadas para inducir la diferenciación neuronal-dopaminérgica como los marcadores utilizados para seguir el fenotipo de las células diferenciadas en cada momento del proceso.

4.4.2.1. Observación de la formación de redes neuronales mediante técnicas microscópicas

Básicamente, una vez sembradas en las matrices con medio de diferenciación neuronal (con NGF β y BDNF), las neuroesferas tardan 12 horas en adherirse a la matriz y poner en marcha sus mecanismos de diferenciación. Como se puede observar en la **Figura 4.24.B**, a medida que la neuroesfera se aplanada debido a su adhesión a la matriz, las células que la componen empiezan a migrar de forma centrífuga inducidas por las señales inductoras que reciben tanto de la matriz como del medio de cultivo, colonizando la matriz a medida que comienzan una diferenciación gradual y progresiva. En este momento, las células que se encuentran hacia la periferia de la neuroesfera se encuentran más determinadas hacia un determinado fenotipo neural (neuronal o glial) que las células que se encuentran hacia la zona

más central de la misma, donde todavía se conservan células progenitoras neurales multipotentes. Después de 48 horas, se puede observar la formación de una red neuronal incipiente alrededor de la neuroesfera, en la que se aprecian unas importantes prolongaciones neuríticas que conectan las células que conforman la red y en cuya extensión están involucradas seguramente las netrinas liberadas por la matriz (**Figura 4.24.C**).

Después de 20 DIV en condiciones de diferenciación, se observó una importante red neuronal por toda la superficie de la matriz (**Figura 4.25**). En este periodo de tiempo, se llevó a cabo una renovación del medio de cultivo cada 5 días y una adición de los factores neurotróficos (NGF β y BDNF) y de las moléculas de señalización apropiadas en cada momento (Shh y FGF8b) cada 2-3 días (según el esquema de la **Figura 4.23**).

Con el fin de observar con mayor detalle la interacción de las células diferenciadas con la matriz, una de las preparaciones que mostraban esta red neuronal fue fijada y metalizada con oro para su correcta visualización mediante microscopía electrónica de barrido. Como se aprecia en la **Figura 4.26**, la morfología de las células que conforman la red es típica de neuronas en cultivo, con prolongaciones neuríticas que las conectan unas con las otras y que quedan embebidas por la matriz extracelular en diferentes planos (cultivo en 3 dimensiones).

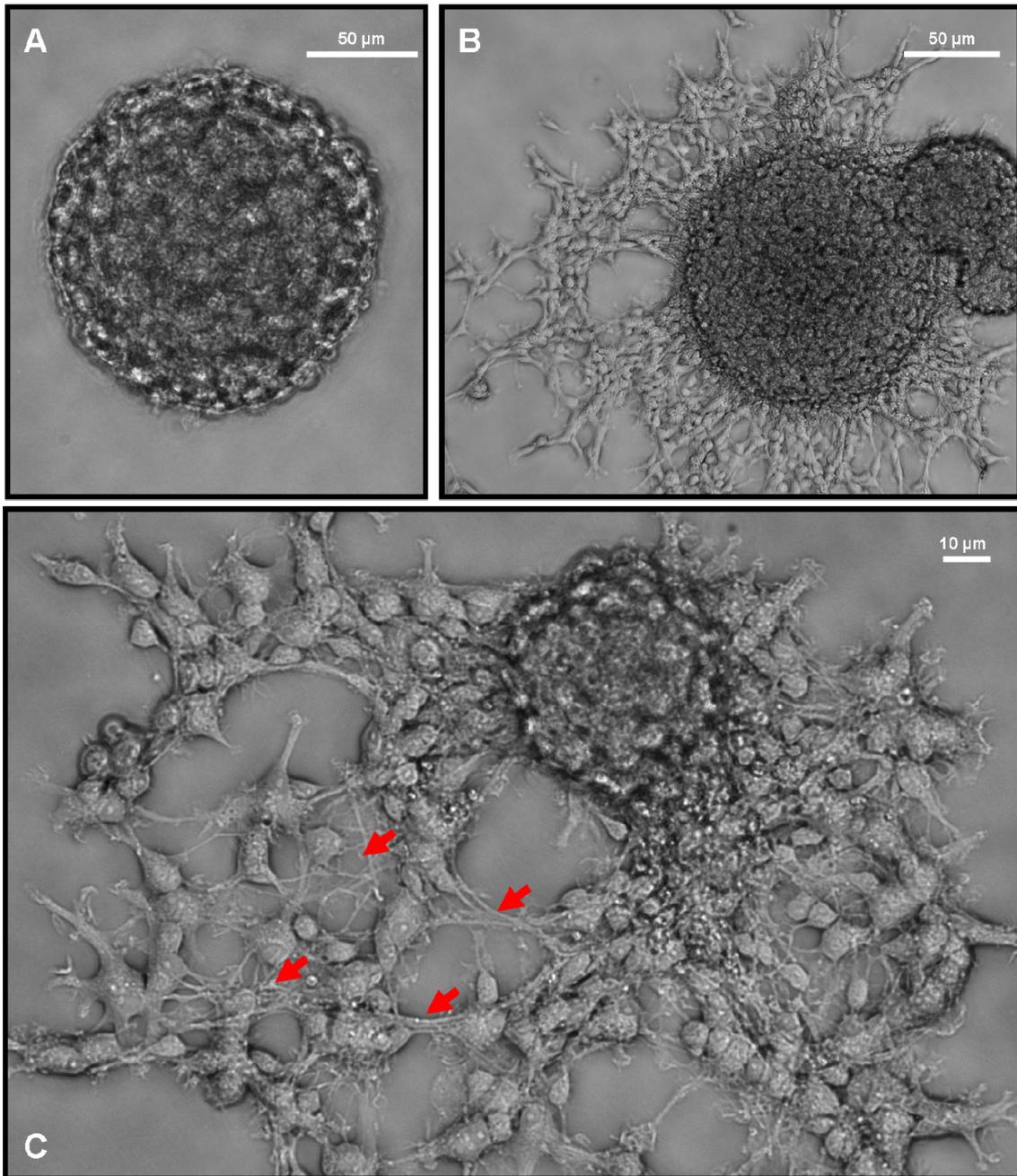


Figura 4.24. Neuroesferas de SVZ de rata neonata en proceso de diferenciación en la matriz desarrollada. Las neuroesferas formadas durante el periodo de proliferación (A), son sembradas en la matriz y, después de 24 horas, se observa la migración de las células que la componen desde la neuroesfera hacia la matriz periférica que la rodea (B). Transcurridas 48 horas ya se observa una red neuronal incipiente en los alrededores de la neuroesfera. Las células que forman la red todavía se encuentran poco diferenciadas pero ya presentan unas prolongaciones neuríticas importantes (flechas rojas), probablemente por el efecto inductor que ejercen las netrinas liberadas por la matriz. Imágenes tomadas con el microscopio óptico con los objetivos de 10x (A y B) y 20x (C), respectivamente, y representativas de 3 experimentos independientes.

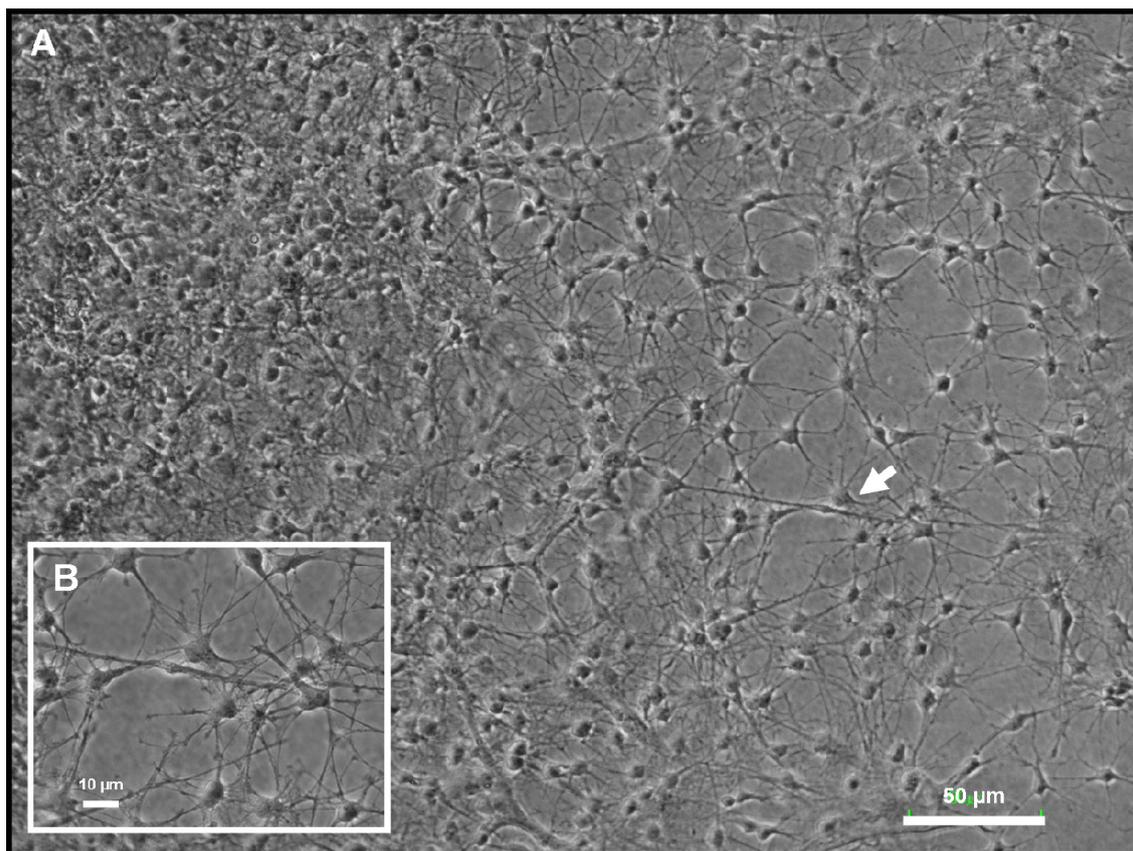


Figura 4.25. Red neural observada en la matriz después de 20 DIV en condiciones de diferenciación neuronal y dopaminérgica. La flecha blanca de A hace referencia a la zona ampliada en B para la observación más detallada de la morfología de las células diferenciadas. Imagen tomada con el microscopio óptico y representativa de 3 experimentos independientes.

4.4.2.2. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y dopaminérgica mediante marcajes inmunofluorescentes y microscopía confocal

Con el fin de corroborar el fenotipo de las células diferenciadas que forman esta red neural, se realizaron marcajes inmunoespecíficos a distintos tiempos de cultivo contra proteínas consideradas buenos marcadores de las células neuronales en diferentes estadios de diferenciación. Como se representa de forma esquemática en la **Figura 4.27**, las células progenitoras neurales que inician su diferenciación pero que todavía son multipotentes (debido a que su fenotipo neuronal o glial todavía no se encuentra totalmente determinado) expresan nestina y Sox2. Estos marcadores se van perdiendo a medida que continúa el proceso diferenciador; si las células están determinadas hacia la vía neuronal, empezarán a expresar progresivamente NeuN, NFL y β -III-tubulina, como marcadores de fenotipo neuronal poco

desarrollado; por el contrario, si las células se encuentran determinadas hacia la vía glial, expresarán GFAP u O1/O4, en función de si se trata de astrocitos u oligodendrocitos, respectivamente. En el caso de la vía neuronal, a medida de que las neuronas diferenciadas maduren, expresarán nuevos marcadores como MAP2 y, sólo en el caso de que las neuronas se especialicen en cuanto a fenotipo dopaminérgico, expresarán el marcador TH, indicativo de que las neuronas son capaces de sintetizar dopamina por contar con el enzima necesario para su síntesis a partir de tirosina.

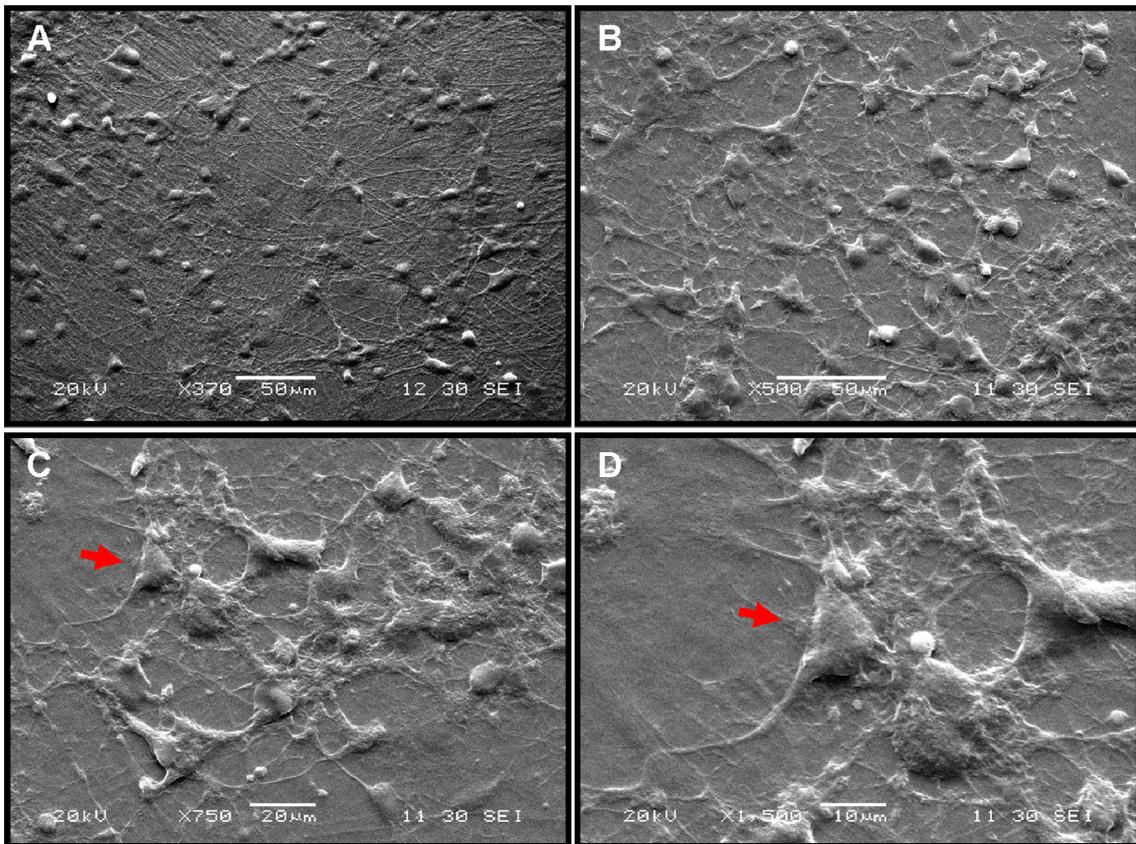


Figura 4.26. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la red neuronal formada en la matriz. A pocos aumentos (A y B; 370x y 500x, respectivamente) se observa el aspecto general que muestra la red en la matriz. A mayores aumentos (C, y D; 750x y 1.500x, respectivamente) se observa con detalle que tanto los cuerpos de las neuronas diferenciadas como sus prolongaciones neuríticas se encuentran embebidas por la matriz, conectando a través de ella en diferentes planos con otras células próximas. La flecha roja de C se ha utilizado para señalar la zona exacta ampliada en D.

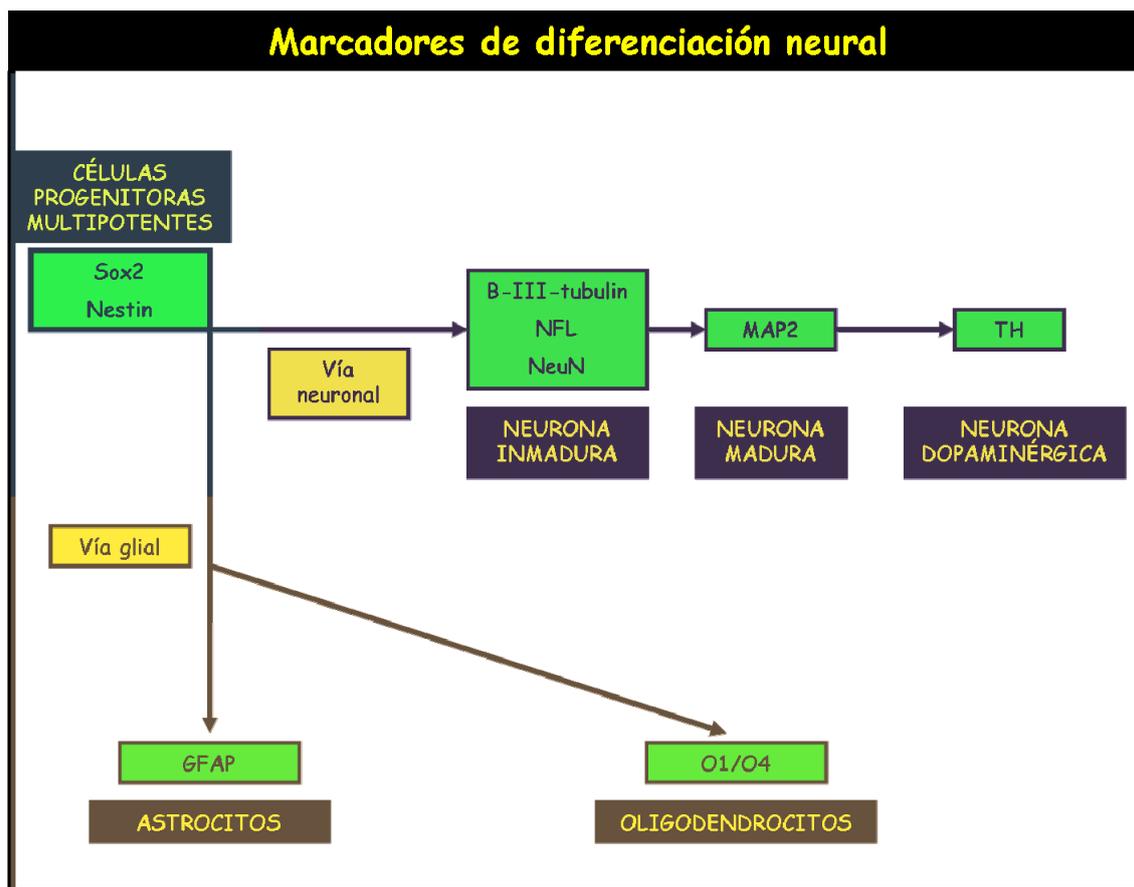


Figura 4.27. Representación esquemática de algunas de las proteínas expresadas por las células neurales a medida que se diferencian, tanto si lo hacen por la vía neuronal como por la vía glial, y que sirven en este trabajo como marcadores para seguir el proceso de diferenciación.

A las 24 horas de deposición de las neuroesferas en la matriz (**Figura 4.28**), las células que conforman la neuroesfera expresan tanto Sox2 como nestina, lo que resulta indicativo de la todavía multipotencialidad e indeterminación de las células en este estadio de la diferenciación. Las células Sox2 positivas son células con un mayor grado de multipotencia que las células nestina positivas, que se corresponden a su vez con células progenitoras neurales más determinadas en la vía neural. Un hecho que resulta importante destacar es que la cantidad de células nestina positivas presentes en la periferia de la neuroesfera es superior a la cantidad de células nestina positivas presentes en la zona central, lo que resulta indicativo del aumento de diferenciación que experimentan las células a medida que migran de forma centrífuga hacia la matriz. Como cabe esperar, con las células Sox2 positivas ocurre exactamente lo contrario. Sin embargo, en muchos casos se observa que las células muestran ambos marcajes (dobles positivas) lo que permite observar la transición gradual de unos fenotipos a otros.

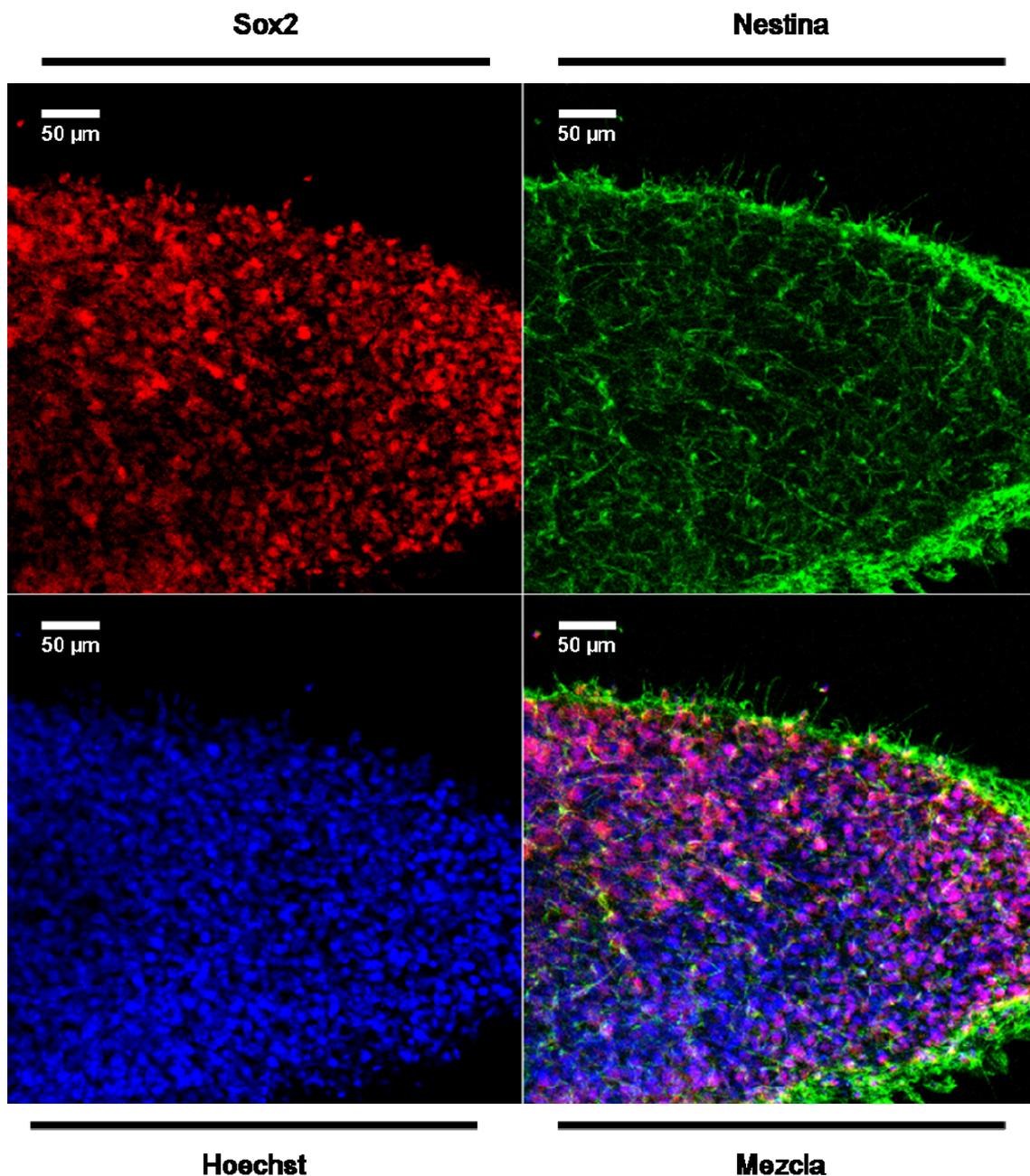


Figura 4.28. Expresión de Sox2 y de nestina por las células que forman las neuroesferas derivadas de SVZ de rata neonata después de 24 horas en condiciones de diferenciación sobre la matriz. La expresión de ambas proteínas se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra Sox2 y nestina, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 546 (rojo) y con Alexa Fluor 488 (verde), respectivamente. Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

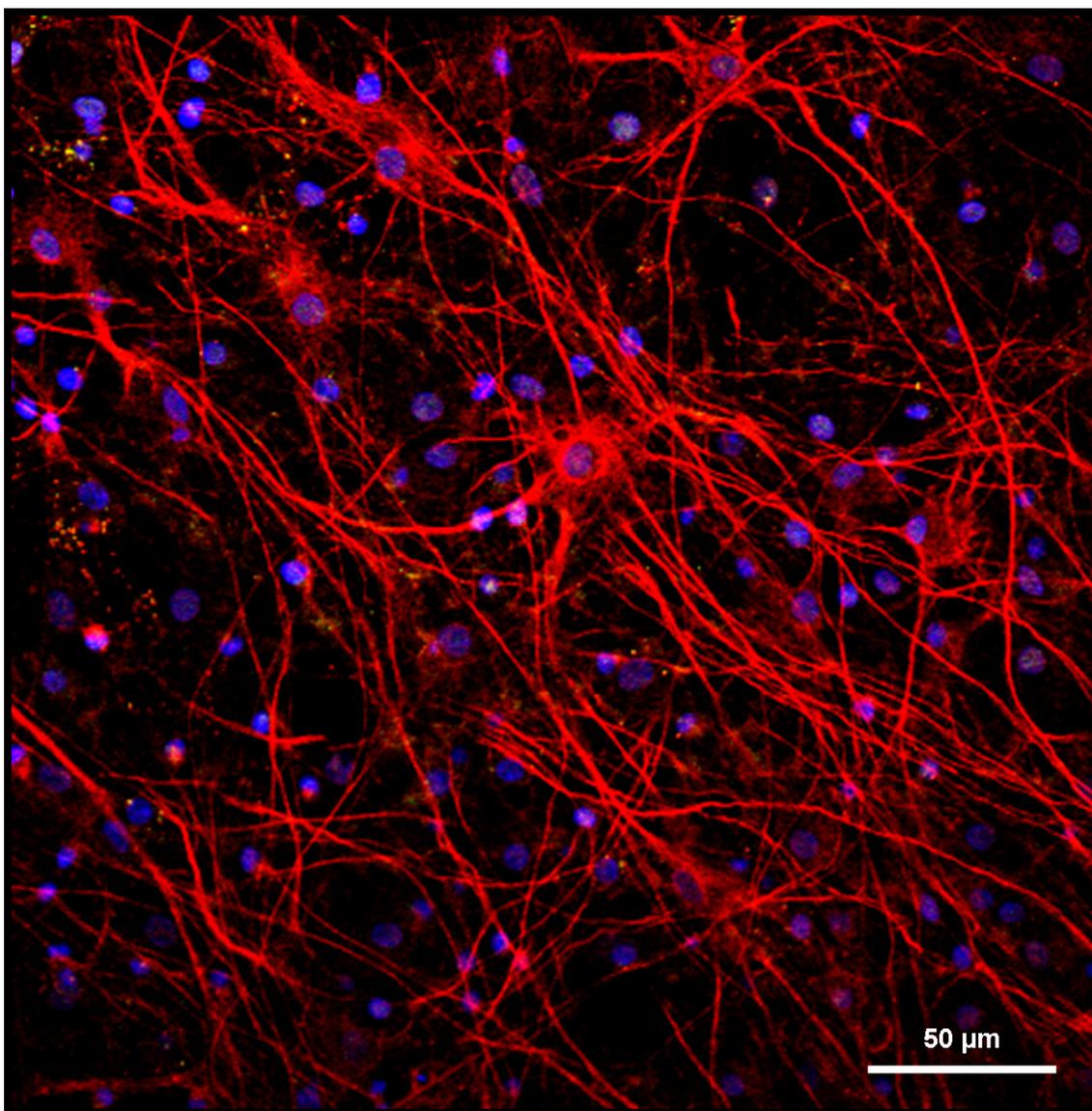


Figura 4.29. Expresión de nestina por las células que forman la red neuronal periférica a las neuroesferas después de 7 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz. La expresión de esta proteína se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra nestina y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 546 (rojo). Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes.

A este respecto, si a los 7 días de comenzar la diferenciación, se realiza un marcaje contra nestina en las células que forman la red neuronal periférica a las neuroesferas, se observa que la mayor parte de estas células son nestina positivas y presentan una importantes extensiones neuríticas con las que establecen conexiones con otras células en varios planos de la matriz (tridimensional) (**Figura 4.29**). Este resultado es indicativo de que las células se encuentran determinadas a linaje neuronal pero todavía no expresan marcadores de neuronas inmaduras.

Uno de estos marcajes, NeuN, aparece en los siguientes días de cultivo (10-14 DIV), a medida que disminuye la expresión de nestina (Figura 4.30).

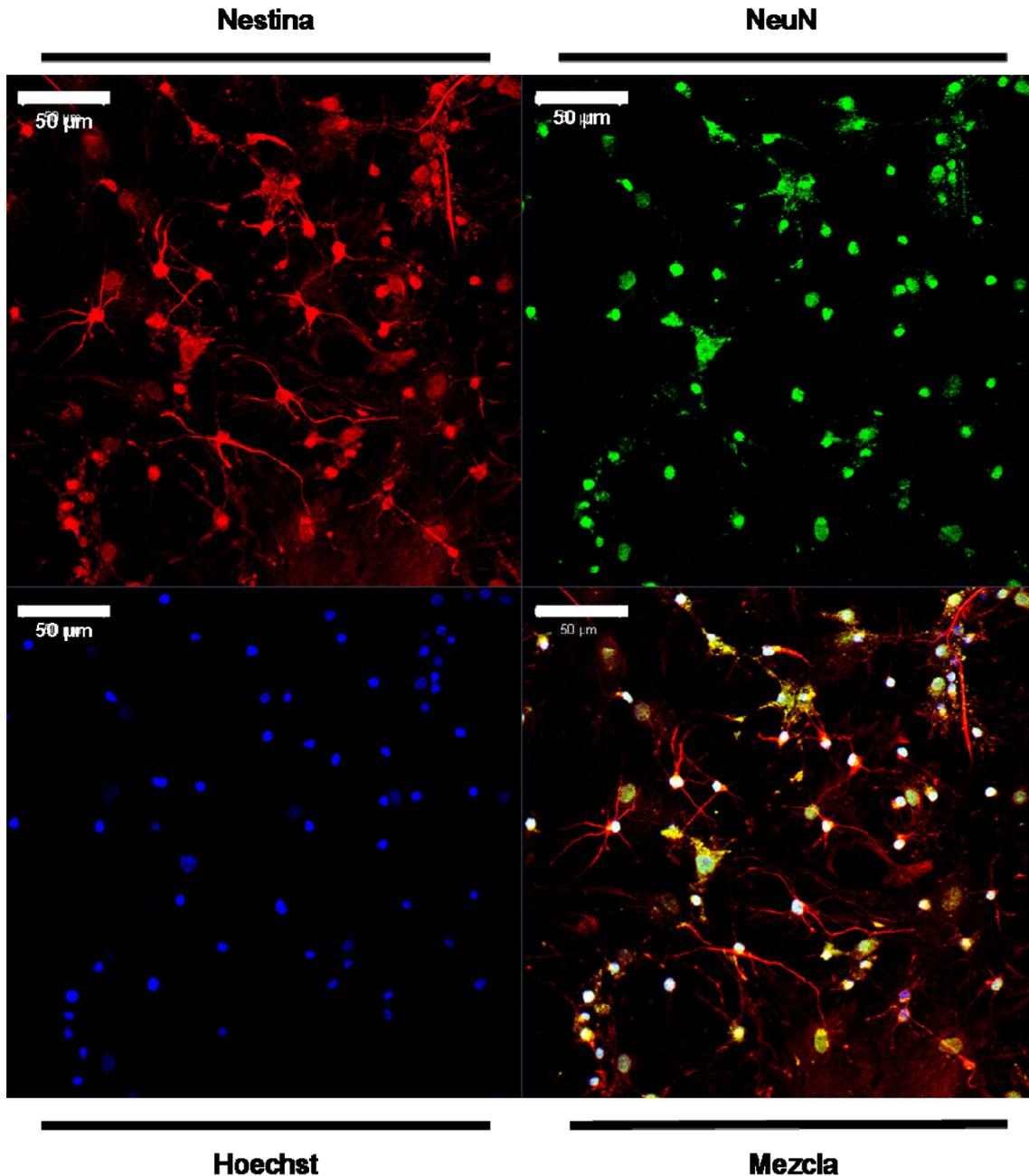


Figura 4.30. Expresión de NeuN y de nestina por las células que forman la red neuronal periférica a las neuroesferas después de 14 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz. La expresión de estas proteínas se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra NeuN y nestina, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (verde) y un anticuerpo marcado con Alexa Fluor 546 (rojo), respectivamente. Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

Siguiendo con la diferenciación, a los 14 DIV, se observa la expresión de NFL por algunas de las células que forman la red neural (**Figura 4.31.A**). Algo que llama la atención en este punto, es la presencia, en algunas zonas de la matriz, de células morfológicamente diferentes a la de las células neuronales y que son difíciles de observar con el microscopio óptico. Estas células presentan un citoplasma aplanado con muchas ramificaciones a partir de él, y expresan el marcador GFAP; por ello, se piensa que son astrocitos que se encuentran sobre la matriz (pero por debajo de las células neuronales en diferenciación) (**Figura 4.31.B**), proporcionándoles soporte trófico y contribuyendo a la renovación de la matriz extracelular. Los astrocitos también se han diferenciado a partir de células progenitoras neurales presentes en las neuroesferas y que han seguido la vía de diferenciación glial. La diferenciación de un porcentaje de células precursoras neurales a astrocitos no es de extrañar en las condiciones de diferenciación utilizadas ya que se trata de lo que cabría esperar *in vivo*. Lo que sí es muy improbable en estas condiciones es la obtención de células que expresen O1/O4, es decir, oligodendrocitos, ya que en este caso haría falta un medio de cultivo específico con determinadas moléculas de señalización no presentes en este medio.

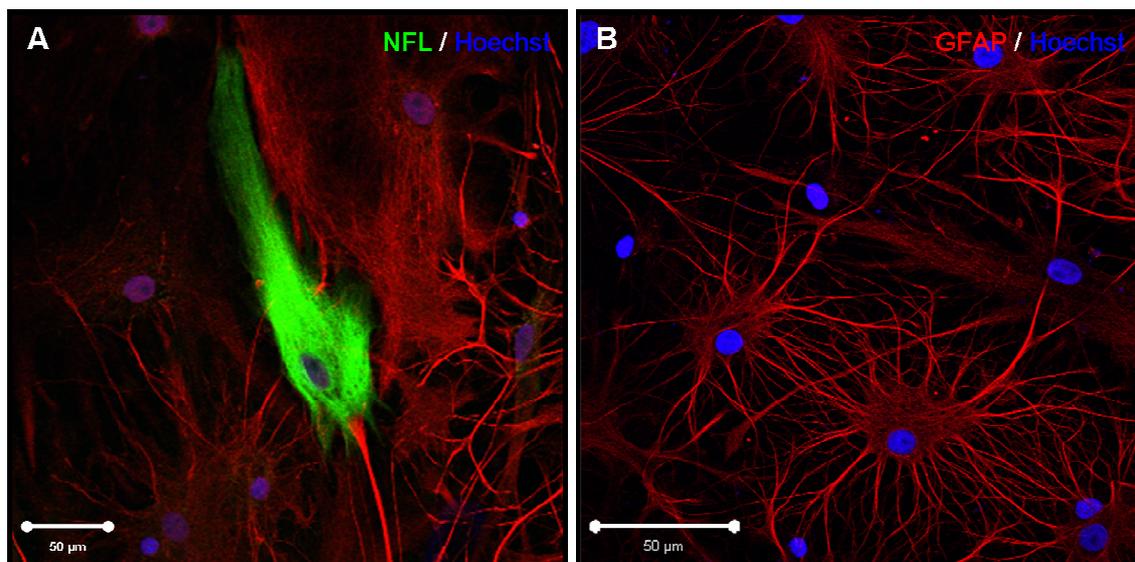


Figura 4.31. Expresión de NFL por neuronas inmaduras (A, verde) y GFAP por astrocitos (A y B, rojo) que forman la red neural después de 14 días de diferenciación sobre la matriz. La expresión de estas proteínas se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra NFL y GFAP, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (verde) y Alexa Fluor 546 (rojo), respectivamente. Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

Continuando con la diferenciación, a los 21 DIV se observan células que expresan el marcador MAP2, indicativo de que las neuronas se encuentran en proceso de maduración. En la **Figura 4.32**, se muestra un ejemplo de neuronas MAP2 positivas diferenciadas sobre la capa de astrocitos comentada anteriormente.

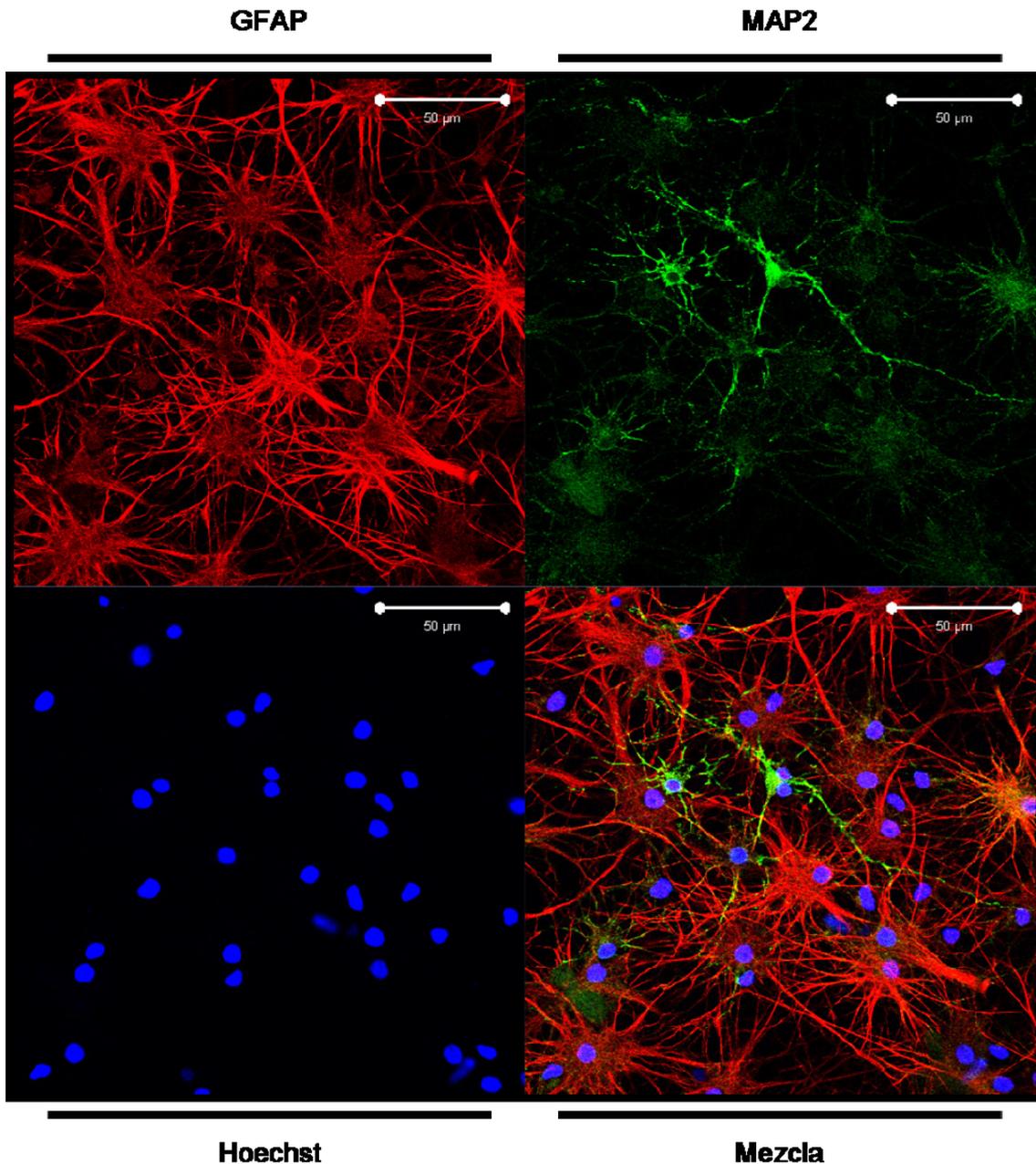


Figura 4.32. Expresión de MAP2 por neuronas en proceso de maduración (verde) y de GFAP por astrocitos (rojo) después de 21 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz. La expresión de estas proteínas se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra MAP2 y GFAP, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado Alexa Fluor 488 (verde) y Alexa Fluor 546 (rojo), respectivamente. Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

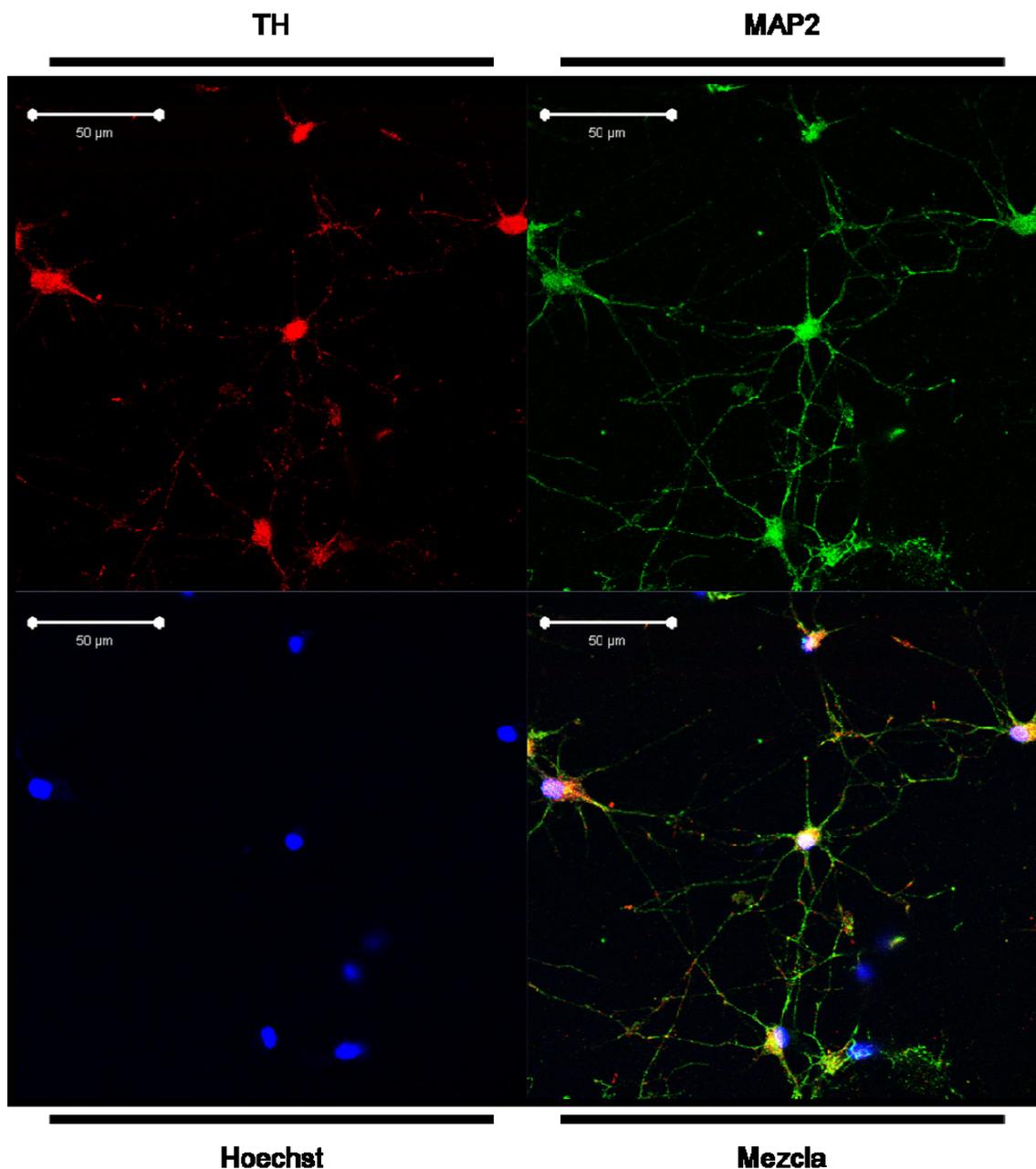


Figura 4.33. Expresión de MAP2 (verde) y de TH (rojo) por neuronas en proceso de maduración después de 28 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz. La expresión de estas proteínas se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra MAP2 y TH, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (verde) y Alexa Fluor 546 (rojo), respectivamente. Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

A los 28 días de diferenciación, se observa una red de neuronas maduras MAP2 positivas que comienzan a expresar el marcador TH (más marcadamente en el soma neuronal, como cabría esperar en una proteína recién sintetizada) (**Figura 4.33**). Sin embargo, son necesarios

más de 30 días de cultivo para que las neuronas maduras presenten este enzima característico del fenotipo dopaminérgico por toda su estructura (**Figura 4.34**). Así, después de un mes de cultivo, un $88,4\% \pm 5,4\%$ de las neuronas maduras expresan el fenotipo dopaminérgico.

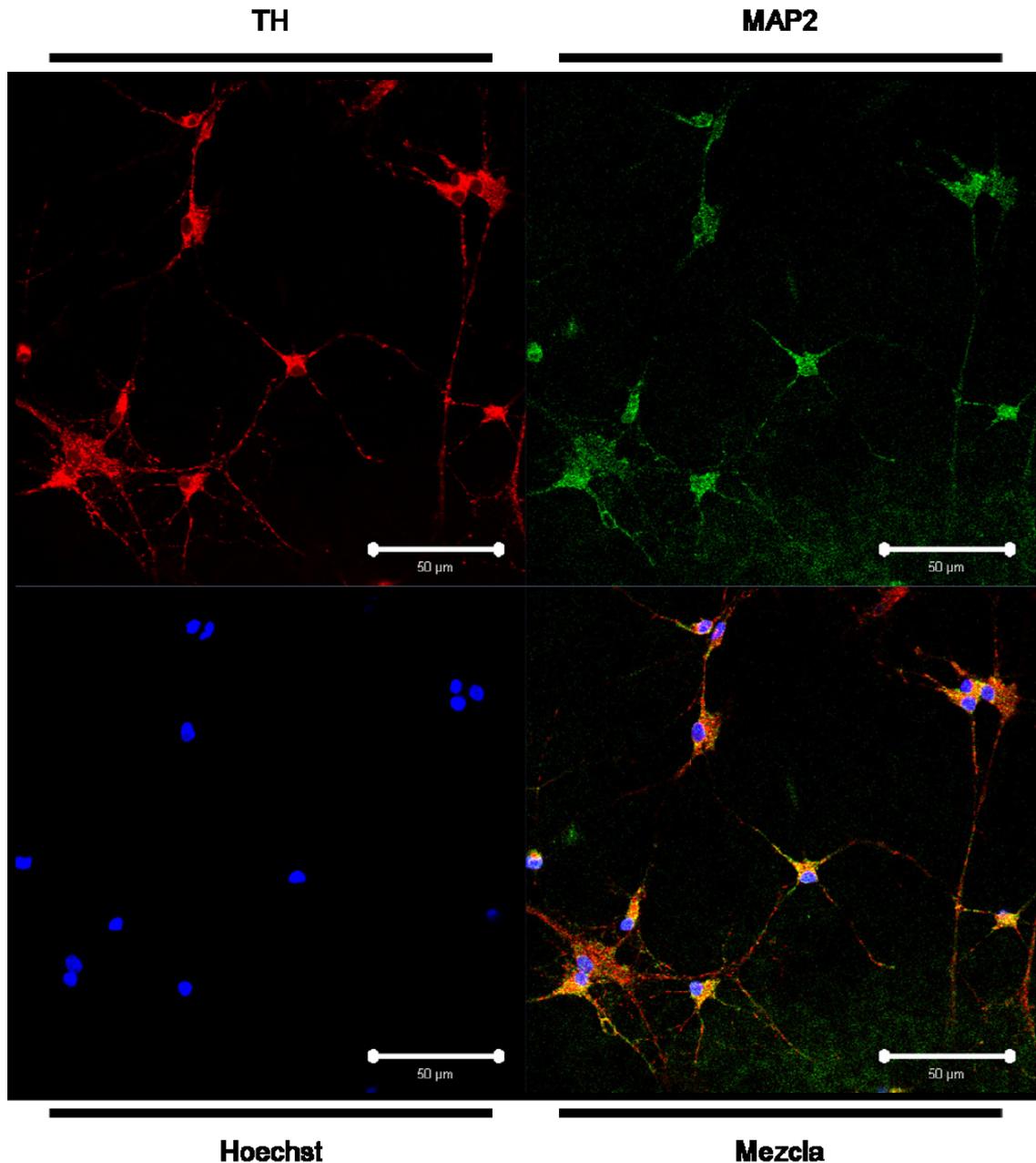


Figura 4.34. Expresión de MAP2 (verde) y de TH (rojo) por neuronas dopaminérgicas después de 35 días en condiciones de diferenciación sobre la matriz. La expresión de estas proteínas se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra MAP2 y TH, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (verde) y Alexa Fluor 546 (rojo), respectivamente. Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

Finalmente, en la **Figura 4.35** se puede observar una red de neuronas dopaminérgicas diferenciadas a los 35 DIV después de realizar el cultivo de las neuroesferas sobre la matriz, tal y como se pretendía inicialmente.

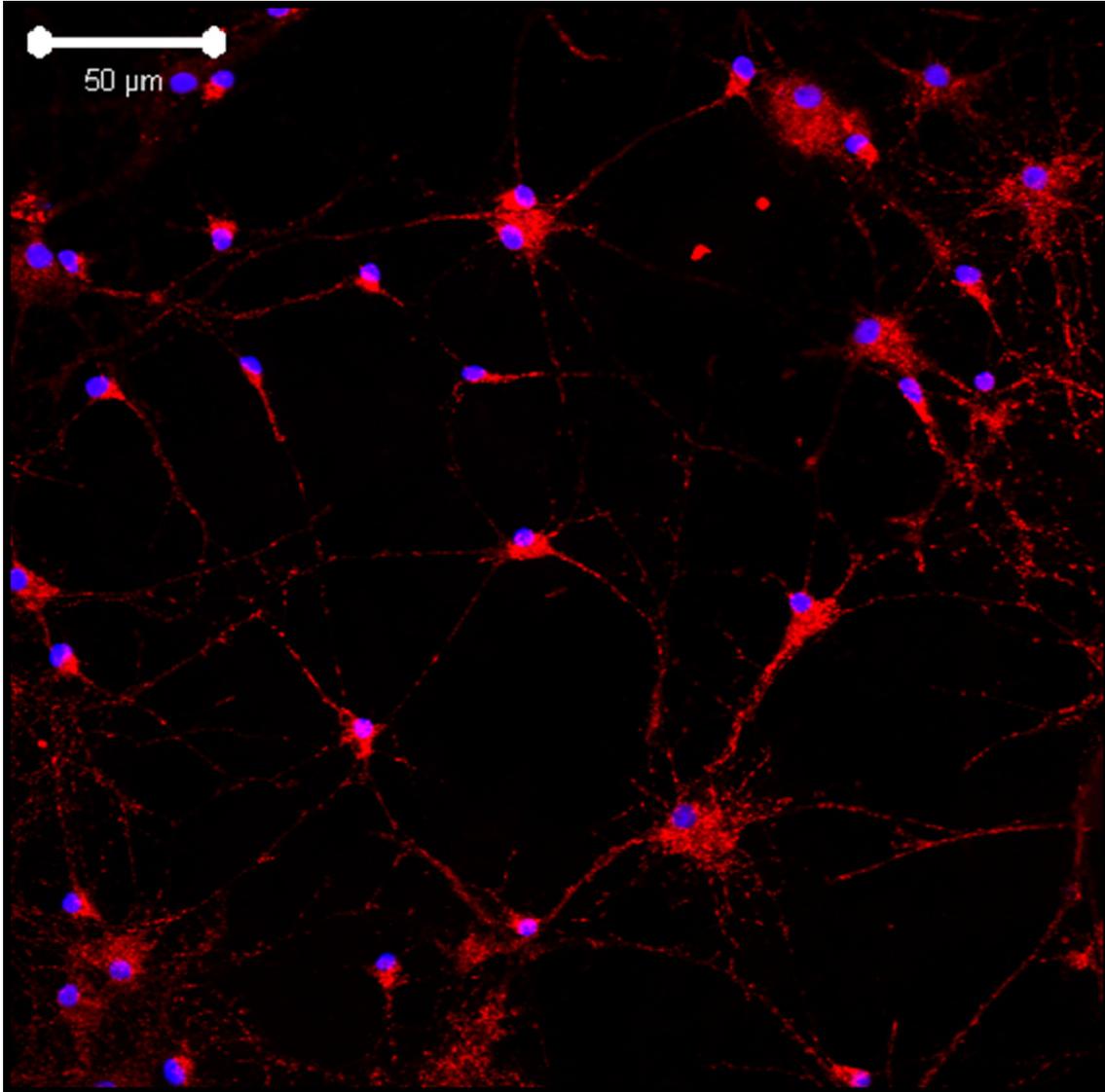


Figura 4.35. Red de neuronas dopaminérgicas diferenciadas sobre la matriz a partir de células progenitoras neurales de SVZ de rata neonata. La expresión del fenotipo dopaminérgico se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra TH, y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 546 (rojo). Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes.

A modo de resumen, se muestran los marcajes observados en las células a diferentes días de cultivo en condiciones de diferenciación (**Tabla 4.2**).

Tiempo de diferenciación	Sox2	Nestina	NeuN	NFL	GFAP	MAP2	TH
1 DIV	++	++	-	-	-	-	-
7 DIV	+	++	-	-	-	-	-
14 DIV	-	+	+	+	+	-	-
21 DIV	-	-	+	+	++	+	+
35 DIV	-	-	-	-	+	++	++

(-) ausencia de marcaje; (+) presencia de marcaje en menos del 50% de las células totales; (++) presencia de marcaje en más del 50% de las células totales.

Tabla 4.2. Resumen de los marcajes observados a lo largo de la diferenciación de las células precursoras neurales de SVZ de rata neonata.

4.5. AISLAMIENTO, CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES NEURALES DERIVADOS DE PIEL DE RATA ADULTA

Una vez comprobada la capacidad de las células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata para diferenciarse en neuronas dopaminérgicas sobre la matriz desarrollada de una manera más eficiente que en los sustratos clásicos de cultivo, el siguiente y último objetivo propuesto, fue comprobar si esta matriz también potencia la diferenciación neuronal de células precursoras derivadas de tejidos no neurales, como es el caso de las células precursoras derivadas de piel. Como se comentó en el apartado 1.3.3.2.3 de la introducción, las células precursoras derivadas de piel son células reminiscentes de cresta neural embrionaria que permanecen en la piel durante la edad adulta, con el potencial subyacente de poder dar lugar a una progenie tanto de neuronas como de células gliales. Por lo tanto, su importancia radica en su capacidad de diferenciarse a fenotipos neurales sin ser el tejido nervioso su fuente de obtención.

En este caso, las células precursoras derivadas de piel utilizadas en los siguientes experimentos fueron aisladas a partir de muestras de piel dorsal de rata adulta. El hecho de utilizar piel adulta en lugar de neonatal o fetal limita la obtención y la potencialidad de las células derivadas de la misma, pero resulta más concluyente de cara a su aplicación terapéutica ya que, si se piensa en un trasplante autólogo, la fuente de obtención será piel adulta del propio paciente. Además, según los trabajos publicados hasta el momento, ésta sería la primera vez que se aislarían células precursoras derivadas de piel de rata adulta (no neonata).

Como se detalló en el apartado 3.5.4.2.3 de materiales y métodos, el protocolo seguido para el aislamiento, la selección y la expansión de este tipo de células, se ha puesto a punto en este trabajo a partir de otros protocolos descritos en la literatura para la obtención de este mismo tipo de células a partir de piel de ratón y de humano.

4.5.1. Cultivo en suspensión de células precursoras derivadas de piel de rata adulta: formación de estructuras similares a neuroesferas

Básicamente, una vez disgregada la piel tanto enzimática como mecánicamente, las células aisladas se cultivaron en medio de cultivo exento de suero y suplementado con LSGS. Es importante señalar que, en este trabajo, el medio de cultivo no ha sido suplementado con

EGF y FGF2 sino con LSGS; el LSGS es un suplemento comercial -descrito en la literatura para este tipo de cultivos- que, además de EGF y FGF2, lleva heparina (para potenciar el efecto del FGF2), hidrocortisona, y una baja proporción de FBS (2%), que resulta insuficiente para la adhesión de las células pero que proporciona al cultivo ciertos nutrientes necesarios para su expansión. En estas condiciones no adherentes, y como ocurría en el caso de las células progenitoras neurales de SVZ, las células precursoras derivadas de piel se expandieron en suspensión formando unas estructuras esféricas flotantes que, por similitud a las neuroesferas, fueron designadas con el nombre de estructuras similares a neuroesferas (ESNs) ya que, debido a su origen no neural, no pueden ser consideradas auténticas neuroesferas.

En la **Figura 4.36** se muestra una imagen representativa de este tipo de cultivos a los 7 DIV. De forma homóloga a lo que ocurría con las neuroesferas de SVZ de rata neonata, estos cultivos mostraron la formación de ESNs de diversos tamaños, aunque hay que volver a resaltar que el tamaño ideal de las mismas para pasar a condiciones de diferenciación es de entre 50 y 200 μm de diámetro. En este caso, también se observan procesos de fusión entre estructuras similares a neuroesferas que aumentan el tamaño de las mismas (**Figura 4.36.C**). En esta ocasión, se quiso comprobar el porcentaje de ESNs de distintos tamaños presentes en los cultivos. Para ello, se contabilizaron el número de ESNs de cada tipo en 3 preparaciones distintas y tomando 5 campos por preparación. Como se puede comprobar en la **Figura 4.37**, después de 7 DIV, las ESNs más abundantes son las que presentan un diámetro de entre 50 y 200 μm , ya que representan un $53,4 \pm 13,3$ % de las ESNs totales. Este resultado indica que más del 50% del cultivo puede ser utilizado a los 7 DIV en el proceso de diferenciación ya que las ESNs ideales para ello se encuentran en un porcentaje superior al 50% en el medio de cultivo en ese momento. Además, el hecho de que haya un $33,5 \pm 14,2$ % de ESNs de ≤ 50 μm de diámetro, frente a tan solo un $13,1 \pm 6,4$ % de ESNs de ≥ 200 μm de diámetro resulta indicativo de que el cultivo todavía se encuentra en expansión.

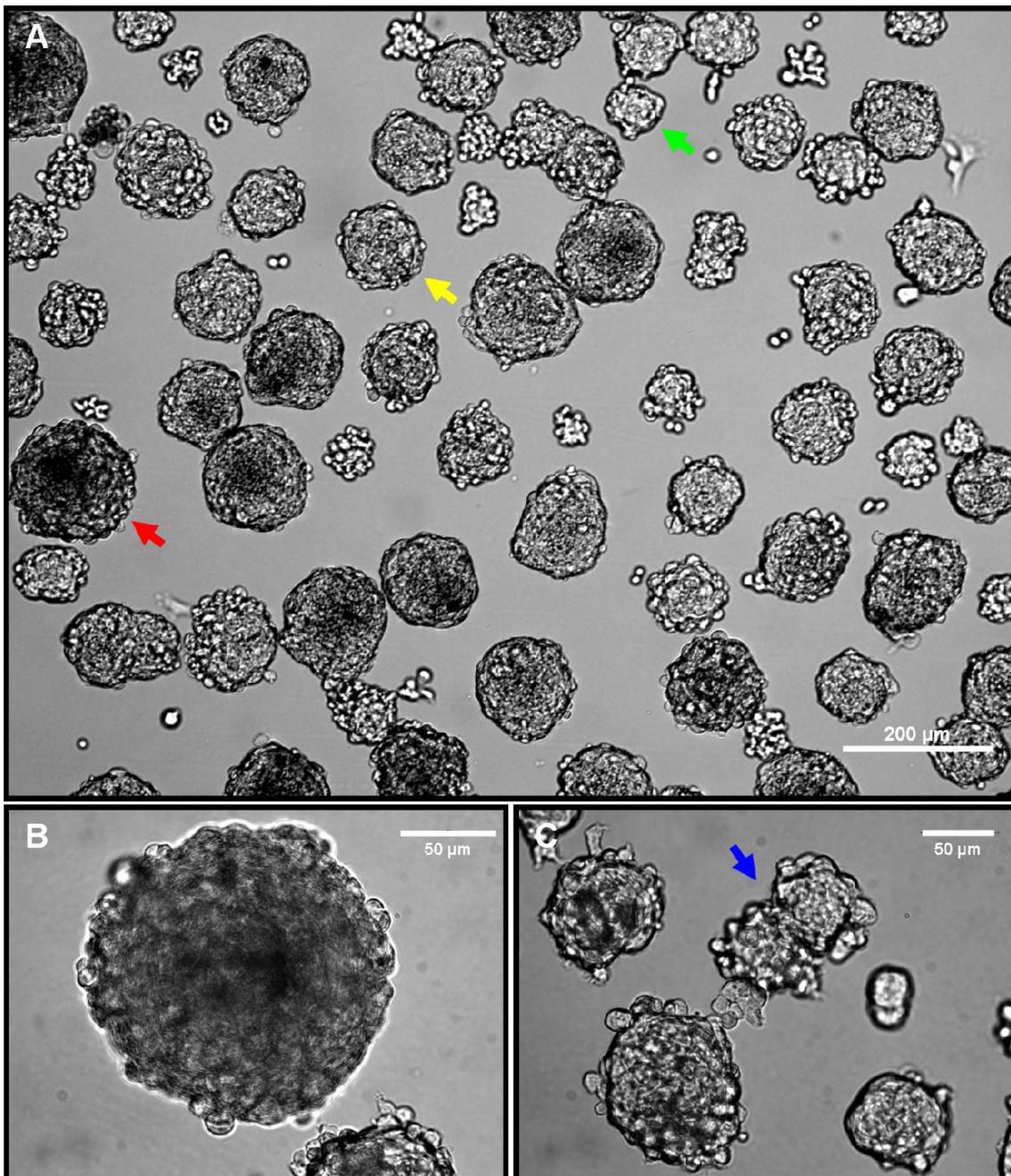


Figura 4.36. Enriquecimiento y expansión de células precursoras derivadas de piel de rata adulta mediante cultivo de estructuras similares a neuroesferas. Después de 7 DIV y con suplementación del medio con LSGS cada 2 días, se forma un cultivo de ESNs heterogéneo en cuanto al tamaño de las estructuras similares a neuroesferas: $\leq 50 \mu\text{m}$ (flecha verde), $50\text{-}200 \mu\text{m}$ (flecha amarilla, aumentado en B) y $\geq 200 \mu\text{m}$ (flecha roja) (A), algunas de las cuales se fusionan (C). Imágenes tomadas con el microscopio óptico con los objetivos de 4x (A), 20x (C) y 40x (B), respectivamente. Las imágenes mostradas son representativas de 6 experimentos independientes.

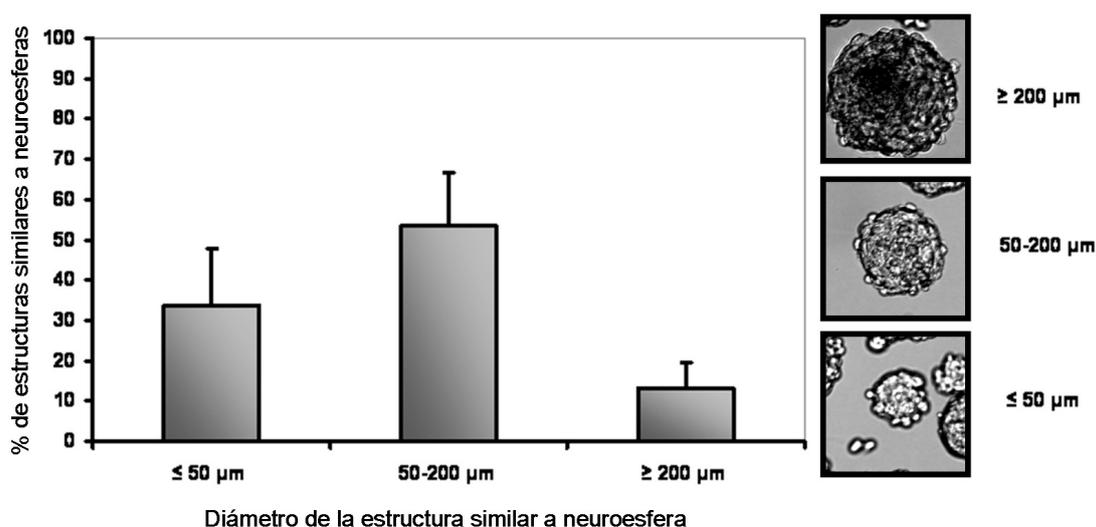


Figura 4.37. Porcentaje de estructuras similares a neuroesferas que se observan en los cultivos a los 7 DIV en función de su tamaño. Después de 7 DIV, el cultivo se encuentra enriquecido en ESNs de diversos tamaños, siendo las ESNs de entre 50 y 200 μm de diámetro las más abundantes (53,4%), seguidas de las de ≤ 50 μm (33,5%) y de las de ≥ 200 μm (13,1%).

Aunque la mayoría de las ESNs fueron utilizadas directamente para los experimentos de diferenciación sobre la matriz desarrollada, una parte se utilizó (en los primeros aislamientos) para comprobar el potencial de expansión del cultivo *in vitro*.

Por un lado, unas ESNs fueron disgregadas con Accumax™ solution, una solución de enzimas proteolíticos y colagenolíticos en Dulbecco's PBS (0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH₂PO₄, 8 g/L NaCl y 1,15 g/L Na₂HPO₄) que resulta muy útil en la disgregación de neuroesferas en suspensiones celulares unitarias, por no resultar agresiva y mantener mejor que otras soluciones enzimáticas la integridad celular. Una vez disgregadas, las células fueron cultivadas nuevamente en condiciones no adherentes con suplemento de LSGS, y se observó la formación de ESNs secundarias al cabo de 5 DIV, pero en menor cantidad que en el caso de las estructuras similares a neuroesferas primarias (**Figura 4.38.A**). Además, a medida que el cultivo se expandió se observaron cada vez más células adheridas débilmente a la placa de cultivo (células que comenzaban su diferenciación; por un lado, células con apariencia fibroblástica y, por otro lado, células con apariencia neural -cuerpo celular refringente y finas extensiones citoplásmicas-) (**Figura 4.38.B**), lo que finalmente hizo culminar el cultivo de ESNs (**Figura 4.38.C**). Por ello, como bien se apunta en la literatura (Joannides y col., 2004; Hunt y col., 2008), el potencial de estas células de formar nuevas ESNs tras la disgregación disminuye con los pases.

Por otro lado, otras ESNs fueron mantenidas en cultivo con una renovación del 50% de medio de cultivo cada 5-7 días, sin llevar a cabo su disgregación ni enzimática ni mecánica (**Figura 4.38.E**). De esta forma, se consiguió mantener el cultivo de ESNs durante más de 30 DIV. Además, se produjo un aumento significativo (exponencial) del número de pocillos que contenían estas estructuras ya que la renovación del medio se realizó pasando la mitad del cultivo de un pocillo a otro pocillo y la otra mitad del mismo pocillo a otro pocillo -y completando el volumen de ambos pocillos con medio de cultivo fresco- de manera que de cada pocillo se obtenían dos pocillos de ESNs. Siguiendo esta regla, cada 5-7 días de cultivo, se obtienen 2^n pocillos, siendo n el número de pocillos existentes antes de realizar la expansión. Mediante esta técnica, las ESNs cuentan en todo momento con el espacio y los nutrientes necesarios para expandirse a lo largo del tiempo; a pesar de ello, no se frena su envejecimiento ni se incrementa su potencial de proliferación (limitado), por lo que no se consigue mantener este tipo de cultivos durante más de 30 DIV. Además, a medida que el cultivo se expandió, también se observaron células adheridas débilmente a la placa de cultivo, en un principio en menor cantidad que en el caso de la disgregación enzimática (**Figura 4.38.E**), pero que al final hicieron culminar el cultivo de ESNs de la misma manera que en el caso anterior (**Figura 4.38.F**).

En cualquier caso, son las ESNs primarias (7 DIV post-aislamiento en condiciones de proliferación) las que presentan el mejor potencial de diferenciación por lo que son este tipo de estructuras las que fueron utilizadas en los experimentos de diferenciación siguientes.

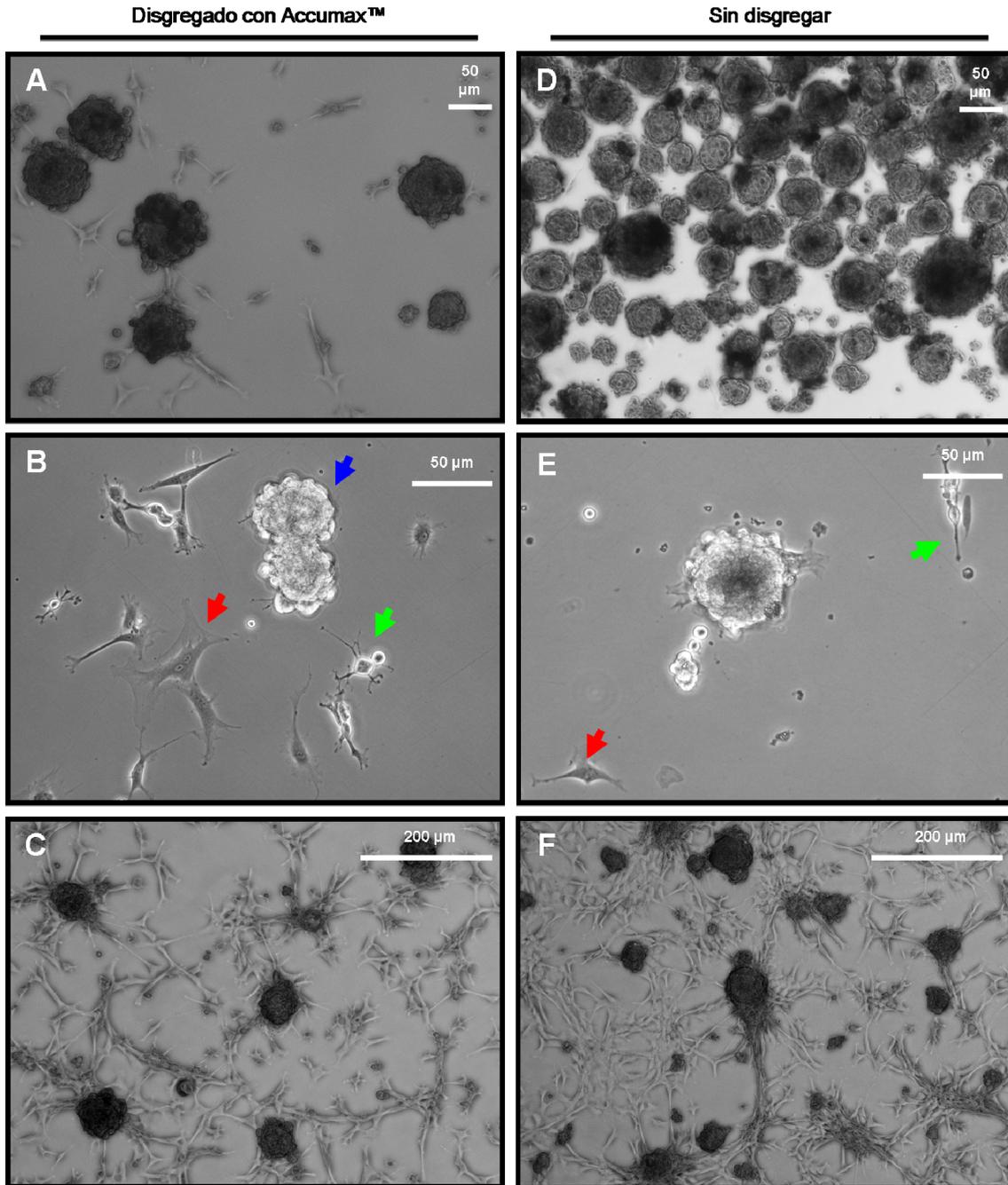


Figura 4.38. Expansión de las estructuras similares a neuroesferas tanto después de ser disgregadas enzimáticamente como sin disgregar. Después de disgregar las ESNs con Accumax™ solution se observa la formación de ESNs secundarias (B, flecha azul) pero, con el paso de los días se observan células adheridas débilmente a la placa de cultivo tanto con morfología fibroblástica (B y E, flecha roja) como neuroblástica (B y E, flecha verde). Si las ESNs se expanden sin disgregar mediante la renovación del 50% de medio de cultivo cada 5-7 días, se observa la obtención de un mayor número de ESNs por preparación (D) que en el caso anterior (A). Sin embargo, estas ESNs también comienzan a diferenciarse en estas condiciones (E) y acaban proliferando por toda la placa de cultivo (F), como ocurría en el caso anterior (C). Imágenes tomadas con el microscopio óptico con los objetivos de 4x (C y F), 10x (A y D) y 20x (B y E), respectivamente. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

4.5.2. Diferenciación de estructuras similares a neuroesferas en la matriz extracelular desarrollada

Una vez obtenido el cultivo de ESNs, se llevó a cabo su diferenciación sobre cubreobjetos en los que se había depositado previamente la matriz neural (nuevamente, en cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro situados en placas de 4 pocillos). Como en el caso de las neuroesferas de SVZ, estas ESNs (de entre 50 y 200 μm de diámetro) fueron seleccionadas con ayuda de una micropipeta de 200 μm en condiciones de esterilidad, y sembradas en cantidades similares en todas las matrices ensayadas, a razón de 5-10 ESNs por matriz. El protocolo de diferenciación neuronal-dopaminérgico que se utilizó en este caso es el mismo que se ilustró en la **Figura 4.23**. Como se mencionaba en el apartado 1.3.3.2.3 de la introducción, se encuentra bien descrito que factores neurotróficos como el NGF, el BDNF y la NT-3 potencian la diferenciación hacia el linaje neuronal de las células precursoras derivadas de piel, mientras que factores como la neuregulina-1 β y la forskolina potencian su diferenciación hacia el linaje glial. De esta forma se entiende que sólo se hayan utilizado NGF y BDNF en este protocolo de diferenciación. Se ha prescindido de la NT-3 porque se ha asumido que el papel de las netrinas liberadas por la matriz es suficiente para la diferenciación a linaje neural en combinación con el NGF y el BDNF.

4.5.2.1. Seguimiento de la diferenciación neuronal mediante tinción con un colorante vital fluorescente y microscopía de fluorescencia

En este caso, con el objetivo de seguir la adhesión y la diferenciación de las ESNs en la matriz en los primeros estadios, las ESNs fueron marcadas inmediatamente antes de su deposición con el colorante vital PKH67. Como se comentó en el apartado 3.5.5.1.3 de los materiales y métodos, PKH67 es un colorante fluorescente verde con largas colas alifáticas que se insertan en la zona lipídica de la membrana celular sin afectar a la integridad celular. Por ello, y a pesar de no ser un colorante específico para un determinado tipo celular, este marcaje sirve para seguir las células marcadas en su proceso de diferenciación en la matriz, mediante observación con el microscopio de fluorescencia.

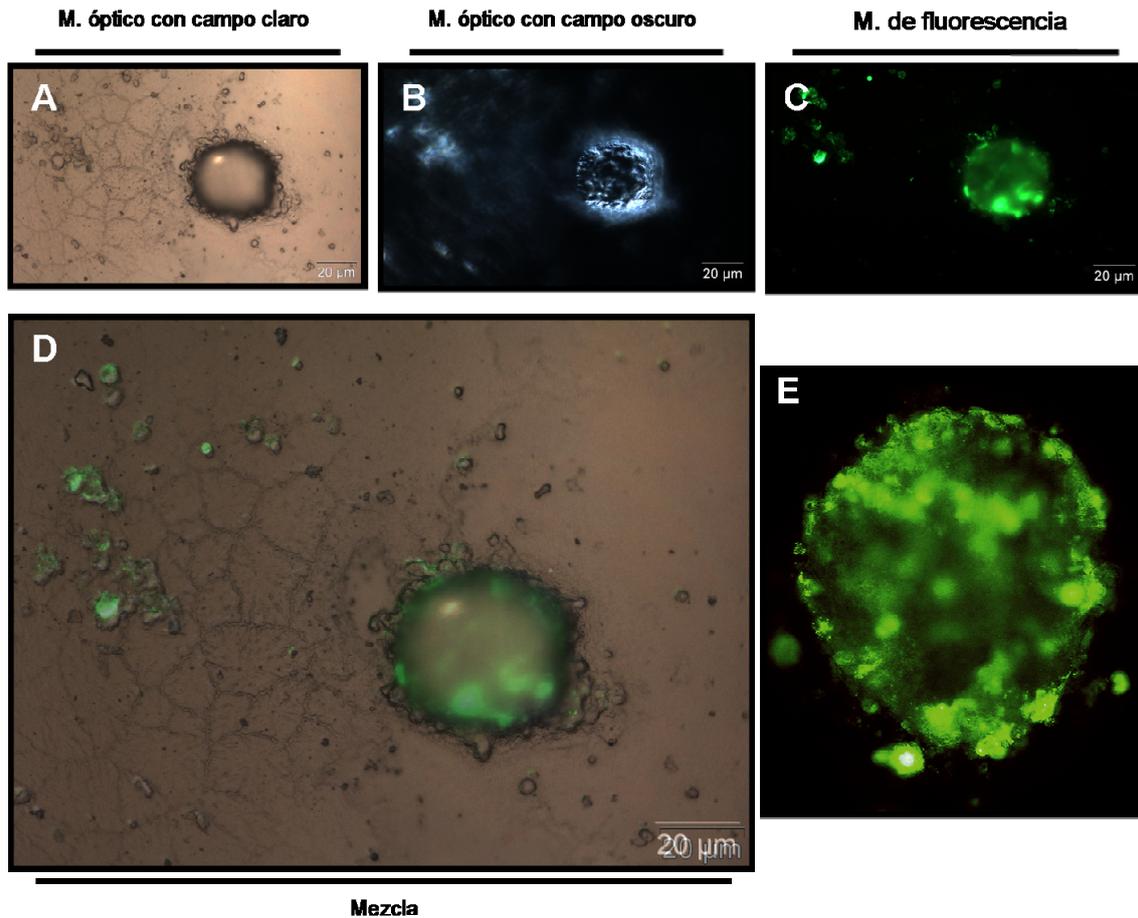


Figura 4.39. Adhesión de las estructuras similares a neuroesferas a la matriz después de 24 horas en condiciones de diferenciación. Las ESNs fueron marcadas con el colorante vital fluorescente PKH67 antes de ser depositadas en la matriz para su seguimiento mediante microscopía de fluorescencia (E). En el apartado D se observa la matriz (no fluorescente) en la que se adhiere la ESN (fluorescente). Esta imagen ha sido montada a partir de las imágenes mostradas los apartados A y C, respectivamente. En el apartado B se observa, gracias al contraste aportado por el campo oscuro del microscopio óptico, la rugosidad tanto de la matriz como de la ESN.

Como se puede observar en la **Figura 4.39**, dentro de las 24 horas siguientes a ser sembradas en las matrices con medio de diferenciación neuronal (con NGFβ y BDNF), las ESNs se adhieren a la matriz y ponen en marcha sus mecanismos de diferenciación. En la **Figura 4.40.A**, se observa que, 48 horas después de la adhesión, las células que las componen empiezan a migrar de forma centrífuga inducidas por las señales inductoras que reciben tanto de la matriz como del medio de cultivo. Después de 5 DIV en condiciones de diferenciación (**Figura 4.40.B**), se observa la colonización de la matriz circundante por células con aparente morfología neuronal, observada en este caso gracias a la emisión de fluorescencia y que, por lo tanto, derivan de las células que componían las ESNs (**Figura 4.40.C**).

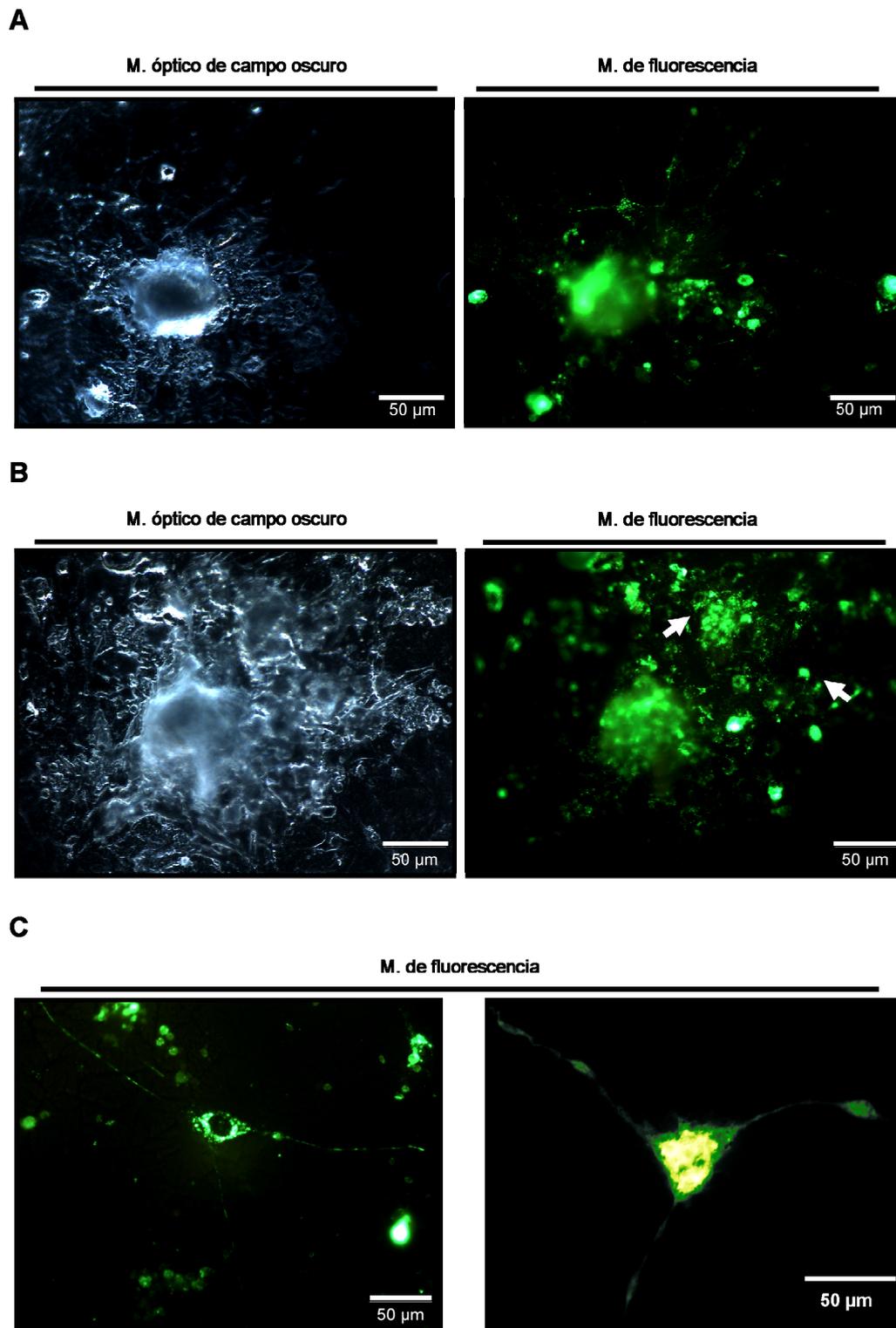


Figura 4.40. Colonización de la matriz por las células precursoras que componen las estructuras similares a neuroesferas a medida que ponen en marcha mecanismos de diferenciación neural. (A) El inicio de la migración radial centrífuga de las células precursoras que componen la ESN se produce 48 horas tras la adhesión de la misma a la matriz. (B) La colonización de la matriz que se observa 72 horas después es mayor y algunas de las células ya presentan una aparente morfología de neuronas inmaduras (se han utilizado las flechas blancas en la imagen derecha de B para indicar las células observadas con detalle en C). Imágenes tomadas, respectivamente, con el microscopio óptico (campo oscuro) y con el microscopio de fluorescencia.

4.5.2.2. Observación de la formación de redes neuronales mediante microscopía óptica

Las redes neuronales que se formaron en las matrices 10 días después de comenzar el proceso diferenciador se pueden observar en la **Figura 4.41**. En estas redes hay que destacar la presencia de dos tipos de células: (i) unas con una clara morfología de neuronas inmaduras, con un soma irregular y prolongaciones neuríticas (**Figura 4.41.A; flecha roja**), y (ii) otras con una morfología aplanada de su citoplasma y que no emiten prolongaciones neuríticas (**Figura 4.41.B; flecha azul**). Ambos tipos de células se localizan en distintos niveles como ocurría con las neuronas y los astrocitos diferenciados a partir de las células progenitoras neurales de SVZ.

Mediante tinción de Bodian se puede apreciar con más detalle la naturaleza de estas células. En la **Figura 4.42**, se observa que las células con morfología de neuronas inmaduras de la imagen anterior presentan un fuerte marcaje con proteínato de plata, lo que es indicativo de su naturaleza neurofibrilar; sin embargo, las células acompañantes quedan débilmente marcadas, siendo consideradas negativas para la tinción.

Aunque en estas diferenciaciones se haya prescindido del sustrato fotolitografiado, si se prueba a diferenciar ESNs en el soporte completo (fotolitografía + matriz) se observa (i) que el tamaño de los “valles” resulta apropiado para la entrada en ellos de las ESNs ($< 200 \mu\text{m}$) y (ii) que se forman unos flujos de células diferenciadas que son indicativos de la orientación que sufren las células cuando se diferencian. No se puede comprobar el fenotipo de estas células orientadas *in situ* en el soporte completo por el problema ya comentado anteriormente de la autofluorescencia del sustrato fotolitografiado.

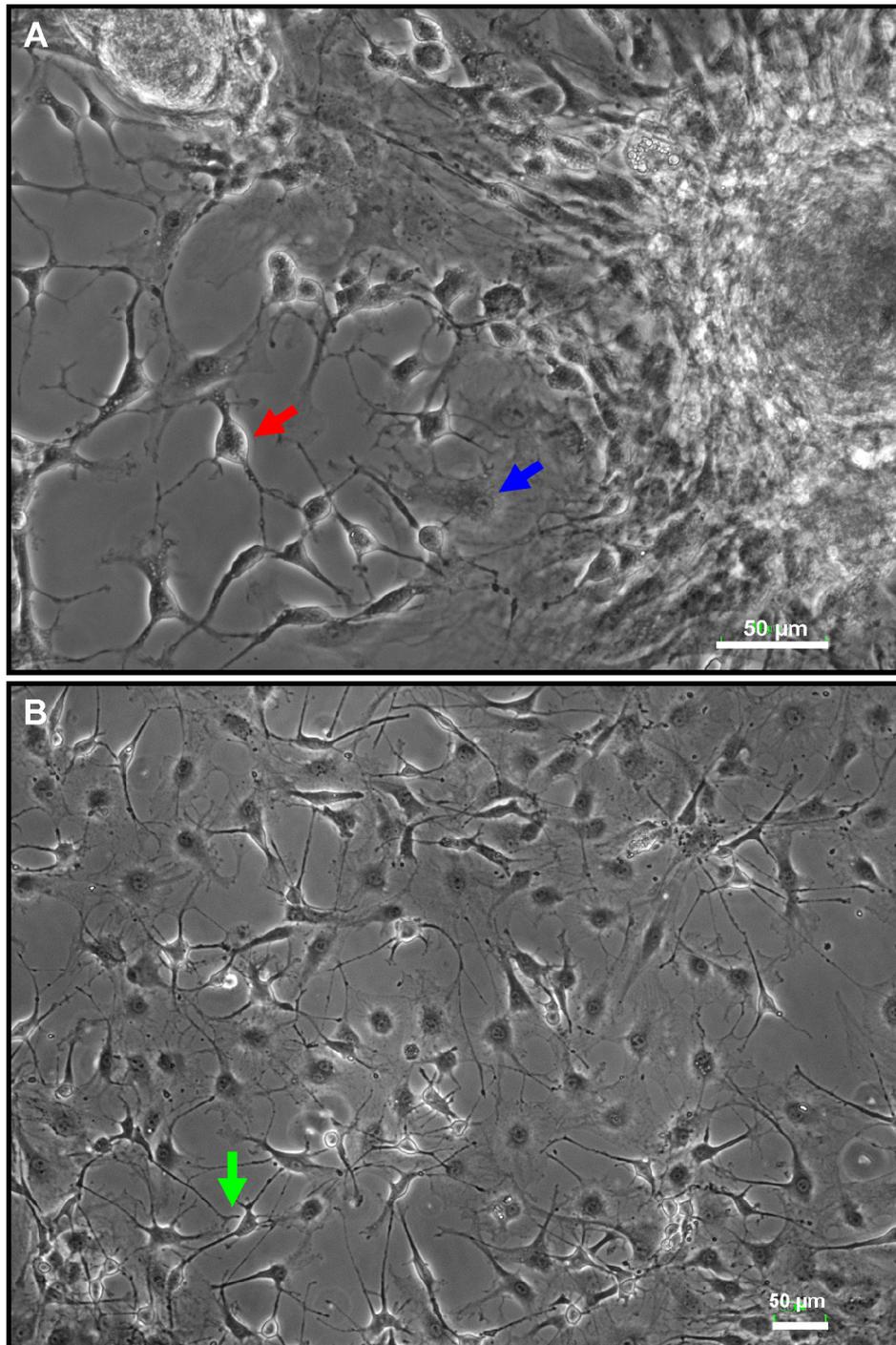


Figura 4.41. Red neural observada en la matriz después de 10 DIV en condiciones de diferenciación. Se observan células con una clara morfología de neuronas inmaduras (A, flecha roja) que emiten prolongaciones neuríticas que les permiten contactar con células adyacentes, pero también se observan células con un citoplasma aplanado y sin prolongaciones neuríticas, dispuestas por debajo de las anteriores (A, flecha azul) y cuya velocidad de proliferación (más rápida que la de las células anteriores) hace pensar en células de tipo fibroblástico que dan soporte tanto estructural como trófico a las anteriores, contribuyendo también a la renovación de la matriz. Nótese en B (flecha verde) cómo el cono de crecimiento de una de las células aparentemente neuronales intenta conectar con otra célula próxima similar. Nuevamente, el efecto de las netrinas liberadas por la matriz parece resultar considerable en el desarrollo de las prolongaciones neuríticas observadas en tan pocos días de cultivo. Imágenes tomadas con el microscopio óptico y representativas de 3 experimentos independientes.

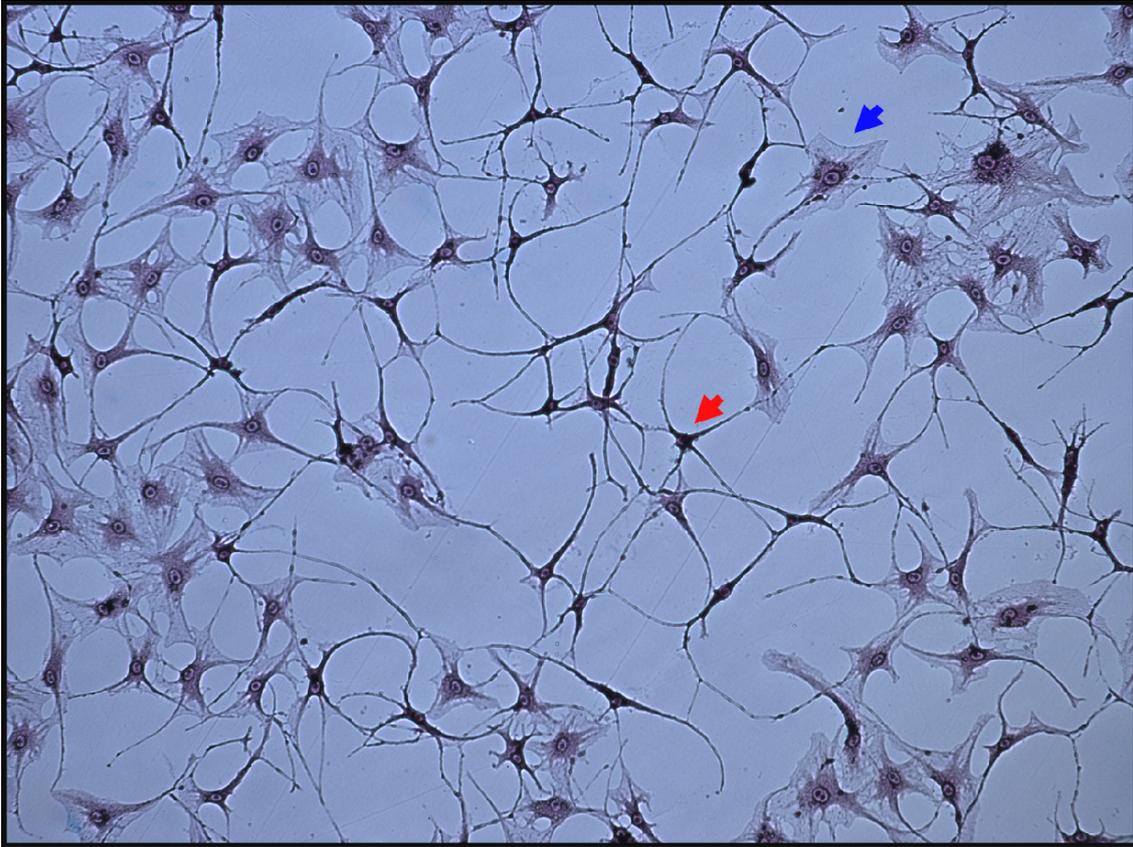


Figura 4.42. Tinción de Bodian de la red neural observada en la matriz después de 10 DIV en condiciones de diferenciación. Las células con morfología de neuronas inmaduras (flecha roja) resultan positivas a la tinción con proteinato de plata, lo cual es indicativo de su naturaleza neurofibrilar. Nótese que en esta imagen se hace evidente el citoplasma aplanado y sin prolongaciones neuríticas de las células que no presentan morfología neuronal (flecha azul). Imagen tomada con el microscopio óptico y representativa de 3 experimentos independientes.

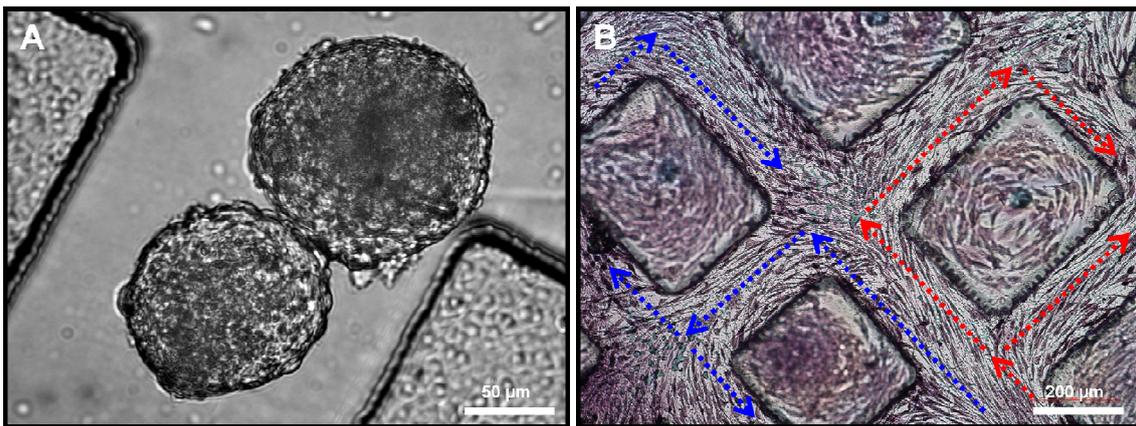


Figura 4.43. Diferenciación de estructuras similares a neuroesferas en el sustrato fotolitografiado, con la consecuente formación de flujos celulares. (A) El tamaño de los “valles” resulta apropiado para la diferenciación en ellos de estructuras similares a neuroesferas ($< 200 \mu\text{m}$). (B) Se forman unos flujos de células diferenciadas que son indicativos de la orientación que sufren las células cuando se diferencian (flechas rojas, flujo celular 1; flechas azules, flujo celular 2). Nótese que en ésta imagen se observan células sobre los “picos” del sustrato fotolitografiado porque no se ha digerido previamente la matriz. Imágenes tomadas con el microscopio óptico.

4.5.2.3. Análisis de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y dopaminérgica mediante marcajes inmunofluorescentes y microscopía confocal

Con el fin último de confirmar la naturaleza neural de las células que presentan una aparente morfología neuronal en las preparaciones, se realizó un marcaje específico de estas células con el anticuerpo contra nestina a los 10 DIV. Como se puede observar en la **Figura 4.44**, estas células resultan nestina positivas ($42,5\% \pm 3,5\%$) y conviven en la preparación con otras células nestina negativas, que se corresponden perfectamente con las células comentadas anteriormente y cuyos núcleos se observan en esta figura.

Continuando con el cultivo, a los 14 DIV se observa que las células nestina negativas han proliferado en gran medida sobre la matriz, mientras que las células nestina positivas permanecen en bajo número sobre estas últimas ($12,5\% \pm 2,1\%$), a pesar de que se ha producido un aumento significativo del tamaño de sus prolongaciones neuríticas (**Figura 4.45**).

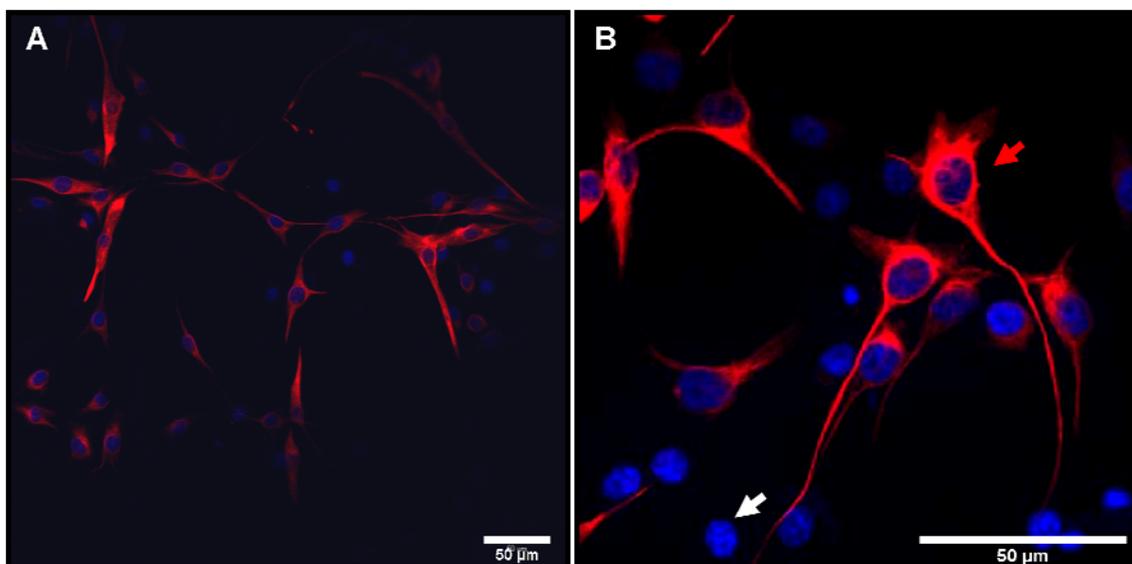


Figura 4.44. Expresión de nestina por las células con aparente morfología neuronal que forman la red neural observada en la matriz después de 10 días en condiciones de diferenciación. La expresión de esta proteína se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra nestina y un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 546 (rojo). Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes. Nótese que junto a estas células nestina positivas (flecha roja) se observan los núcleos de otras células nestina negativas (flecha blanca) (probablemente las células que no emiten prolongaciones neuríticas comentadas anteriormente).

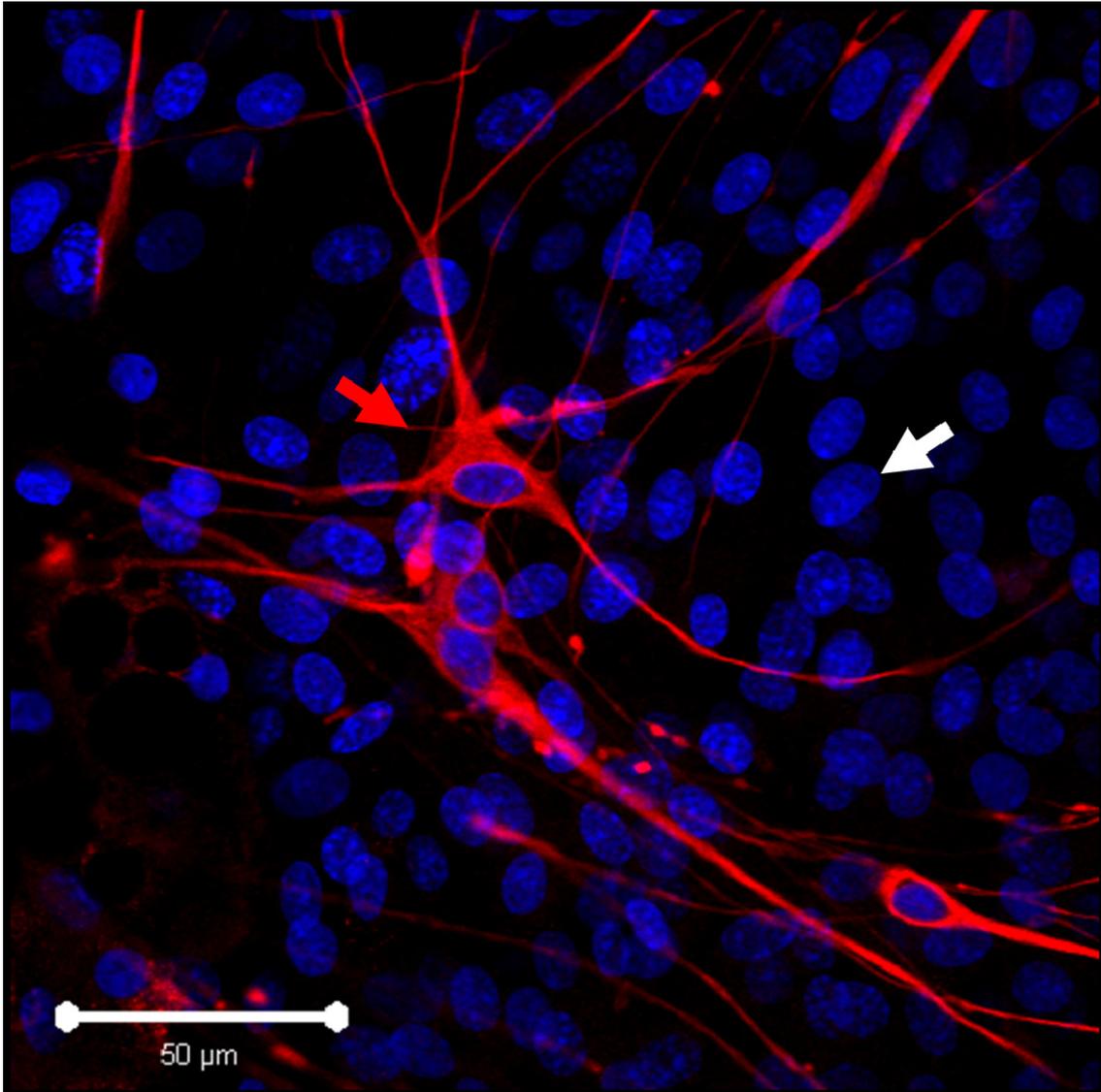


Figura 4.45. Incremento del tamaño de las prolongaciones neuríticas de las células nestina positivas que se observan en la matriz después de 14 días en condiciones de diferenciación. La expresión de esta proteína se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra nestina y un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 546 (rojo). Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Nótese que las células nestina negativas (flecha blanca) han proliferado rápidamente formando una monocapa de células nodrizas sobre la matriz (que apreciamos gracias a la observación de sus núcleos).

Para confirmar la diferenciación consecuente de las células nestina positivas a neuronas inmaduras a los 20 DIV, se realizó una inmunotinción contra β -III-tubulina. Como se observa en la **Figura 4.46.A**, una baja proporción de las células diferenciadas sobre la matriz resultan β -III-tubulina positivas ($7,5\% \pm 1,9\%$) marcaje indicativo de su fenotipo neuronal inmaduro. Estas células, al igual que las células nestina positivas, presentan largas prolongaciones neuríticas. Como era de esperar, por debajo de estas células se observa una monocapa bastante

confluente de células β -III-tubulina negativas. Si se realiza una inmunotinción contra la proteína α -SMA (del inglés, *α -Smooth Muscle Actin*; proteína del citoesqueleto de células mesodérmicas que se expresa en células miofibroblásticas y musculares lisas), se observa que estas células son α -SMA positivas, lo que indica su naturaleza miofibroblástica, concordante con la capacidad de las células precursoras de piel de diferenciarse a células tanto de linaje ectodérmico como mesodérmico (**Figura 4.46.B**).

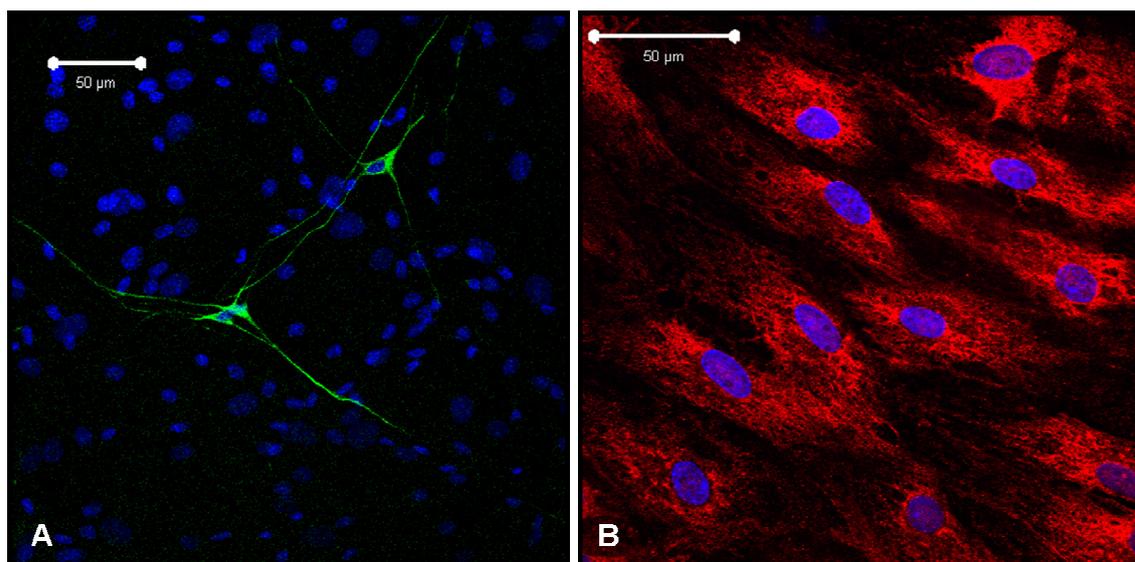


Figura 4.46. Expresión de β -III-tubulina (A) y α -SMA (B) por las células con morfología neuroblástica y por las células con apariencia fibroblástica, respectivamente, después de 20 días en condiciones de diferenciación. La expresión de estas proteínas se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis confocal, utilizando un anticuerpo primario contra β -III-tubulina y α -SMA, respectivamente, y un anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde) y el fluoróforo Alexa Fluor 546 (rojo, respectivamente). Los núcleos se visualizan con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes.

Debido a la elevada tasa de proliferación de estas células, los cultivos empiezan a degenerar a partir de los 20 DIV en diferenciación y, al realizar marcajes contra MAP2 y TH, no se obtienen resultados positivos en ninguno de los casos.

A modo de resumen, se muestran los marcajes observados en las células a diferentes días de cultivo en condiciones de diferenciación (**Tabla 4.3**).

Tiempo de diferenciación	Nestina	β-III-tubulina	α-SMA
10 DIV	++	-	
14 DIV	+	-	+++
20 DIV	-	+	+++

(-) ausencia de marcaje; (+) presencia de marcaje en menos del 15% de las células totales; (++) presencia de marcaje en menos del 50% de las células totales; (+++) presencia de marcaje en más del 50% de las células totales.

Tabla 4.3. Resumen de los marcajes observados a lo largo de la diferenciación de las células precursoras derivadas de piel de rata adulta.

CAPÍTULO V
DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La investigación actual tanto en el área de los biomateriales como en el área de las células madre/progenitoras está proporcionando nuevas estrategias de reconexión de las vías nerviosas en el Sistema Nervioso dañado, tanto central como periférico (Dalton y Mey, 2009; Orive y col., 2009). Resulta conocido que las características morfológicas y funcionales de las células se encuentran afectadas por diferentes factores de su entorno, incluyendo las interacciones celulares, las interacciones con la matriz extracelular, los estímulos solubles y las fuerzas mecánicas. Por ello, la capacidad de recrear este microambiente celular *in vitro* resulta de vital importancia tanto para comprender el comportamiento y la funcionalidad de las células *in vivo* como para obtener avances significativos en Ingeniería Tisular (Schenke-Layland y col., 2009). De hecho, actualmente, el empleo de matrices tisulares biodegradables con células incorporadas está siendo aplicado satisfactoriamente a una amplia variedad de tejidos, incluyendo el tejido nervioso. Sin embargo, resulta necesario desarrollar nuevos soportes tisulares que combinen la resistencia de los polímeros sintéticos biodegradables con la neutralidad inmunológica proporcionada por los componentes de la propia matriz extracelular, evitando así los problemas de resistencia mecánica e inflamatorios, respectivamente, al ser utilizados *in vivo*. Por ello, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un nuevo soporte polimérico con componentes de matriz extracelular neural, cuya funcionalidad en la diferenciación neuronal especializada ha sido validada *in vitro* con varios tipos celulares tanto de origen neural como no neural. Además, teniendo en cuenta que el control del microambiente celular resulta de gran importancia en el desarrollo de biosensores, de sistemas de testado masivo y de liberación de fármacos, y de modelos para estudios básicos en Biología Celular (Falconnet y col., 2006), el soporte desarrollado resulta de gran utilidad en estas aplicaciones.

5.1. LA COMBINACIÓN DE MICROESTRUCTURAS DE SUPERFICIE Y DE COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR NEURAL GUÍAN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL *IN VITRO*

Diversos estudios sobre el efecto de las señales topográficas de los sustratos en el inicio y en el control de la adhesión, la proliferación, la orientación y la migración de las células sobre superficies biocompatibles, demuestran que las microgeometrías de superficie influyen en el comportamiento celular y en el crecimiento neurítico, afirmando que la matriz extracelular presenta las señales topográficas y químicas que necesitan las células embebidas en ella para diferenciarse y llevar a cabo sus funciones (Lim y Donahue, 2007; Norman y col., 2009; Rao y

Winter, 2009). Así, por ejemplo, los sustratos que presentan surcos grabados orientan a las células -que crecen de forma paralela a la dirección de los surcos-, además de mejorar su adhesión al sustrato grabado en comparación con el liso, permitiendo el crecimiento celular de manera organizada (Lim y Mao, 2009). En este sentido, son particularmente interesantes los estudios que demuestran la habilidad de las superficies microestructuradas en influir en el comportamiento celular y, concretamente, en el neuronal. El grupo de Kleinfeld fue el primero en producir, en el año 1988, sustratos de vidrio fotolitografiados para el cultivo de neuronas disociadas (Kleinfeld y col., 1988). Desde entonces, se han realizado diversos estudios sobre la mejor forma de crear sustratos microdiseñados capaces de guiar el desarrollo neuronal. Concretamente, en el caso del cultivo de neuronas *in vitro*, el uso de materiales con microestructuras en su superficie combinados con recubrimientos superficiales adhesivos ha permitido a los investigadores controlar con precisión la posición y orientación de las neuronas individuales (Chang y col., 2008). En este sentido, existe un interés generalizado por obtener patrones organizados de neuronas con sus axones y dendritas dispuestas a lo largo de geometrías precisas para formar circuitos neuronales simples que puedan ser alineados con ciertas estructuras como los *arrays* de microelectrodos, tanto tridimensionales como planos (Francisco y col., 2007; Lacour y col., 2008; Jaber y col., 2009; Williams, 2009; Carabelli y col., 2010).

Por todo ello, una aproximación prometedora en la manipulación del microambiente celular es el uso de tecnologías de fabricación a microescala como, por ejemplo, la microestampación por contacto o la fotolitografía, ya que permiten trabajar con entornos físicos de dimensiones comparables a los de las células (Hook y col., 2009). Estas técnicas de modelado a microescala también resultan muy útiles para su aplicación como biosensores o como interfaces neuroelectrónicas que sirvan como plataformas de cultivo neuronal aplicables como modelos para investigación básica. Así, los sistemas de cultivo desarrollados con materiales cada vez más sofisticados y con microgeometrías diseñadas en su superficie, están adquiriendo progresivamente una mayor importancia en el campo de los biomateriales con aplicación en Ingeniería Tisular. Sin embargo, muchos polímeros utilizados en estos desarrollos requieren procesos de polimerización y condiciones de mantenimiento que los hacen inadecuados a la hora de ser utilizados con sistemas biológicos, ya que no se encuentran optimizados para interactuar con las células y no presentan ni la composición ni la funcionalidad que le corresponderían a una verdadera matriz extracelular. Naturalmente, las técnicas de microprocesado deben permitir la fabricación de sustratos diseñados de una manera precisa y reproducible para su fabricación en grandes volúmenes al mismo tiempo, y deben estar diseñados con materiales biocompatibles que permitan el cultivo de las neuronas sobre ellos, su

alineación geométrica y su mantenimiento en cultivo durante largos periodos de tiempo (también en almacenamiento) (Delcroix y col., 2010).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el sustrato polimérico desarrollado en este trabajo responde a las necesidades descritas, presentando dos componentes complementarios: (i) una superficie con microgeometrías capaces de albergar y dirigir a las células en proceso de diferenciación y (ii) una matriz extracelular desarrollada con proteínas y moléculas inductoras de la diferenciación neuronal, semejante a la propia matriz extracelular presente en el tejido neural en desarrollo.

Respecto a la técnica de microfabricación utilizada, se ha demostrado que la fotolitografía permite generar sustratos con las microgeometrías deseadas en su superficie, siendo los únicos requisitos para ello la puesta a punto de unas condiciones de proceso adecuadas y un tratamiento químico previo de la superficie a fotolitografiar.

Respecto a la formulación de la matriz extracelular desarrollada, la presencia de colágeno, laminina, entactina y ciertos proteoglicanos en la composición basal de esta matriz proporciona las señales que las células necesitan para anclarse al sustrato y comenzar su proceso de diferenciación. Es importante señalar que, concretamente, el ácido hialurónico es un polisacárido aniónico que forma complejos electrostáticos con moléculas catiónicas como el colágeno o la polilisina (Pan y col., 2009); por ello, la adsorción iónica del colágeno altera la repulsión celular inherente del ácido hialurónico (porque lo dopa con cargas positivas que actúan atrayendo a las cargas negativas de las membranas celulares) (Takahashi y col., 2009), permitiendo la incorporación de esta molécula en esta matriz tanto para conferir la capacidad de hidratación como para permitir la adhesión de las células a la misma (Wang y Spector, 2009). Además de la composición específica, el grosor concreto de la matriz, conferido a través de una dilución 1:3 de la mezcla inicial, permite no sólo la deposición de la misma en toda la superficie del sustrato fotolitografiado de una manera homogénea, sino que confiere al sustrato la capacidad diferenciadora adecuada para diversos tipos celulares (como han demostrado recientemente Leipzig y Shoichet, el grosor de una matriz es fundamental en la diferenciación celular; Leipzig y Shoichet, 2009). Por otro lado, las netrinas, moléculas que actúan como quimioatrayentes celulares y neuríticos, actúan como factores guía de la diferenciación, tal y como ocurre en el tejido neural en desarrollo (O'Donnell y col., 2009). En cualquier caso, la posibilidad de incorporar en la matriz desarrollada moléculas biológicamente activas estimuladoras de la diferenciación neuronal hacia un linaje determinado (en este caso dopaminérgico), tanto de las células que se incorporen en ella como de las células adyacentes en el lugar de trasplante, resulta prometedor para su uso en Terapia Celular combinada con

determinados factores neurotróficos (como el GDNF). De hecho, estudios recientes demuestran que la cantidad necesaria de esas moléculas para inducir el mismo tipo de respuesta al ser añadidas en una matriz en comparación con la adición en suspensión es menor, lo que optimiza los sistemas de diferenciación *in vitro* (Bhang y col., 2009; Valmikinathan y col., 2009). Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo al estudiar la liberación de Shh incorporado en la matriz.

Respecto a la estructura física, la matriz extracelular desarrollada presenta una estructura fibrosa y porosa adecuada para albergar la diferenciación neuronal, similar a la observada en otras matrices desarrolladas recientemente para el cultivo de células neuronales utilizando biomateriales sintéticos y naturales (Christopherson y col., 2009; Bettinger y col., 2009). Las fibras, mayoritariamente de laminina, facilitan la adhesión de las células en proceso de diferenciación a la matriz, mientras que los poros facilitan la penetración y el movimiento tanto de las células como de sus prolongaciones neuríticas a través de esta estructura tridimensional. Además, esta red fibrosa tiende a aumentar su volumen en el medio de cultivo, gracias a la hidratación proporcionada por el ácido hialurónico, lo que facilitará, a su vez, el movimiento celular y la extensión neurítica.

En base a estas observaciones, se afirma que tanto la microgeometrías de superficie como la matriz extracelular neural desarrolladas presentan una estructura y composición adecuadas para albergar la diferenciación neuronal especializada *in vitro*.

5.2. LA FORMACIÓN DE REDES PSEUDO-NEURONALES DOPAMINÉRGICAS POR PARTE DE LA LÍNEA CELULAR PC12 DEMUESTRA LA HABILIDAD DEL SOPORTE DESARROLLADO DE INDUCIR LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL GUIADA

A pesar de que a lo largo de los años se han utilizado distintos tipos de cultivos celulares como modelos de diferenciación dopaminérgica *in vitro* (células cromafines, células de neuroblastoma, células de feocromocitoma, células de cresta neural, células mesencefálicas fetales), uno de los modelos más atractivos y ampliamente utilizados sigue siendo la línea celular PC12. Esta línea celular empezó a utilizarse en 1976, cuando Grenne y Tischler establecieron una línea celular clonal a partir de un trasplante de feocromocitoma de rata (Grenne y Tischler, 1976). Es una línea celular muy utilizada en estudios de neuritogénesis porque, además de ser una línea fácil de cultivar en condiciones adherentes, presenta una

capacidad de respuesta reversible al NGF (Foley y col., 2005). Así, en presencia de NGF, estas células cesan su proliferación y emiten extensiones y bifurcaciones neuríticas, adoptando una morfología neuronal típica (en este trabajo se hace referencia a una morfología pseudo-neuronal por no tratarse de verdaderas neuronas), con despolarización de la membrana y potenciales de acción característicos (Castillo y col., 2001). Si se elimina el NGF, las neuritas acaban degenerando y las células vuelven a dividirse (aunque se puede llegar a conseguir una diferenciación irreversible si se añaden análogos de la adenina en el medio de cultivo). Funcionalmente hablando, las células PC12 contienen catecolaminas y las enzimas que las sintetizan (tirosina hidroxilasa, dopa descarboxilasa y dopamina β -hidroxilasa) y las metabolizan (monoamino oxidasa y catecol-O-metiltransferasa). Principalmente, son productoras de dopamina y, al contrario que las células adrenérgicas, no sintetizan adrenalina ya que carecen de feniletanolamil N-metiltransferasa. El tratamiento con NGF no altera los contenidos de catecolaminas ni las correspondientes actividades enzimáticas.

En este trabajo, el uso de la línea celular PC12 permite corroborar el efecto inductor de la diferenciación neuronal dopaminérgica del soporte polimérico desarrollado (en ausencia de NGF). Trabajos recientes demuestran la influencia de las microgeometrías (Mahoney y col., 2005), de las nanogeometrías (Cao y col., 2009; Koh y col., 2008; Xie y col., 2009; Ferrari y col., 2010), de los polímeros conductores (Green y col., 2009), de los grupos funcionales (Lamour y col., 2009; Ren y col., 2009), de las moléculas y de los péptidos inmovilizados superficialmente (Lamour y col., 2010; Cooke y col., 2010) en la diferenciación y extensión neurítica tanto de estas células como de células madre/progenitoras neurales. Concretamente, los canales del soporte desarrollado en este trabajo (“valles”) presentan un tamaño suficiente para albergar 2-3 células neuronales, así como un tamaño mínimo para que estas células emitan sus prolongaciones de forma paralela a los “picos” de resina. Esta microgeometría en combinación con la acción sinérgica de la matriz depositada en los “valles”, permite el desarrollo de amplias redes pseudo-neuronales -independientemente de la presencia o ausencia de NGF-, en las que las células diferenciadas presentan un fenotipo dopaminérgico ($84,4 \% \pm 7,5\%$ de células TH⁺).

Un punto importante determinado al cultivar las células PC12 sobre el soporte desarrollado ha sido la concentración celular apropiada para conseguir una diferenciación óptima en estas condiciones de cultivo. Es bien conocido que la densidad celular con la que se cultivan las células en las geometrías de un sustrato condiciona la forma y el comportamiento de las células en él (Ruiz y col., 2008). Por ejemplo, las células HUCB-NSC cultivadas a alta concentración sobre sustratos microdiseñados con polilisina presentan una morfología redondeada y no emiten prolongaciones neuríticas -rasgos indicativos de que permanecen en

estado indiferenciado-, mientras que si son cultivadas a baja concentración presentan una morfología aplanada con emisión de prolongaciones neuríticas siguiendo las direcciones gradadas en la microgeometría -rasgos indicativos de que las células se diferencian-. Por ello, se ha demostrado que la concentración más apropiada para conseguir una diferenciación óptima de células PC12 sobre el soporte desarrollado es de 40.000 células/ml, utilizando medio de diferenciación de PC12 completo (con NGF).

Respecto a los contactos establecidos entre las células que conforman las redes pseudo-neuronales observadas, si éstos fueran funcionales (con establecimiento de sinapsis funcionales) y se produjera un estímulo celular en un punto de la misma (por ejemplo, una despolarización de la membrana con cloruro potásico), debería haber una liberación de neurotransmisores al medio, en base a la expresión dopaminérgica observada mediante inmunotinción.

En base a estas observaciones se afirma que el soporte desarrollado promueve eficientemente la diferenciación guiada de células PC12 hacia fenotipos pseudo-neuronales y dopaminérgicos.

5.3. LAS REDES NEURONALES MADURAS DE CÉLULAS DE HIPOCAMPO DE RATA EMBRIONARIA DIFERENCIADAS EN TAN SÓLO 8 DÍAS SOBRE LA MATRIZ CONFIRMAN SU UTILIZACIÓN EFICIENTE CON CÉLULAS PRIMARIAS

Con el objetivo de demostrar que la potencialidad de la matriz en la inducción de la diferenciación neuronal es ampliable no sólo a modelos de líneas celulares sino también a células primarias, se ha explorado la respuesta de varias células primarias, en diferentes estadios de desarrollo y potencialidad, en cuanto a su capacidad de diferenciación neuronal y dopaminérgica en el soporte desarrollado.

La formación de redes neuronales maduras por parte de las células de hipocampo de rata embrionaria en tan sólo 8 días de cultivo en condiciones de diferenciación sobre la matriz (frente a los, como mínimo, 14 días de cultivo sin matriz, Arnaiz-Cot y col., 2008), demuestra que su formulación resulta eficiente en la diferenciación neuronal de células determinadas a linaje neuronal en los primeros estadios de desarrollo.

Un punto importante a comentar de las matrices preparadas para este tipo de cultivos primarios, es la incorporación en su composición basal del proteoglicano condroitín 4-sulfato. Como ya se ha comentado en este trabajo, los proteoglicanos son moléculas de alto peso molecular involucradas en la regeneración axonal y en la plasticidad neuronal post-traumática en el SNC (Galtrey y Fawcett, 2007; Gu y col., 2009). Concretamente, los proteoglicanos de tipo condroitín sulfato son moléculas de la matriz extracelular que se expresan en el Sistema Nervioso en desarrollo y adulto y que ejercen un papel inhibitor de la regeneración en el Sistema Nervioso Central (Crespo-Santiago, 2004). Así, cuando se produce una lesión en el Sistema Nervioso Central, los astrocitos reactivos forman una cicatriz glial en el punto lesionado, lo cual induce un aumento en la expresión de condrotín sulfato en la zona próxima a la barrera hematoencefálica lesionada. Este aumento de condrotín sulfato detiene la regeneración e induce la distrofia de los conos de crecimiento neuronales (Busch y Silver, 2007). A pesar de ello, diversas publicaciones describen el papel neuroprotector de un tipo concreto de condrotín sulfato, el condroitín 4-sulfato (CHS-A). Concretamente, el grupo del Dr. Antonio García García del Instituto Teófilo Hernando de Madrid (UAM) está interesado en vislumbrar el efecto neuroprotector de este proteoglicano y de sus dímeros en las células de hipocampo en proceso de diferenciación.

Por ello, y en base a un trabajo colaborativo con este grupo, se ha estudiado el efecto de incorporar el CHS-A en la composición basal de la matriz extracelular desarrollada al cultivar células de hipocampo de rata embrionaria sobre ella. Estudios de viabilidad celular posteriores al tratamiento con diferentes agentes tóxicos de las células hipocampales diferenciadas sobre la matriz con CHS-A demuestran el efecto neuroprotector ejercido por el mismo en la supervivencia neuronal, probablemente debido a su capacidad de secuestrar iones metálicos que reducen el estrés oxidativo. Además, respecto a la concentración a la que el condroitín 4-sulfato debe encontrarse en la matriz, parece que debe ser por lo menos de 5 mg/ml para observarse un efecto neuroprotector significativo.

5.4. LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA SOBRE LA MATRIZ DESARROLLADA A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS DE ZONA SUBVENTRICULAR DE RATA NEONATA MUESTRA MÁS DE UN 80% DE EFICIENCIA

Uno de los principales objetivos que se persiguen en muchos laboratorios de todo el mundo es la obtención de neuronas gabaérgicas y dopaminérgicas a partir de células

madre/progenitoras de una manera eficaz, controlada y homogénea, con el fin de trasplantarlas en modelos animales de diferentes enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, Enfermedad de Huntington y Enfermedad de Parkinson) y, posteriormente, en seres humanos (Lindvall y col., 2009).

La potencialidad de una célula madre/progenitora depende de su origen, es decir, tanto del estadio de desarrollo en el que se encuentre como de la zona del organismo en la que resida (Temple, 2001). Además, las señales que una célula madre/progenitora recibe de su entorno (tanto bioquímicas como espaciales y mecánicas) determinan su proliferación o diferenciación, por lo que un sustrato de cultivo con unas características físico-químicas concretas influye decisivamente en su comportamiento (Martínez-Ramos y col., 2008, Discher y col., 2009). Trabajos recientes demuestran la capacidad de diferenciación de células madre/progenitoras neurales sobre sustratos poliméricos con formación de sinapsis funcionales entre ellas (Xiong y col., 2009). Además, en estos trabajos también se apunta la importancia de su combinación con factores neurotróficos específicos.

Las células madre/progenitoras se encuentran localizadas en microambientes concretos que controlan su comportamiento celular a través de señales presentes en ellos (Giachino y col., 2009). Por lo tanto, son estas señales externas -que provienen de factores solubles, de interacciones intercelulares y/o de interacciones entre las células y la matriz extracelular-, las que las mantienen en estado indiferenciado o las inducen a diferenciarse en linajes celulares concretos. Concretamente, la matriz extracelular, además de dar soporte estructural, secuestra, modula y potencia la acción de ciertos factores solubles presentes en ella. Por lo tanto, el cultivo de células progenitoras/precursoras neurales en matrices extracelulares tridimensionales con componentes similares a la propia matriz extracelular neural representa un medio eficaz para el desarrollo de nuevos tejidos neurales trasplantables (Cheng y col., 2009).

A lo largo de los años, se han desarrollado diversas estrategias para conseguir una diferenciación eficaz de neuronas dopaminérgicas (Arenas, 2002). Así, se han probado distintas fuentes de obtención de células neurales y distintos protocolos de diferenciación con distintos componentes, buscando en todo momento simular el proceso de desarrollo natural de las neuronas dopaminérgicas *in vivo*. La estrategia utilizada en este trabajo de combinar la matriz extracelular -formada tanto por proteínas estructurales básicas como por factores guía de extensión neurítica que se expresan durante el desarrollo embrionario-, con un medio de cultivo rico en factores neurotróficos y factores ventralizantes -y que también se expresan durante el propio desarrollo embrionario de las neuronas dopaminérgicas- resulta efectiva en la

diferenciación de células progenitoras neurales obtenidas a partir de una zona cerebral descrita como neurogénica en el cerebro adulto.

Tal y como se describe en la literatura (Ahmed, 2009), la técnica utilizada en este trabajo para el aislamiento y enriquecimiento de células precursoras neurales a partir de la zona subventricular de ratas neonatas (P2-P3) ha sido el cultivo de neuroesferas. Las neuroesferas son estructuras formadas por células madre/progenitoras neurales en diferentes estadios de potencialidad y determinación, que se originan cuando estas células son mantenidas en condiciones de cultivo no adherentes (en ausencia de suero) y en presencia de dos factores mitogénicos claves, el EGF y el FGF2. Debido al contacto y fusión de neuroesferas, debe existir un compromiso entre el número de células que se ponen en cultivo tras el aislamiento y la superficie donde se realiza el cultivo, ya que está bien descrito que los contactos celulares resultan importantes para el inicio de la formación de las neuroesferas, pero que un exceso de neuroesferas formadas en los primeros días de cultivo conduce a la obtención de neuroesferas envejecidas que no resultan beneficiosas en el proceso de diferenciación siguiente. También resulta conocido que, además del programa genético que una célula tiene activado durante su diferenciación, es el entorno en el que se encuentra esa célula el que decide en gran medida su fenotipo neuronal. Así, determinados factores han demostrado su efecto en la determinación neuronal: mitógenos (EGF, FGF2), factores neurotróficos (NGF, BDNF, NT3, GDNF), concentración de suero, densidad celular, concentración de oxígeno, hormonas, etc. Concretamente, la matriz extracelular provoca cambios en el citoesqueleto celular y, en función de la tensión mecánica generada, la célula adopta una determinada forma y estructura. A nivel molecular, la reorganización del citoesqueleto en respuesta a la matriz extracelular se acompaña de la activación de determinadas cascadas de señalización intracelulares que determinan la funcionalidad de las células (Goldmann, 2002). Si esto se extrapola al caso de las células madre/progenitoras, una determinada matriz extracelular puede influir en la célula madre generando su determinación hacia un linaje celular concreto, en función de su potencialidad.

Numerosos grupos de investigación han demostrado la multipotencialidad de las células progenitoras neurales de zona subventricular de rata. Sin embargo, la proporción de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos obtenidos a partir de ellas no siempre son las mismas (Chen y col., 2007). Por ejemplo, si las neuroesferas de rata se diferencian en polisilina con DMEM/F12 suplementado con B27 Supplement se obtiene un 3% de neuronas (β -III-tubulina⁺), un 9% de astrocitos (GFAP⁺) y un 20% de oligodendrocitos (GalC⁺) tras 7 días de diferenciación. Sin embargo, si se diferencian en poliornitina/laminina con Neurobasal Medium suplementado con B27 Supplement y FGF2 se obtiene un 22% de neuronas (β -III-tubulina⁺), un 12% de astrocitos (GFAP⁺) y un 1% de oligodendrocitos (GalC⁺) en los mismos días de diferenciación. Estos

datos indican que la proporción de los tres tipos de fenotipos neurales diferenciados a partir de las células progenitoras neurales de zona subventricular depende en gran medida de las condiciones de diferenciación, incluyendo tanto el sustrato como los componentes del medio de cultivo en el que se lleva a cabo la diferenciación (Chen y col., 2009). La diferencia entre estudios previos y el presente estudio de diferenciación de células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata radica en la estructura y composición del sustrato utilizado en la diferenciación. La mayor eficacia del medio de cultivo basal utilizado (NeuroCult[®] NS-A Basal Medium suplementado con NeuroCult[®] NS-A Proliferation Supplements) respecto a otros medios en la diferenciación neuronal de células primarias del SNC ha sido demostrada previamente (Mak y col., 2009). Además, el medio de cultivo utilizado durante los 35 días de cultivo *in vitro* -en una primera etapa, suplementado únicamente con los factores neurotróficos NGF y BDNF, y, en una segunda etapa, suplementado con la molécula de señalización ventral Shh y el factor trófico FGF8- ha actuado como coadyuvante en el alto grado de diferenciación no sólo neuronal sino también dopaminérgica, obteniéndose una red importante de neuronas TH positivas diferenciadas sobre la matriz neural desarrollada en tan sólo un mes de cultivo *in vitro*.

Con todo ello, se ha demostrado que las neuroesferas de zona subventricular responden a la matriz desarrollada en este trabajo adhiriéndose y diferenciándose en ella en menos tiempo que en otros soportes, como se demuestra con el hecho de que, en menos de 30 días de cultivo en condiciones de diferenciación, se obtenga una red neuronal bien desarrollada donde las células neuronales dopaminérgicas presentan prolongaciones neuríticas que las interconectan. Además, por debajo de la red neuronal incipiente se desarrolla una red importante de astrocitos reactivos que favorecen la diferenciación neuronal. Recientemente, se ha descrito el papel del ácido hialurónico en la proliferación, en la transformación morfológica estrellada (del inglés, *stellation*) y en la producción de factores neurotróficos en los astrocitos (por ejemplo, GDNF) (Yamada y col., 2008). Estos factores neurotróficos liberados por los astrocitos reactivos contribuyen a la diferenciación y plasticidad de las neuronas. En base a esto, el hecho de que se observe una capa de astrocitos estrellados entre la matriz y las neuronas en proceso de diferenciación resulta sumamente beneficioso para estas neuronas, proporcionándoles señales necesarias para la formación de sinapsis adecuadas.

Después de un mes de cultivo, un $88,4\% \pm 5,4\%$ de las neuronas maduras expresan el fenotipo dopaminérgico deseado. Por lo tanto, se puede afirmar que la diferenciación dopaminérgica de las células precursoras neurales de SVZ de rata neonata sobre la matriz desarrollada y con el protocolo de diferenciación descrito se encuentra en torno al 90% de eficiencia. Tanto la matriz como la monocapa de astrocitos activados sobre ella y el medio de

cultivo proporcionan las señales inductoras necesarias para alcanzar esta elevada eficiencia (Atico Ariza y col., 2010).

Por lo tanto, en lo que a la capacidad de diferenciación de las células precursoras neurales de zona subventricular de rata neonata se refiere, se ha corroborado que estas células presentan una elevada eficiencia de diferenciación a linaje dopaminérgico en la matriz desarrollada.

5.5. LA TÉCNICA DE CULTIVO DE NEUROESFERAS PERMITE EL AISLAMIENTO Y LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES DERIVADAS DE PIEL DE RATA ADULTA PERO SU DIFERENCIACIÓN SOBRE LA MATRIZ DESARROLLADA NO PRESENTA LOS MISMOS RESULTADOS QUE EN EL CASO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS DE ORIGEN NEURAL

La piel es un órgano grande, complejo y altamente regenerativo, que alberga diferentes poblaciones de células madre/progenitoras como células madre epidérmicas, células madre mesenquimales dermales, células madre del folículo piloso, células madre hematopoyéticas y endoteliales, y células precursoras derivadas de la cresta neural. En 2001, el grupo de la Dra. Miller describió una nueva población de células madre/progenitoras, las células precursoras derivadas de piel (SKPs), que fue aislada y expandida empleando una metodología similar a la utilizada para aislar y expandir células madre/progenitoras del Sistema Nervioso -es decir, mediante estructuras similares a neuroesferas-, partiendo de la base de que tanto la piel como el Sistema Nervioso presentan un origen embrionario común (Toma y col., 2001). Desde ese momento, esta población de células madre/progenitoras ha sido aislada y caracterizada por varios grupos de investigación a partir de muestras de piel de diferentes especies (ratón, rata y humano), y, además, ha sido diferenciada hacia diferentes linajes celulares, incluyendo el linaje neural (revisado en la **Tabla 5.1**). Su importancia radica en su capacidad de diferenciarse a fenotipos neurales sin ser el tejido nervioso su fuente de obtención. Concretamente, el descubrimiento de células precursoras multipotentes en la piel de mamíferos, incluyendo a humanos, ha conducido a diversos grupos de distintas partes del mundo a interesarse en el origen de estas células, en su nicho específico dentro de la piel y en la forma de aislarlas, enriquecerlas, expandirlas y diferenciarlas en células de tipo neural (aunque también pueden diferenciarse a células de tipo mesodérmico y endodérmico), con el objetivo de utilizarlas en Terapia Celular aplicada a enfermedades neurodegenerativas y/o traumáticas (por ejemplo, la Enfermedad de Parkinson o la lesión medular). Además, como la piel es un tejido de fácil

obtención, resultan importantes en el caso de querer realizar un trasplante autólogo. Por todo ello, si fuera posible llevar a cabo una diferenciación eficiente de estas células en la matriz desarrollada, resultaría crucial a la hora de pensar en el efecto terapéutico combinado de células precursoras no neurales adultas y nuevos biomateriales en la reparación del Sistema Nervioso dañado.

Aunque su localización exacta en la dermis resulta algo controvertida (sobre todo en humanos, donde no es posible realizar estudios de trazado de linaje *in vivo*; unos autores postulan que su nicho se encuentra en el folículo piloso y otros en la dermis interfolicular ya que se pueden obtener células precursoras derivadas de zonas de piel glabras), su potencial de diferenciación a células de fenotipo neural (tanto neuronas como células gliales) se encuentra bien caracterizado, aunque no todos los protocolos descritos en la literatura muestran la misma eficiencia en la generación de neuronas funcionales. Algo que sí se ha conseguido a partir de células precursoras derivadas de piel de rata neonata ha sido la diferenciación de neuronas dopaminérgicas funcionales, ya que al ser trasplantadas en modelos de ratas parkinsonianas, se ha observado una mejoría de los síntomas en ellas (Kubo y col., 2009; Higashida y col., 2010). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se comprueba la capacidad de estas neuronas de generar potenciales de acción y liberar vesículas cargadas con el neurotransmisor dopamina, algo que serviría para afirmar la funcionalidad de las mismas. Estudios previos de trasplantes de células mesencefálicas fetales en modelos de Enfermedad de Parkinson advierten que, en ciertos casos, las mejoras funcionales de los síntomas no derivan de una correcta integración y funcionalidad de las células trasplantadas sino de otros motivos.

Tal y como está descrito en la literatura a partir de piel humana adulta, cuando las estructuras similares a neuroesferas derivadas de piel de rata adulta obtenidas en este trabajo son depositadas en la matriz neural desarrollada con medio de diferenciación neurogénico, las células precursoras neurales que las componen comienzan su diferenciación neuronal, expresando el marcador nestina ($42,5\% \pm 3,5\%$). Así como la expresión de nestina por estas células en los primeros estadios de diferenciación está muy descrita en la literatura, la expresión de Sox2 resulta controvertida, ya que la mayoría de los autores sostiene que las células precursoras de piel son células multipotentes, no pluripotentes (Fernandes y col., 2008). Sin embargo, a pesar de que ciertos autores confirman la expresión de Oct3/4 y Nanog (Zhao y col., 2009) y de Sox2 (Biernaskie y col., 2009; Hunt y col., 2009) (todos ellos marcadores de pluripotencia), en este trabajo tampoco se ha observado la expresión de Sox2 en momentos iniciales de la diferenciación. Dos semanas después de comenzar la diferenciación, se observa una baja proporción ($7,5\% \pm 1,9\%$) de células con una morfología neuronal aparente y que resultan β -III-tubulina positivas. Por debajo de estas células, pero por encima de la matriz, se

observa una capa de células con morfología estromal y que resultan α -SMA positivas. Probablemente, estas células de apariencia no neuronal que se observan en estas preparaciones sean células estromales (posiblemente fibroblastos) que actúen de soporte estructural y trófico a las neuronas en maduración, como ocurría en el caso de los astrocitos y de las neuronas derivadas de SVZ. Teniendo en cuenta la capacidad descrita en la literatura de las células precursoras derivadas de piel de diferenciación tanto neural como mesodérmica, es lógico que se observen ambos tipos celulares. Se piensa que estas células podrían ser miofibroblastos derivados de las células precursoras de piel, que proliferan a gran velocidad en respuesta a la composición de la matriz y que actúan como células nodrizas en la diferenciación neuronal de las mismas.

Debido a la elevada tasa de proliferación de estas células, los cultivos empiezan a degenerar a partir de los 20 días en diferenciación y, al realizar marcajes contra MAP2 y TH, no se obtienen resultados positivos en ninguno de los dos casos, por lo que hay que asumir que las células β -III-tubulina positivas no consiguen alcanzar el fenotipo neuronal dopaminérgico maduro deseado.

Por todo ello, a pesar de lo descrito en la literatura en cuanto a la capacidad de especialización en fenotipo dopaminérgico, las células precursoras derivadas de piel de rata adulta obtenidas en este trabajo y diferenciadas en la matriz desarrollada con el protocolo neuronal-dopaminérgico descrito, no se diferencian en neuronas dopaminérgicas ya que no observan células TH positivas en ninguna de las preparaciones analizadas a los 20 DIV. Posiblemente sea necesario un mayor periodo de tiempo en cultivo o la adición de otras moléculas de señalización apropiadas para conseguir la diferenciación deseada. A este respecto se pueden hacer varios comentarios. El primero hace referencia a la necesidad de moléculas de señalización adicionales. Hay que señalar en este punto que, en los dos trabajos publicados en los que se consigue diferenciar neuronas dopaminérgicas a partir de rata (a pesar de ser ésta neonata y no adulta) (Kubo y col., 2009; Higashida y col., 2010), los investigadores suplementan el medio de diferenciación con la proteína von Hippel-Lindau VHL, una proteína fundamental en la diferenciación de las células precursoras mesencefálicas en neuronas dopaminérgicas (Kanno y col., 2000; Yamada y col., 2003), y que no ha estado presente en el medio de cultivo de este trabajo. El segundo comentario hace referencia a la necesidad de un mayor tiempo de cultivo para alcanzar la diferenciación dopaminérgica, teniendo en cuenta que, en el caso de las células precursoras neurales derivadas de zona subventricular de rata neonata, ha hecho falta el mantenimiento del cultivo durante más de 30 DIV. El problema en este punto surge con la rápida proliferación de las células de morfología no neural α -SMA positivas que se encuentran por debajo de las células neuronales. Si el cultivo se mantiene más de 20 DIV, estas

células saturan la preparación y comienza a producirse muerte celular, con el consecuente deterioro de las células neuronales en proceso de diferenciación, que comienzan a degenerar. Si se piensa en el fenotipo miofibroblástico de estas células resulta evidente pensar que la matriz extracelular desarrollada les proporcione un sustrato ideal para su desarrollo por la vía mesodérmica. Resultaría sumamente interesante profundizar en esta vía de diferenciación en trabajos de investigación futuros. En cualquier caso, el aspecto de la rápida proliferación de estas células en la matriz debería ser abordado y solucionado para poder mantener la diferenciación durante más de 20 DIV. Una solución que se podría pensar para este problema, podría ser la de purificar la población inicial de células precursoras neurales presentes en las estructuras similares a las neuroesferas pero surge el inconveniente de que no hay descrito ningún buen marcador de superficie que permita su selección mediante citometría de flujo (ni siquiera el CD133).

Por otro lado, la matriz desarrollada quizá fuera adecuada para mantener a las células precursoras derivadas de piel de rata durante largos periodos de tiempo en estado indiferenciado como ocurre con las células madre embrionarias humanas cuando son cultivadas en pocillos tratados con Matrigel™ de forma previa al cultivo (Mohr y col., 2006).

De cara a plantear nuevas líneas de trabajo con estas células y las matrices desarrolladas, sería interesante explorar el potencial de diferenciación de las células precursoras derivadas de piel hacia células gliales sobre la matriz desarrollada, utilizando protocolos descritos en la literatura para la diferenciación de células precursoras derivadas de piel a células de Schwann (utilizando factores gliogénicos como la neuregulina-1 β -que actúa activando la génesis, proliferación y diferenciación de células de Schwann a partir de precursores de la cresta neural embrionaria- y la forskolina -que actúa incrementando la concentración de AMP cíclico intracelular) (Biernaskie y col., 2006; McKenzie y col., 2006) y en los que se ha demostrado la capacidad de estas células de remielinizar neuronas en cultivo al ser cocultivadas con células de DRG (Hunt y col., 2010).

Si esta combinación apuntara resultados satisfactorios se podría pensar en realizar co-cultivos de neuronas y células de Schwann derivadas de células precursoras derivadas de piel sobre la matriz desarrollada, lo que abriría las puertas a la creación de un neuroconector bifásico (matriz-células) que, con ciertas modificaciones, podría ser implantando en la médula espinal dañada para estudiar su potencialidad en este tipo de reparaciones neurales (Walsh y col., 2009). La potencialidad de las células de Schwann derivadas de células precursoras derivadas de piel de reducir el tamaño de la cavidad de la lesión, de mielinizar axones endógenos y de reclutar células de Schwann endógenas tras su trasplante en ratas con 7 días de lesión de médula espinal

traumática ya ha sido mostrada en trabajos previos (Biernaskie y col., 2007); sería importante ahora demostrar la mayor efectividad de este tipo de constructos en la regeneración nerviosa post-traumática, tal y como apuntaba un grupo italiano al transplantar células de Schwann derivadas de células precursoras derivadas de piel en guías de PLA-TMC y colágeno en ratas con nervio ciático lesionado (Marchesi y col., 2007). Un ejemplo de conector bifásico ha sido desarrollado *in vitro* combinando un *array* de microcanales de poli-imidas con cultivos de DRG de rata, mostrando unos resultados preliminares *in vivo* muy alentadores para la utilización de este tipo de dispositivos en regeneración nerviosa periférica (Lacour y col., 2008).

De manera conjunta, los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que el soporte desarrollado es aplicable a la diferenciación neuronal de distintos tipos celulares de una manera eficiente y guiada, en caso de incorporarse las microgeometrías de superficie. Sin embargo, es importante señalar que el comportamiento y el grado de diferenciación neuronal alcanzada no dependen tanto del soporte desarrollado como del tipo de célula que se utilice para la diferenciación. Así, las células progenitoras neurales de zona subventricular parecen ser las más eficientes a la hora de llevar a cabo una diferenciación dopaminérgica terminal. Sin embargo, dado el potencial de las células precursoras derivadas de piel como fuente de obtención de células para trasplante, sería importante seguir trabajando en su diferenciación a fenotipo dopaminérgico sobre el soporte desarrollado probando nuevas modificaciones o combinaciones tanto del soporte como del medio de cultivo para alcanzar la diferenciación deseada.

Diferenciación	Tipo celular diferenciado	Marcadores de diferenciación	Modelos animales	Publicaciones
Ectodérmica	Neuronas	β -III-tubulin, NF-M, NF-H, MAP2, DAT*, TH*	Ratón, rata (neonata*), perro, humano	Higashida y col., 2010* Biemaskie y col., 2009 Fernandes y Miller, 2009 Gago y col., 2009 Kubo y col., 2009* Zhang y col., 2009 Valenzuela y col., 2008 Fernandes y col., 2008 Hunt y col., 2008 Gingras y col., 2007 Biemaskie y col., 2006
	Células gliales (Schwann)	S100, CNPase	Ratón, rata, humano	Hunt y col., 2010 Zavan y col., 2010 Walsh y col., 2009 Fernandes y col., 2008 Hunt y col., 2008 Biemaskie y col., 2007
Mesodérmica	Adipocitos	Oil red O	Ratón, rata, humano	Biemaskie y col., 2009 Toma y col., 2005 Kawase y col., 2004
	Miofibroblastos	α -SMA	Ratón, rata, humano	Biemaskie y col., 2009 Toma y col., 2005 Fernandes y col., 2004 Joannides y col., 2004
Endodérmica	Osteocitos	Collagen type-I	Ratón, humano	Lavoie y col., 2009
	Condrocitos	Collagen type-II	Ratón, humano	Lavoie y col., 2009
	Células pancreáticas productoras de insulina	Pdx-1, Nkx6.1, NeuroD/ β 2, Isl-1	Ratón	Guo y col., 2009
	Células musculoesqueléticas	Pax7, M-cadherin, MyoD, desmin, TnT, Myog	Ratón	Qiu y col., 2010
	Hepatocitos	CK18, HNF-4, HNF-1 α	Humano	De Kock y col., 2009

Tabla 5.1. Revisión de los tipos celulares diferenciados en la literatura a partir de células precursoras derivadas de piel. (*Se han obtenido neuronas dopaminérgicas).

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El soporte polimérico desarrollado en este trabajo combinando técnicas de fotolitografía -para el diseño de microgeometrías de superficie capaces de actuar como guías- y de matrices extracelulares -de composición similar a la propia matriz extracelular neural y con factores guía de la extensión neurítica- presenta la micro/nano-estructura adecuada para ser utilizado como soporte de diferenciación neuronal guiada *in vitro*.
2. La biocompatibilidad y la capacidad de diferenciación neuronal y dopaminérgica guiada del soporte desarrollado ha sido demostrada con la línea celular PC12, observándose redes pseudo-neuronales organizadas en las que las células diferenciadas expresan un fenotipo dopaminérgico (TH⁺) en un 84,4% ± 7,5%.
3. Las células de hipocampo de rata embrionaria (E18) se diferencian sobre la matriz desarrollada de una manera más eficiente que en las condiciones clásicas de cultivo, observándose una red de neuronas maduras (MAP2⁺) con extensas ramificaciones neuríticas en tan solo 8 días de cultivo.
4. La presencia de condrotín 4-sulfato en la composición basal de la matriz desarrollada muestra un efecto neuroprotector preliminar sobre las células de hipocampo de rata embrionaria (E18).
5. Se ha conseguido aislar y expandir células progenitoras neurales de zona subventricular de rata neonata (P2-P3) y células precursoras derivadas de piel de rata adulta mediante cultivos de neuroesferas y de estructuras similares a neuroesferas, respectivamente.
6. Las neuroesferas derivadas de zona subventricular de rata neonata (P2-P3) han sido diferenciadas en neuronas dopaminérgicas maduras (MAP2⁺, TH⁺) sobre la matriz desarrollada en menos de 30 días con un protocolo de diferenciación específico, mostrándose un 88,4% ± 5,4% de eficiencia en el proceso.
7. Las estructuras similares a neuroesferas derivadas de piel de rata adulta han permanecido como células indiferenciadas (nestina⁺) sobre la matriz desarrollada, consiguiéndose una baja diferenciación de neuronas inmaduras (β-III-tubulina⁺, 7,5% ± 1,9%) y, en ningún caso, una diferenciación terminal en neuronas dopaminérgicas maduras (MAP2⁺, TH⁺).

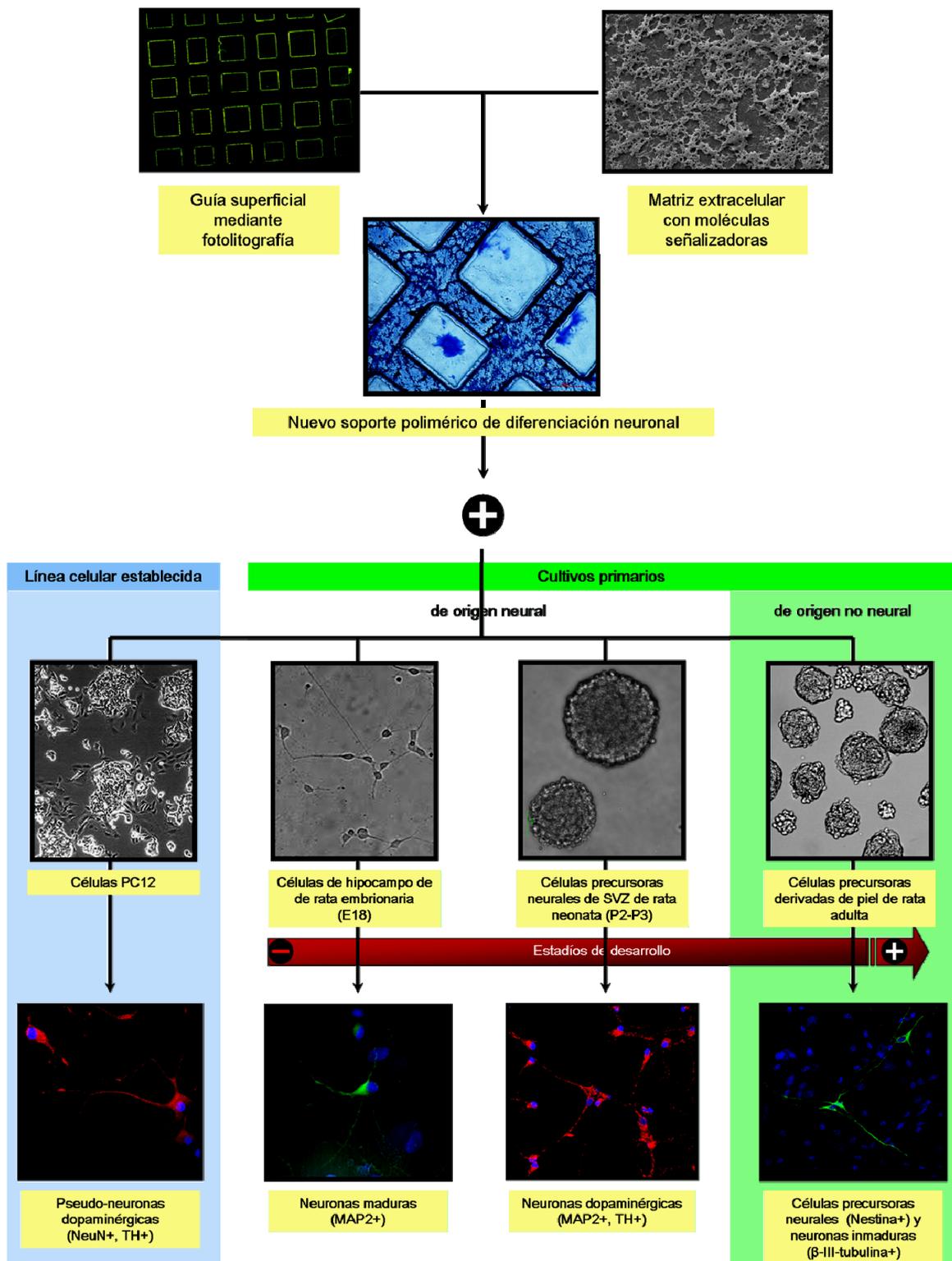


Figura 6.1. Esquema representativo global del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Ahmed MR, Jayakumar R. Peripheral nerve regeneration in RGD peptide incorporated collagen tubes. *Brain Research*. 2003; 993 (1-2): 208-216.

Ahmed S. The culture of neural stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009; 106: 1-6.

Ahmed T, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Engineering: Part B*. 2008; 14 (2): 199-215.

Ahmed Z, Brown RA. Adhesion, alignment, and migration of cultured Schwann cells on ultrathin fibronectin fibres. *Cell Motility Cytoskeleton*. 1999; 42: 331-343.

Akassoglou K, Akpınar P, Murray S, Strickland S. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. *Neuroscience Letters*. 2003; 338: 185-188.

Álava JI, Jurado MJ, García A, Murua O. *Joint Meeting of the International Tissue Engineering Society and the European Tissue Engineering Society*. 2004.

Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. (IV) Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*. 1969; 137: 433-457.

Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*. 2002; 22 (3): 629-634.

Álvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004; 41: 683-686.

Álvarez-Buylla A, Ser B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Research Bulletin*. 2002; 57: 751-758.

Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. Radial glia serves as neuronal progenitors in all regions of the Central Nervous System. *Neuron*. 2004; 41: 881-890.

Arala A. Engineering tissues, organs and cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2007; 1: 83-96.

Arantes RM, Andrews NW. A role of synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26 (17): 4630-4637.

Arenas E. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*. 2002; 57: 795-808.

Arenas E. Engineering a dopaminergic phenotype in stem/precursor cells: role of Nurr1, glia-derived signals, and Wnts. *Annals of the New York Accademy of Sciences*. 2005; 1049: 51-66.

Arias-Carrión O. Terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Revista Médica Universitaria de Navarra*. 2008; 52 (2): 17-24.

Arnaiz-Cot JJ, González JC, Sobrado M, Baldelli P, Carbone E, Gandía L, García AG, Hernández-Guijo JM. Allosteric modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission. *European Journal of Neuroscience*. 2008; 27: 1097-1110.

Atico Ariza C, McHugh KP, White SJ, Sakaguchi DS, Mallapragada SK. Extracellular matrix proteins and astrocyte-derived soluble factors influence the differentiation and proliferation of adult neural progenitor cells. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2010; 94 (A): 816-824.

B

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Developmental Biology*. 1995; 168: 342-357.

Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2008; 2: 169-183.

Barallobre MJ, Pascual M, Del Río JA, Soriano E. The netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Research Reviews*. 2005. 49 (1); 22-47.

Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AI, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nature Biotechnology*. 2003; 21: 1200-1207.

- Barde YA, Lindsay RM, Monard D, Thoenen H.** New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones. *Nature*. 1978; 274 (5673): 818.
- Barembaum M, Bronner-Fraser M.** Early steps in neural crest specification. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2005; 16: 642-646.
- Beal MF.** Experimental models of Parkinson's Disease. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2001; 2: 325-332.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE.** Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963; 197: 452-454.
- Bellamkonda R, Ranieri JP, Bouche N, Aebischer P.** Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1995; 29: 663-671.
- Bergado-Rosado JA, Almaguer-Melian W.** Mecanismos celulares de la neuroplasticidad. *Revista de Neurología*. 2000; 31 (11): 1074-1095.
- Bessea L, Coulomb B, Lebreton-Decoster C, Giraud-Guille MM.** Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. *Biomaterials*. 2002; 23: 27-36.
- Bettinger CJ, Bruggeman JP, Misra A, Borenstein JT, Langer R.** Biocompatibility of biodegradable semiconducting melanin films for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. 2009; 30: 3050-3057.
- Bhang SH, Lee TJ, Lim JM, Lim JS, Han AM, Choi CY, Kwon YHK, Kim BS.** The effect of the controlled release of nerve growth factor from collagen gel on the efficiency of neural cell culture. *Biomaterials*. 2009; 30: 126-132.
- Biernaskie JA, McKenzie IA, Toma JG, Miller FD.** Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nature Protocols*. 2006; 1 (6): 2803-2812.
- Biernaskie JA, Paris M, Morozova O, Fagan BM, Marra M, Pevny L, Miller F.** SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell*. 2009; 5: 610-623.
- Biernaskie JA, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y, Miller FD, Tetzlaff W.** Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27 (36): 9545-9559.
- Bodian D.** *Anat. Rec.* 1936; 65: 89-97.

- Borenstein JT, Weinberg EJ, Orrick BK, Sundback C, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP.** Microfabrication of three-dimensional engineered scaffolds. *Tissue Engineering*. 2007; 13 (8): 1837-1844.
- Borkenhagen M, Clemence JF, Sigrist H, Aebischer P.** Three-dimensional extracellular matrix engineering in the nervous system. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998; 40: 392-400.
- Boudreau N, Myers C, Bissell MJ.** From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends in Cell Biology*. 1995; 5 (1): 1-4.
- Brewer GJ, Torricelli JR.** Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nature Protocols*. 2007; 2 (6): 1490-1498.
- Busch SA, Silver J.** The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*. 2007; 17: 120-127.

C

- Cao H, Liu T, Chew SY.** The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61: 1055-1064.
- Capela A, Temple S.** LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonpendimal. *Neuron*. 2002; 35: 865-875.
- Carabelli V, Gosso S, Marcantoni A, Xu Y, Colombo E, Gao Z, Vittone E, Kohn E, Pasquarelli A, Carbone E.** Nanocrystalline diamond microelectrode arrays fabricated on sapphire technology for high-time resolution of quantal catecholamine secretion from chromaffin cells. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010; 26 (1): 92-98.
- Carter JM, Waite KA, Campenot RB, Vance JE, Vance DE.** Enhanced expression and activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase $\beta 2$ during neurite outgrowth. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (45): 44988-44994.
- Castillo C, Carreño F, Villegas GM, Villegas R.** Ionic currents in PC12 differentiated into neuron-like cells by a cultured-sciatic nerve conditioned medium. *Brain Research*. 2001; 911: 181-192.
- Cattaneo E, McKay R.** Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*. 1990; 347 (6295): 762-765.

- Cavaleri F, Schöler HR.** Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell*. 2003; 113 (5): 643-655.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L.** Perineural nets: past and present. *Trends in Neuroscience*. 1998; 21 (12): 510-515.
- Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM.** Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002; 961: 96-105.
- Chandra R, Rustgi R.** Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. 1998; 23: 1273-1335.
- Chang WC, Sretavan DW.** Novel high-resolution micropatterning for neuron culture using polylysine adsorption on a cell repellent, plasma-polymerized background. *Biomaterials*. 2008; 24: 13048-13057.
- Chao MV.** Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2003; 4: 299-309.
- Chen K, Hughes SM, Connor B.** Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation. *Cell Transplantation*. 2007; 16: 799-810.
- Chen YC, Lee DC, Hsiao CY, Chung YF, Chen HC, Thomas JP, Pong WF, Tai NH, Lin IN, Chiu IM.** The effect of ultra-nanocrystalline diamond films on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials*. 2009; 30 (20): 3428-3435.
- Cheng HW, Tsui YK, Cheung KMC, Chan D, Chan BP.** Decellularization of chondrocyte-encapsulated collagen microspheres: a three-dimensional model to study the effects of acellular matrix on stem cell fate. *Tissue Engineering: Part C*. 2009; 15 (4): 697-706.
- Cheng M, Cao W, Gao Y, Gong Y, Zhao N, Zhang X.** Studies on nerve cell affinity of biodegradable modified chitosan films. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*. 2003; 14: 1155-1167.
- Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S.** Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2009; 10: 153-163.
- Chow D, Nunalee ML, Lim DW, Simnick AJ.** Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. *Material Science and Engineering Reports: a review journal*. 2008; 62 (4): 125-155.
- Christopherson GT, Song H, Mao HQ.** The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*. 2009; 30: 556-564.

Chung KF, Sicard F, Vukicevic V, Hermann A, Storch A, Huttner WB, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells*. 2009; 27: 2602-2613.

Collo G, Goffi F, Pich EM, Baldelli P, Benfenati F, Spano P. Immature neuronal phenotype derived from mouse skin precursor cells differentiated in vitro. *Brain Research*. 2006; 1109: 32-36.

Cooke MJ, Zahir T, Phillips SR, Shah DSH, Athey D, Lakey JH, Schoichet MS, Przyborski SA. Neural differentiation regulated by biomimetic surfaces presenting motifs of extracellular matrix proteins. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2010; 93 (A): 824-832.

Cooper JD. Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofoscinosis. *Current Opinion in Neurology*. 2003; 16 (2): 121-128.

Corey JM, Feldman EL. Substrate patterning: an emerging technology for the study of neuronal behavior. *Experimental Neurology*. 2003; 184: S89-S96.

Crespo-Santiago D. La matriz extracelular del Sistema Nervioso Central: los proteoglicanos del tipo condroitinsulfato y la reparación neural. *Revista de Neurología*. 2004; 38 (9): 843-851.

Cui FZ, Tian WM, Hou SP, Xu QY, Lee LS. Hyaluronic acid hydrogel immobilized with RGD peptides for brain tissue engineering. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. 2006; 17: 1393-1401.

Curtis MA, Faull RLM, Eriksson PS. The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2007; 8: 712-723.

D

Dalton PD, Flynn L, Schoichet MS. Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as a nerve guidance channels. *Biomaterials*. 2002; 23: 3843-3851.

Dalton PD, Mey J. Neural interactions with materials. *Frontiers in Bioscience*. 2009; 14: 769-795.

Date I, Aoi M, Tomita S, Collins F, Ohmoto T. GDNF administration induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system both in young and aged parkinsonian mice. *Neuroreport*. 1998; 9: 2365-2369.

- De Castro F.** Moléculas quimiotrópicas como mecanismo de orientación del crecimiento axonal y de la migración neuronal durante el desarrollo del Sistema Nervioso de los mamíferos. *Revista de Neurología*. 2001; 33 (1): 54-68.
- Deierborg T, Soulet D, Roybon L, Hall V, Brundin P.** Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 2008; 85: 407-432.
- De Kock J, Vanhaecke T, Biernaskie J Rogiers V, Snykers S.** Characterization and hepatic differentiation of skin-derived precursors from adult foreskin by sequential exposure to hepatogenic cytokines and growth factors reflecting liver development. *Toxicology In Vitro*. 2009; 23 (8): 1522-1527.
- Delcroix GJR, Schiller PC, Benoit JP, Montero-Menei CN.** Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31: 2105-2120.
- Deleyrolle LP, Rietze RL, Reynolds BA.** The neurosphere assay, a method under scrutiny. *Acta Neuropsychiatrica*. 2008; 20: 2-8.
- Denizot F, Lang R.** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 1986; 89: 271-277.
- Dewitt DD, Kaszuba SN, Thompson DM, Stegemann JP.** Collagen I-Matrigel scaffolds for enhanced Schwann cell survival and control of three-dimensional cell morphology. *Tissue Engineerig: Part A*. 2009; 15 (10): 2785-2793.
- Discher DE, Janmey P, Wang YL.** Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005; 310: 1139-1143.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW.** Growth factors, matrices and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009; 324: 1673-1677.
- Doetsch F.** A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2003; 13: 543-550.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, García Verdugo JM, Álvarez-Buylla A.** Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999; 97: 703-716.
- Donaldson J, Shi R, Borgens R.** Polyethylene glycol rapidly restores physiological functions in damaged sciatic nerves of guinea pigs. *Neurosurgery*. 2002; 50: 147-156.

- Dovbeshko GI, Repnytska OP, Obraztsoba ED, Shtogun YV, Andreev EO.** Study of DNA interaction with carbon nanotubes. *Semiconductor Physics. Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2003; 6: 105-108.
- Drotleff S, Lungwitz U, Breunig M, Dennis A, Blunk T, Tessmar J.** Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004; 58 (2): 385-407.
- Drucker-Colin R, Verdugo-Díaz L.** Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2004; 24: 301-316.
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT.** Guided neurite elongation and Schwann cell invasion into magnetically aligned collagen in simulated peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology*. 1999; 158: 338-350.
- Dubey N, Letourneau PC, Tranquillo RT.** Neuronal contact guidance in magnetically aligned fibrin gels: effect of variation in gel mechano-structural properties. *Biomaterials*. 2001; 22: 1065-1075.
- Dupin E, Calloni G, Real C, Gonçalves-Trentin A, Le Douarin NM.** Neural crest progenitors and stem cells. *Comptes Rendus Biologies*. 2007; 330: 521-529.
- Dyce PW, Zhu H, Craig J, Li J.** Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2004; 316: 651-658.
- Dziewczapolski G, Lie DC, Ray J, Gage FH, Shults CW.** Survival and differentiation of adult rat-derived neural progenitor cells transplanted to the striatum of hemiparkinsonian rats. *Experimental Neurology*. 2003; 183: 653-664.

E

- Ehrmann RL, Gey GO.** The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *Journal of the National Cancer Institute*. 1956; 16: 1375-1403.
- Elsdale T, Bard J.** Collagen substrata for studies on cell behaviour. *Journal of Cell Biology*. 1972; 54: 626-637.
- Englund U, Björklund A, Wictorin K.** Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Developmental Brain Research*. 2002; 134 (1-2): 123-141.

Espejo EF, González-Albo MC, Moraes JP, El Banoua F, Flores JA, Caraballo I. Functional regeneration in a rat Parkinson's model after intrastriatal grafts of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor β 1-expressing extra-adrenal chromaffin cells of the Zuckerkandl's organ. *Journal of Neuroscience*. 2001; 21: 9888-9895.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154-156.

F

Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*. 2006; 27: 3044-3063.

Feria-Velasco A, Castillo-Medina S, Verdugo-Díaz L, Castellanos E, Orozco-Suárez S, Sánchez-Gómez C, Drucker-Colin R. Neuronal differentiation of chromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: a histological and ultrastructural comparative study. *Journal of Neuroscience Research*. 1998; 53: 569-582.

Fernandes KJL, Kobayashi NR, Gallagher CJ, Barnabe-Heider F, Aumont A, Kaplan DR, Miller FD. Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Experimental Neurology*. 2006; 201: 32-48.

Fernandes KJL, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui C-C, Miller FD. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biology*, 2004; 6: 1082-1093.

Fernandes KJL, Miller FD. Isolation, expansion and differentiation of mouse skin-derived precursors. *Stem Cells in Regenerative Medicine: Methods and Protocols*. 2009; vol. 482 (chapter 10): 159-169.

Fernandes KJL, Toma JG, Miller FD. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*. 2008; 363: 185-198.

Fernández-Espejo E, El Banoua F, Carballo I, Galán B, Flores JA. Transplante de células naturales "dopaminotróficas": nuevo concepto terapéutico antiparkinsoniano. *Revista de Neurología*. 2003; 36 (6): 540-544.

Ferrari A, Faraci P, Cecchini M, Beltram F. The effect of alternative neuronal differentiation pathways on PC12 cell adhesion and neurite alignment to nanogratings. *Biomaterials*. 2010; 31: 2565-2573.

- Finley MFA, Kulkarni N, Huettner JE.** Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *The Journal of Neuroscience*. 1996; 16: 1056-1065.
- Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF.** Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*. 1999; 20: 573-588.
- Flynn L, Dalton PD, Schoichet MS.** Fiber templating of poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24: 4265-4272.
- Foley JD, Grunwald EW, Nealey PF, Murphy CJ.** Cooperative modulation of neuriteogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor. *Biomaterials*. 2005; 26: 3639-3644.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J.** In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *Journal of Cellular Science*. 1995; 108: 3181-3188.
- Francisco H, Yellen BB, Halverson DS, Friedman G, Gallo G.** Regulation of axon guidance and extension by three-dimensional constraints. *Biomaterials*. 2007; 28: 3398-3407.
- Fromherz P, Schaden H.** Defined neuronal arborizations by guided outgrowth of leech neurons in culture. *European Journal of Neuroscience*. 1994; 6: 1500-1504.
- Fuccillo M, Joyner AL, Fishell G.** Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2006; 7: 772-783.

G

- Gage FH.** Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287: 1433-1438.
- Gago N, Pérez-López V, Sanz-Jaka JP, Cormenzana P, Eizaguirre I, Bernad A, Izeta A.** Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells*. 2009; 27: 1164-1172.
- Gale E, Li M.** Midbrain dopaminergic neuron fate specification: of mice and embryonic stem cells. *Molecular Brain*. 2008; 1: 8.
- Galtrey CM, Fawcett JW.** The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the Central Nervous System. *Brain Research Reviews*. 2007; 54: 1-18.

- Galvin KA, Jones DG.** Adult human neural stem cells for autologous cell replacement therapies for neurodegenerative disorders. *NeuroRehabilitation*. 2006; 21 (3); 255-265.
- Gelain F, Bottai D, Vescovi A, Zhang S.** Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. *PloS ONE*. 2006; 1 (1): e119.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T.** Collagens - structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003; 55: 1531-1546.
- Gerecht-Nir S, Cohen S, Ziskind A, Itskovitz-Eldor J.** Three-dimensional porous alginate scaffolds provide a conducive environment for generation of well-vascularized embryoid bodies from human embryonic stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004; 88: 313-320.
- Giachino C, Basak O, Taylor V.** Isolation and manipulation of mammalian neural stem cells in vitro. *Stem Cells in Regenerative Medicine, Methods and Protocols*. 2009; 482: 143-158.
- Gilbert SF.** *Developmental Biology*. 2003.
- Gingras M, Champigny MF, Berthod F.** Differentiation of human adult skin-derived neuronal precursors into mature neurons. *Journal of Cellular Physiology*. 2007; 210: 498-506.
- Gingras M, Paradis I, Berthod F.** Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*. 2003; 24: 1653-1661.
- Goldmann WH.** Mechanical aspects of cell shape regulation and signaling. *Cell Biology International*. 2002; 26: 313-317.
- Goldner JS, Bruder JM, Li G, Gazzola D, Hoffman-Kim D.** Neurite bridging across micropatterned grooves. *Biomaterials*. 2006; 27: 460-472.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG.** Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 1999; 286: 548-552.
- Green RA, Lovell NH, Poole-Warren LA.** Cell attachment functionality of bioactive conducting polymers for neural interfaces. *Biomaterials*. 2009; 30 (22): 3637-3644.
- Greene LA, Tischler AS.** Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *PNAS*. 1976; 73: 2424-2428.

Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Álvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, García-Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22: 437-445.

Gu XL, Fu SL, Wang YX, Li Y, Lü HZ, Xu XM, Lu PH. Chondrotin sulfate proteoglycans regulate the growth, differentiation and migration of multipotent neural precursor cells through the integrin signaling pathway. *BMC Neuroscience*. 2009; 10: 128.

Gunn NM, Bachman M, Li GP, Nelson EL. Fabrication and biological evaluation of uniform extracellular matrix coatings on discontinuous photolithography generated micropallet arrays. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2010; 95A (2): 401-412.

Guo W, Miao C, Liu S, Qiu Z, Li J, Duan E. Efficient differentiation of insulin-producing cells from skin-derived stem cells. *Cellular Proliferation*. 2009; 42: 49-62.

H

Hartig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mader M, Reichenbach A, Bruckner G. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Research*. 1999; 842: 15-29.

Hasirci V, Kenar H. Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior. *Nanomedicine*. 2006; 1 (1): 73-90.

Haston WS, Shields JM, Wilkinson PC. The orientation of fibroblasts and neutrophils on elastic substrata. *Experimental Cell Research*. 1983; 146: 117-126.

Hayen W, Goebeler M, Kumar S, Riessen R, Nehls V. Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *Journal of Cell Science*. 1999; 112: 2241-2251.

Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003; 24: 4385-4415.

Higashida T, Jitsuki S, Kubo A, Mitsushima D, Kamiya Y, Kanno H. Skin-derived precursors differentiating into dopaminergic neuronal cells in the brains of Parkinson disease model rats. *Journal of Neurosurgery*. 2010; 19: 1-8.

Hinds JW. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. (I) Time of origin of neurons and neuroglia. (II) Cell proliferation and migration. *Journal of Comparative Neurology*. 1968; 134: 287-322.

Hook AL, Voelcker NH, Thissen H. Patterned and switchable surfaces for biomolecular manipulation. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5: 2350-2370.

Howard B, Chen Y, Zecevic N. Cortical progenitor cells in the developing human telencephalon. *Glia*. 2006; 53: 57-66.

Hubbel JA. Matrix-bound growth factors in tissue repair. *Swiss Medical Weekly*. 2006; 136: 387-391.

Hulspas R, Tiarks C, Reilly J, Hsieh CC, Recht L, Quesenberry PJ. In vitro cell density-dependent clonal growth of EGF-responsive murine neural progenitor cells under serum-free conditions. *Experimental Neurology*. 1997; 148 (1): 147-156.

Hunt DPJ, Jahoda C, Chandran S. Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009; 20: 522-530.

Hunt DPJ, Morris PN, Sterling J, Anderson JA, Joannides A, Jahoda C, Compston A, Chandran S. A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells*. 2008; 26: 163-172.

Hunt DPJ, Sajic M, Phillips H, Henderson D, Compston A, Smith K, Chandran S. Origins of gliogenic stem cell populations within adult skin and bone marrow. *Stem Cells and Development*. 2010; 19 (7): 1055-1065.

I

Iacovitti L, Donalson AE, Marshall CE, Suon S, Yang M. A protocol for the differentiation of human embryonic stem cells into dopaminergic neurons using only chemically defined human additives: studies in vitro and in vivo. *Brain Research*. 2007; 1127: 19-25.

Ingber D. Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1991; 47 (3): 236-241.

J

- Jaber FT, Labeed FH, Hughes MP.** Action potential recording from dielectrophoretically positioned neurons inside micro-wells of a planar microelectrode array. *Journal of Neuroscience Methods*. 2009; 182: 225-235.
- Jansen K, Meek MF, van der Werff JF, van Wachem PB, van Luyn MJ.** Long-term regeneration of the rat sciatic nerve through a biodegradable poly-(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide: tissue reactions with focus on collagen III/IV reformation. *Journal of Biomedical Science Research*. 2004; 69: 334-341.
- Jansen K, van der Werff JF, van Wachem PB, Nicolai JP, de Leij LF, van Luyn MJ.** A hyaluronan-based nerve guide: in vitro cytotoxicity, subcutaneous tissue reactions and degradation in the rat. *Biomaterials*. 2004; 25: 483-489.
- Jensen JB, Parmar M.** Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Molecular Neurobiology*. 2006; 34: 153-161.
- Jessell TM, Sanes JR.** Development. The decade of the developing brain. *Current Opinion in Neurobiology*. 2000; 10: 599-611.
- Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, Majed H, Sterling J, Compston A, Chandran S.** Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet*. 2004; 364: 172-178.
- Johansson CB, Lothian C, Molin M, Okano H, Lendahl U.** Nestin enhancer requirements for expression in normal and injured adult CNS. *Journal of Neuroscience Research*. 2002; 69 (6): 784-794.
- Johansson F, Carlberg P, Danielsen N, Montelius L, Kanje M.** Axonal outgrowth on nano-imprinted patterns. *Biomaterials*. 2006; 27: 1251-1258.
- Jones KR, Fariñas I, Backus C, Reichardt LF.** Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*. 1994; 76 (6): 989-999.
- Jones RAL.** Biomimetic polymers - tough and smart. *Nature Materials*. 2004; 3: 209-210.
- Joshi CV, Enver T.** Plasticity revisited. *Current Opinion of Cell Biology*. 2002; 14: 749-755.

K

Kanno H, Saljooque F, Yamamoto I, Hattori S, Yao M, Shuin T, U HS. Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during neuronal differentiation. *Cancer Research*. 2000; 60: 2820-2824.

Karp JM, Yeo Y, Geng W, Cannizzaro C, Yan K, Kohane DS, Vunjak-Novakovic G, Langer RS, Radisic M. A photolithographic method to create cellular micropatterns. *Biomaterials*. 2006; 27: 4755-4764.

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa S, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 2000; 28: 31-40.

Keller R. Cell migration during gastrulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2005; 17: 533-541.

Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti L. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PNAS*. 2006; 103: 2480-2487.

Kikuchi A, Okano T. Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *Journal of Controlled Release*. 2005; 101: 69-84.

Kim DW, Chung S, Hwang M, Ferree A, Tsai HC, Park JJ, Chung S, Nam TS, Kang, UJ, Isacson O, Kim KS. Stromal cell-derived inducing activity, Nurr-1, and signaling molecules synergistically induce dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 557-567.

Kintner C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *The Journal of Neuroscience*. 2002; 22 (3): 639-643.

Kleinfeld D, Kahler KH, Hockberger PE. Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *Journal of Neuroscience*. 1988; 8 (11): 4098-4120.

Kleinman HK. Molecular and cellular aspects of basement membranes. *Academic Press*. 1993; 309-326.

Kleinman HK. Preparation of basement membrane components from EHS tumors. *Current Protocols in Cell Biology*. 1998; 10.2.1-10.2.10.

Kleinman HK, Martin GR. Determining metastatic potential of tumor cells and isolating metastatic tumor cells. *United States Patent Number 5.158.874*. 1992.

Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*. 2005; 15: 378-386.

Kleinman HK, Martin GR. Reconstituted basement membrane complex with biological activity. *United States Patent Number 4.829.000*. 1989.

Koeberle PD, Bähr M. Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone?. *Journal of Neurobiology*. 2004; 59(1): 162-180.

Koh HS, Yong T, Chan CK, Ramakrishna S. Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials*. 2008; 29: 3574-3582.

Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 349 (6): 570-582.

Kornack DR, Rakic P. The generation, migration and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *PNAS*. 2001; 98: 4752-4757.

Kubo A, Yoshida T, Kobayashi N, Yokoyama T, Mimura T, Nishiguchi T, Higashida T, Yamamoto I, Kanno H. Efficient generation of dopamine neuron-like cells from skin-derived precursors with a synthetic peptide derived from von Hippel-Lindau protein. *Stem Cells and Development*. 2009; 18 (10): 1523-1531.

L

Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Experimental Neurology*. 1998; 149: 243-252.

Lacour SP, Atta R, FitzGerald JJ, Blamire M, Tarte E, Fawcett J. Polyimide micro-channel arrays for peripheral nerve regenerative implants. *Sensors and Actuators A*. 2008; 147: 456-463.

Lago N, Ceballos D, Rodriguez FJ, Stieglitz T, Navarro X. Long-term assessment of axonal regeneration through polyimide regenerative electrodes to interface the peripheral nerve. *Biomaterials*. 2005; 26: 2021-2031.

Lamour G, Eftekhari-Bafrooei A, Borguet E, Souès S, Hamraoui A. Neuronal adhesion and differentiation driven by nanoscale surface free-energy gradients. *Biomaterials*. 2010; 31: 3762-3771.

- Lamour G, Journiac N, Souès S, Bonneau S, Nassoy P, Hamraoui A.** Influence of surface energy distribution on neuritogenesis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009; 72: 208-218.
- Langer R, Tirrel DA.** Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004; 428: 487-492.
- Langer R, Vancanti JP.** Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920-926.
- Laurent TC, Fraser JRE.** Hyaluronan. *FASEB*. 1992; 6: 2397-2404.
- Lavoie JF, Biernaskie JA, Chen Y, Bagli D, Alman B, Kaplan DR, Miller FD.** Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells and Development*. 2009; 18 (6): 893-906.
- Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S.** Role of neural crest in face and brain development. *Brain Research Reviews*. 2007; 55: 237-247.
- Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E.** The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle*. 2008; 7 (8): 1013-1019.
- Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA.** Three-dimensional cell culture matrices: state of art. *Tissue Engineering: Part B*. 2008; 14 (1): 61-86.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD.** Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2000; 18: 675-679.
- Leipzig ND, Shoichet MS.** The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. *Biomaterials*. 2009; 30: 6867-6878.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V.** Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*. 1951; 116: 321-362.
- Li J, McNally H, Shi R.** Enhanced neurite alignment on micro-patterned poly-L-lactic acid films. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2008; 87 (A): 392-404.
- Li L, Xie T.** Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2005; 21: 605-631.
- Li N, Folch A.** Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates. *Experimental Cell Research*. 2005; 311: 307-316.

- Li N, Tourovskaja A, Folch A.** Biology on a chip: microfabrication for studying the behaviour of cultured cells. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. 2003; 31 (5&6): 423-488.
- Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH.** The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22: 6639-6649.
- Lietz M, Ullrich A, Schulte-Eversum C, Oberhoffner S, Fricke C, Muller HW, Scholloschauer B.** Physical and biological performance of a novel block copolymer nerve guide. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006; 93: 99-109.
- Lim JY, Donahue HJ.** Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning. *Tissue Engineering*. 2007; 13 (8): 1879-1891.
- Lim SH, Mao HQ.** Electrospun scaffold for stem cells engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61: 1084-1096.
- Lin JC, Rosenthal A.** Molecular mechanisms controlling the development of dopaminergic neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2003; 14: 175-180.
- Lin L, Isacson O.** Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons by Netrin-1 and Slits. *Stem Cells*. 2006; 24: 2504-2513.
- Lin L, Lesnick TG, Maraganore DM, Isacson O.** Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends in Neurosciences*. 2008; 32 (2): 142-149.
- Lindvall O, Kokaia Z.** Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009; 30 (5): 250-267.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martínez-Serrano A.** Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nature Medicine*. 2004; 10 (Suppl): S42-S50.
- Liu SQ.** Nervous regenerative engineering. *Bioregenerative Engineering: principles and applications*. 2007; 13: 500-583.
- Liu Z, Martin LJ.** Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *Journal of Comparative Neurology*. 2003; 459: 368-391.
- Livesey FJ.** Netrins and netrin receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999; 56: 62-68.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2006; 7: 179-193.

Lois C, Álvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994; 264: 1145-1148.

López-Barneo J, Pardal R, Órtega-Sáenz P, Durán R, Villadiego J, Toledo-Aral JJ. The neurogenic niche in the carotid body and its applicability to antiparkinsonian cell therapy. *Journal of Neural Transmission*. 2009; 116 (8): 975-982.

Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's Disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2002; 3: 932-942.

Lu MC, Hsiang SW, Lai TY, Yao CH, Lin LY, Chen YS. Influence of cross-linking degree of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin guide on peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*. 2007; 18: 843-863.

M

Ma W, Tavakoli T, Derby E, Serebryakova Y, Rao MS, Mattson MP. Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Developmental Biology*. 2008; 8: 90.

Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon Ap, Fishell G. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cells niches. *Neuron*. 2003; 7: 937-950.

Mahoney MJ, Chen RR, Tan J, Saltzman WM. The influence of microchannels on neurite growth and architecture. *Biomaterials*. 2005; 26: 771-778.

Mak CKH, Thomas TE, Eaves AC, Louis SA. A new defined serum-free medium formulation to culture mature neurons at higher yields from primary embryonic mouse CNS tissues. *Stem Cell Technologies*. 2009; poster.

Mandys V, van der NR, Bar PR, Gispen WH. Cultivation of rat fetal spinal cord slices in a semi-solid medium: a new approach to study axonal outgrowth and regeneration. *Journal of Neuroscience Methods*. 1991; 38: 63-69.

- Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL.** Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Composites Science and Technology*. 2004; 64: 789-817.
- Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S.** Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *Journal of Cellular Biology*. 1983; 97: 1882-1890.
- Marchesi C, Pluderi M, Colleoni F, Belicchi M, Meregalli M, Farini A, Parolini D, Draghi L, Fruguglietti ME, Gavina M, Porretti L, Cattaneo A, Battistelli M, Prella A, Moggio M, Borsa S, Bello L, Spagnoli D, Gaini SM, Tanzi MC, Bresolin N, Grimoldi N, Torrente Y.** Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *Glia*. 2007; 55: 425-438
- Marler JJ, Upton J, Langer R, Vacanti JP.** Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Review*. 1998; 33: 165-182.
- Marler KJ, Becker-Barroso E, Martínez A, Llovera M, Wentzel C, Poopalasundaram S, Hindges R, Soriano E, Comella J, Drescher U.** A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*. 2008; 28 (48): 12700-12712.
- Martin GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS*. 1981; 78: 7634-7638.
- Martinat C, Bacci JJ, Leete T, Kim J, Vanti WB, Newman AH, Cha JH, Gether U, Wang H, Abeliovich A.** Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *PNAS*. 2006; 103 (8): 2874-2879.
- Martínez-Ramos C, Lainez S, Sancho F, García Esparza MA, Planells-Cases R, García-Verdugo JM, Gómez Ribelles JL, Salmerón Sánchez M, Monleón Pradas M, Barcia JA, Soria JM.** Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Engineering: Part A*. 2008; 14 (8): 1365-1374.
- Matins-Green M.** *Principles of Tissue Engineering*. 1997; chapter 3.
- Matsuda S, Iwata H, Se N, Ikada Y.** Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999; 45 (1A): 20-27.

- Matthiessen HP, Schmalenbach C, Muller HW.** Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia*. 1989; 2: 177-188.
- McKay R.** Stem cells in the Central Nervous System. *Science*. 1997; 276: 66-71.
- McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD.** Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26: 6651-6660.
- Merkle FT, Álvarez-Buylla A.** Neural stem cells in mammalian development. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006; 18: 704-709.
- Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS.** Complications from silicon-polymer intubulation of nerves. *Microsurgery*. 1989; 10: 130-133.
- Miller C, Jeftinija S, Mallapragada S.** Synergistic effects of physical and chemical guidance cues on neurite alignment and outgrowth on biodegradable polymer substrates. *Tissue Engineering*. 2002; 8 (3): 367-378.
- Mina M, Kollar EJ, Bishop JA, Rohrbach DH.** Interaction between the neural crest and extracellular matrix proteins in craniofacial skeletogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1990; 1 (2): 79-87.
- Ming G, Henley J, Tessier-Lavigne M, Song H, Poo M.** Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron*. 2001; 29: 441-452.
- Ming GL, Song H.** Adult neurogenesis in the mammalian Central Nervous System. *Annual Reviews in Neuroscience*. 2005; 28: 223-250.
- Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F.** Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (I). *Revista de Neurología*. 2005; 41 (10): 604-614.
- Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F.** Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (I). *Revista de Neurología*. 2005; 41 (11): 684-693.
- Mohr JC, de Pablo JJ, Palecek SP.** 3-D microwell culture of human embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2006; 27: 6032-6042.
- Money DJ, Langer R.** *The Biomedical Engineering Handbook*. 1995.

Moore MJ, Friedman JA, Lewellyn EB, Mantila SM, Krych AJ, Ameenuddin S, Knight AM, Lu L, Currier BL, Spinner RJ, Marsh RW, Windebank AJ, Yaszemski MJ. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials*. 2006; 27: 419-429.

Morawski M, Bruckner MK, Riederer P, Bruckner G, Arendt T. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Experimental Neurology*. 2004; 188: 309-315.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; 132 (4): 598-611.

Murugan R, Ramakrishna. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Engineering*. 2007; 13 (8): 1845-1866.

N

National Institutes of Health. *Stem Cells: scientific progress and future research directions*. 2001.

Nehls V, Herrmann R. The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvascular Research*. 1996; 51: 347-364.

Newman MB, Bakay RAE. Therapeutic potentials of human embryonic stem cells in Parkinson's Disease. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2008; 5: 237-251.

Nianzhen L, Folch A. Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates. *Experimental Cell Research*. 2005; 311 (2): 307-316.

Nicoli AN, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R. Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries. *International Orthopedics*. 2000; 24: 121-125.

Nomura T, Ashiharaa E, Tateishia K, Asadaa S, Ueyamaa T, Takahashia T, Matsubaraa H, Oha H. Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in δ -sarcoglycan knockdown cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 352: 668-674.

Norman LL, Stroka K, Aranda-Espinoza H. Guiding axons in the Central Nervous System: a tissue engineering approach. *Tissue Engineering: Part B*. 2009; 15 (3): 291-305.

Nottebohm F. Birdsong's clockwork. *Nature Neuroscience*. 2002; 5: 925-926.

Novikova LN, Pettersson J, Brohlin M, Wiberg M, Novikov LN. Biodegradable poly- β -hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. *Biomaterials*. 2008; 29: 1198-1206.

O

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, DeLong MR, Olanow CW. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model. *Annual Neurology*. 2000; 47 (Suppl 1): S22-S34.

Obreja O, Biasio W, Andratsch M, Lips KS, Rathee PK, Ludwig A, Rose-John S, Kress M. Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. *Brain*. 2005; 128 (Pt 7): 1634-1641.

O'Connor SM, Stenger DA, Shaffer KM, Ma W. Survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in three-dimensional agarose and collagen gel matrices. *Neuroscience Letters*. 2001; 304: 189-193.

O'Connor SM, Stenger DA, Shaffer KM, Maric D, Barker JL, Ma W. Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca^{2+} response in three-dimensional collagen gel. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000; 102: 187-195.

O'Donnell M, Chance RK, Bashaw GJ. Axon growth and guidance: receptor regulation and signal transduction. *Annual Reviews in Neuroscience*. 2009; 32: 383-412.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of Development*. 1996; 59: 89-102.

Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology*. 2009; 72 (Suppl 4): S1-S136.

Oliva AA, James CD, Kingman CE, Craighead HG, Banker GA. Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing. *Neurochemical Research*. 2003; 28 (11): 1639-1648.

Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2009; 10: 682-692.

P

Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells*. 2000; 18: 295-300.

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*. 2000; 425: 479-494.

Pan L, Ren Y, Cui F, Xu Q. Viability and differentiation of neural precursors on hyaluronic acid hydrogel scaffold. *Journal of Neuroscience Research*. 2009; 87: 3207-3220.

Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nature Biotechnology*. 2002; 20: 1111-1117.

Patist CM, Mulder MB, Gautier SE, Maquet V, Jerome R, Oudega M. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*. 2004; 25: 1569-1582.

Payne GF. Biopolymer-based materials: the nanoscale components and their hierarchical assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2007; 11: 214-219.

Pencea V, Luskin MB. Prenatal development of the rodent rostral migratory stream. *The Journal of Comparative Neurology*. 2003; 463 (4): 402-418.

Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science*. 1994; 263: 1715-1720.

Perris R, Perissinotto D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mechanisms of Development*. 2000; 95 (1-2): 3-21.

Piccini P, Pavese N, Hagell P, Reimer J, Bjorklund A, Oertel WH, Quinn NP, Brooks DJ, Lindvall O. Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in Parkinson's disease. *Brain*. 2005; 128: 2977-2986.

Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 2002; 298: 1248-1251.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolinil G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Research*. 2005; 65: 5506-5511.

Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties - lessons for and from the crypt. *Development*. 1990; 110: 1001-1020.

Potter W, Kalil R, Kao WJ. Biomimetic material systems for neural progenitor cell-based therapy. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 13: 806-821.

Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, Faber C, Vroemen M, Bogdahn U, Weidner N. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials*. 2006; 27: 3560-3569.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, White LE. *Neuroscience*. 2008.

O

Qiu Z, Miao C, Li J, Lei X, Liu S, Guo W, Cao Y, Duan EK. Skeletal myogenic potential of mouse skin-derived precursors. *Stem Cells and Development*. 2010; 19 (2): 259-268.

Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *The Journal of Comparative Neurology*. 2006; 484 (3): 415-434.

R

Rajasekharan S, Kennedy TE. The netrin protein family. *Genome Biology*. 2009; 10: 239.1-239.8.

Rall W. Branching dendritic trees and motoneurons membrane resistivity. *Experimental Neurology*. 1959; 1: 491-527.

Ramón y Cajal S. *Estudios sobre la degeneración y la regeneración del Sistema Nervioso*. 1913-1914; tomos I y II.

Rangappa N, Romero A, Nelson KD, Eberhart RC, Smith GM. Laminin-coated poly(L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000; 51: 625-634.

- Rao SS, Winter JO.** Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Frontiers in Neuroengineering*. 2009; 2 (6): 1-13.
- Ratner BD, Bryant SJ.** Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Reviews in Biomedical Engineering*. 2004; 6: 42-75.
- Recknor JB, Sakaguchi DS, Mallapragada SK.** Directed growth and selective differentiation of neural progenitor cells on micropatterned polymer substrates. *Biomaterials*. 2006; 27: 4098-4108.
- Ren YJ, Zhang H, Huang H, Wang XM, Zhou ZY, Cui FZ, An YH.** In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups. *Biomaterials*. 2009; 30: 1036-1044.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A.** Embryonic stem cells lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*. 2000; 18: 399-404.
- Reynolds BA, Rietze RL.** Neural stem cells and neurospheres - re-evaluating the relationship. *Nature Methods*. 2005; 2 (5): 333-336.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S.** A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience*. 1992; 12: 4565-4574.
- Reynolds BA, Weiss S.** Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. 1996. *Developmental Biology*; 175: 1-13.
- Reynolds BA, Weiss S.** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian Central Nervous System. *Science*. 1992; 255: 1707-1710.
- Rezwana K, Chena QZ, Blakera JJ, Boccaccini AR.** Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 27: 3413-3431.
- Richardson RM, Broaddus WC, Holloway KL, Fillmore HL.** Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. *Brain Research*. 2005; 1032: 11-22.
- Round J, Stein E.** Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Current Opinion in Neurobiology*. 2007; 17: 15-21.

Ruiz A, Buzanska L, Gilliland D, Rauscher H, Sirghi L, Sobanski T, Zychowicz M, Ceriotti L, Bretagnol F, Coecke S, Colpo P, Rossi F. Micro-stamped surfaces for the patterned growth of neural stem cells. *Biomaterials*. 2008; 29: 4766-4774.

Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2002; 3: 24-33.

Russell R. *Lab. Med.* 1973; 4: 40.

S

Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Developmental Biology*. 1996; 176 (2): 230-242.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 363: 1783-1793.

Sanai N, Tramostin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, García-Verdugo JM, Berger MS, Álvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004; 427: 740-744.

Sánchez Pernaute R. Terapia celular en enfermedades neurodegenerativas: perspectiva desde el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson. *Neurología*. 2003; 18 (7): 335-336.

Sánchez Pernaute R, Studer L, Ferrari D, Perrier A, Lee H, Vinuela A, Isacson O. Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells after transplantation. *Stem Cells*. 2005; 23: 914-922.

Sarikaya M, Tamerler C, Jen AKY, Schulten K, Baneyx F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials*. 2003; 2: 577-585.

Schenke-Layland K, Rofail F, Heydarkhan S, Gluck JM, Ingle NP, Angelis E, Choi CH, MacLellan WR, Beygui RE, Shemin RJ, Heydarkhan-Hagvall S. The use of three-dimensional nanostructures to instruct cells to produce extracellular matrix for regenerative medicine strategies. *Biomaterials*. 2009; 30: 4665-4675.

- Schense JC, Hubbell JA.** Three-dimensional migration of neurites is mediated by adhesion site density and affinity. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 6813-6818.
- Schmalenberg KE, Uhrich KE.** Micropatterned polymer substrates control alignment of proliferating Schwann cells to direct neuronal regeneration. *Biomaterials*. 2005; 26: 1423-1430.
- Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, Langer R.** Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *PNAS*. 1997; 94: 8948-8953.
- Seaberg RM, van der Kooy D.** Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in Neuroscience*. 2003; 26: 125-131.
- Sennerby L, Rostlund T, Albrektsson T.** Acute tissue reactions to potassium alginate with and without colour/flavour additives. *Biomaterials*. 1987; 8: 49-52.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M.** The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*. 1994; 78 (3): 409-424.
- Shapiro L, Cohen S.** Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials*. 1997; 18: 583-590.
- Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrisey EE, Temple S.** The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nature Neuroscience*. 2006; 9: 743-751.
- Shepherd SP, Holzwarth MA.** Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2001; 280 (1): C61-C71.
- Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T.** Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgery Research*. 2006; 133: 185-192.
- Shi D, Wang M, Zhang M, Clare A, Kasuga T, Liu Q.** *Biomaterials and Tissue Engineering*. 2004.
- Sierra DH.** Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical applications. *Journal of Biomaterial Applications*. 1993; 7: 309-352.
- Silva GA.** Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nature Reviews in Neuroscience*. 2006; 7: 65-74.

Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciacyzk J, Volk B, Nikkhah G, Frotscher M, Snyder EY. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nature Methods*. 2006; 3 (10): 801-806.

Skalak R, Fox CF. *Tissue Engineering*. 1988.

Sodunke TR, Turner KK, Caldwell SA, McBride KW, Reginato MJ, Noh H. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials*. 2007; 28: 4006-4016.

Song H, Poo M. The cell biology of neuronal navigation. *Nature Cell Biology*. 2001; 3 (3): E81-E88.

Stokols S, Tuszynski MH. The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials*. 2004; 25: 5839-5846.

Studer L, Tabar V, McKay RD. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature Neuroscience*. 1998; 1: 290-295.

Strübing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mechanisms of Development*. 1995; 53: 275-287.

Sun X, Fu X Sheng Z. Cutaneous stem cells: something new and something borrowed. *Wound Repair and Regeneration*. 2007; 15: 775-785.

Szpak GM, Lewandowska E, Wierzba-Bobrowicz T, Bertrand E, Pasennik E, Mendel T, Stepień T, Leszczynska A, Rafalowska A. Small cerebral vessel disease in familial amyloid and non-amyloid angiopathies: FAD-PS-1 (P117L) mutation and CADASIL. Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Folia Neuropathologica*. 2007; 45 (4): 192-204.

T

Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 102-109.

- Takahashi S, Yamazoe H, Sassa F, Suzuki H, Fukuda J.** Preparation of coculture system with three extracellular matrices using capillary force lithography and layer-by-layer deposition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009; 108 (6): 544-550.
- Tang Z, Yu Y, Guo H, Zhou J.** Induction of tyrosine hydroxylase expression in rat fetal striatal precursor cells following transplantation. *Neuroscience Letters*. 2002; 324 (1): 13-16.
- Temple S.** The development of neural stem cells. *Nature*. 2001; 414: 112-117.
- Thomson JA, Itskowitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 292: 1145-1147.
- Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, Zhao X, Wu P.** Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. *Brain Research*. 2008; 1187: 42-51.
- Tian WM, Hou SP, Ma J, Zhang CL, Xu QY, Lee IS, Li HD, Spector M, Cui FZ.** Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. *Tissue Engineering*. 2005; 11: 513-525.
- Toledo-Aral JJ, Méndez-Ferrer S, Pardal R, López-Barneo J.** Dopaminergic cells of the carotic body: physiological significance and possible therapeutic applications in Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*. 2002; 57: 847-853.
- Toma JG, Ahkavan M, Fernandes KJL, Bernabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD.** Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*. 2001; 3: 778-784.
- Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD.** Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005; 23: 727-737.
- Toulouse A, Sullivan AM.** Progress in Parkinson's disease- Where do we stand?. *Progress in Neurobiology*. 2008; 85: 376-392.
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D.** Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*. 2001; 30: 65-78.
- Tsai EC, Dalton PD, Schoichet MS, Tator CH.** Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *Biomaterials*. 2006; 27: 519-533.

Tunici P, Bulte JW, Bruzzone MG, Poliani PL, Cajola L, Grisoli M, Douglas T, Finocchiaro G. Brain engraftment and therapeutic potential of stem/progenitor cells derived from mouse skin. *The Journal of Gene Medicine*. 2006; 8: 506-513.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (7): 4589-4592.

U

Uemura M, Refaat MM, Shinoyama M, Hayashi H, Hashimoto N, Takahashi J. Matrigel supports survival and neuronal differentiation of grafted embryonic stem cell-derived neural precursor cells. *Journal of Neuroscience Research*. 2010; 88: 542-551.

Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Iejima D, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials*. 2003; 24: 2277-2286.

V

Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999; 354: S132-S134.

Valentini RF, Vargo TG, Gardella JA, Aebischer P. Patterned neuronal attachment and outgrowth on surface modified, electrically charged fluoropolymer substrates. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*. 1993; 5: 13-36.

Valenzuela MJ, Dean SK, Sachdev P, Tuch BE, Sidhu KS. Neural precursors from canine skin: a new direction for testing autologous cell replacement in the brain. *Stem Cells and Development*. 2008; 17: 1087-1094

Valmikinathan CM, Defroda S, Yu X. Polycaprolactone and bovine serum albumin based nanofibers for controlled release of nerve growth factor. *Biomacromolecules*. 2009; 10 (5): 1084-1089.

Van den Heuvel DMA, Pasterkamp RJ. Getting connected in the dopamine system. *Progress in Neurobiology*. 2008; 85: 75-93.

Varki A, Chrispeels MJ. Essentials of glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1999.

Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernández-Moreno C, de Pablo F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23: 895-906.

Villadiego J, Méndez-Ferrer S, Valdés-Sánchez T, Silos-Santiago I, Farinas I, López-Barneo J, Toledo-Aral JJ. Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 4091-4098.

Vitalis T, Cases O, Parnavelas JG. Development of the dopaminergic neurons in the rodent brainstem. *Experimental Neurology*. 2005; 191 (Suppl1): S104-S112.

Vogt AK, Brewer GJ, Offenhäusser A. Connectivity patterns in neuronal networks of experimentally defined geometry. *Tissue Engineering*. 2005; 11: 1757-1767.

Vogt AK, Stefani FD, Best A, Nelles G, Yasuda A, Knoll W, Offenhäusser A. Impact of micropatterned surfaces on neuronal polarity. *Journal of Neuroscience Methods*. 2004; 134: 191-198.

W

Walsh S, Gordon T, Addas BMJ, Kemp SWP, Midha R. Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation. *Experimental Neurology*. 2010; 223 (1): 221-228.

Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurgery Focus*. 2009; 26 (2): 1-9.

Wang KK, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis-Haley DP, Swann DA, Kuo JW, Bryan DJ, Cetrulo CL. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery*. 1998; 18: 270-275.

Wang S, Wan AC, Xu X, Gao S, Mao HQ, Leong KW, Yu H. A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly(phosphoester). *Biomaterials*. 1999; 22: 1157-1169.

Wang TW, Spector M. Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5 (7): 2371-2384.

- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Weathley M, Peterson AC, Reynolds BA.** Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *Journal of Neuroscience*. 1996; 16: 7599-7609.
- Weissman IL.** Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000; 287: 1442-1446.
- Wells MR, Kraus K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniadis HN, Hansson HA.** Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen and methylcellulose. *Experimental Neurology*. 1997; 146: 395-402.
- Whitworth IH, Brown RA, Dore CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G.** Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *Journal of Hand Surgery*. 1996; 21: 514-522.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM.** Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 2002; 110: 385-397.
- Wiesmann C, de Vos AM.** Nerve growth factor: structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001; 58 (5-6): 748-759.
- Williams DF.** On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009; 30: 5897-5909.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Wilson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM.** Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 1988; 336: 684-687.
- Woerly S, Pinet E, de RL, Van DD, Bousmina M.** Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials*. 2001; 22: 1095-1111.

X

- Xie J, Willerth SM, Li X, Macewan MR, Rader A, Sakiyama-Elbert SE, Xia Y.** The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. *Biomaterials*. 2009; 30: 354-362.
- Xiong Y, Zeng YS, Zeng CG, Du BL, He LM, Quan DP, Zhang W, Wang JM, Wu JL, Li Y, Li J.** Synaptic transmission of neural stem cells seeded in 3-dimensional PLGA scaffolds. *Biomaterials*. 2009; 30: 3711-3722.

Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*. 1995; 351 (1): 145-160.

Y

Yamada H, Dezawa M, Shimazu S, Baba M, Sawada H, Kuroiwa Y, Yamamoto I, Kanno H. Transfer of the von Hippell-Lindau gene to neuronal progenitor cells in treatment form Parkinson's disease. *Annual Neurology*. 2003; 54; 352-359.

Yamada T, Sawada R, Tsuchiya T. The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes. *Biomaterials*. 2008; 29: 3503-3513.

Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2005; 26: 2603-2610.

Yang LY, Zheng JK, Liu XM, Hui GZ, Guo LH. Culture of skin-derived precursors and their differentiation into neurons. *Chinese Journal of Traumatology*. 2004; 7 (2): 91-95.

Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part 1. Traditional Factors. *Tissue Engineering*. 2001; 7 (6): 679-689.

Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*. 1998; 93: 755-766.

Yim EKF, Reano RM, Pang SW, Yee Af, Chem CS, Leong KW. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2005; 26: 5405-5413.

Yu LMY, Leipzig ND, Schoichet MS. Promoting neuron adhesion and growth. *Materials Today*. 2008; 11 (5): 36-43.

Yurchenco PD, Wadsworth WG. Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004; 16 (5): 572-579.

Z

- Zeng X, Cai J, Chen J, Luo Y, You ZB, Fotter E, Wang Y, Harvey B, Miura T, Backman C, Chen GJ, Rao MS, Freed WJ.** Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004; 22: 925-940.
- Zhang J, Venkataramani S, Xu H, Song YK, Song HK, Palmore GTR, Fallon J, Nurmikko AV.** Combined topographical and chemical micropatterns for templating neuronal networks. *Biomaterials*. 2006; 27: 5734-5739.
- Zhang N, Yan H, Wen X.** Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Research Reviews*. 2005; 49: 48-64.
- Zhang N, Zhang C, Wen X.** Fabrication of semipermeable hollow fiber membranes with highly aligned texture for nerve guidance. *Journal of Biomedical Material Research*. 2005; 75 (A): 941-949.
- Zhang R, Ma PX.** Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000; 52: 430438.
- Zhang S, Yan L, Altman M, Lässle M, Nugent H, Frankel F, Lauffenburger DA, Whitesides GM, Rich A.** Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation. *Biomaterials*. 1999; 20: 1213-1220.
- Zhang W, Zeng Y, Wang J, Ding Y, Li Y, Wu W.** Neurotrophin-3 improves retinoic acid-induced neural differentiation of skin-derived precursors through a p75NTR-dependent signaling pathway. *Neuroscience Research*. 2009; 64: 170-176.
- Zhang Z, Rouabhia M, Wang Z, Roberge C, Shi G, Roche P, Li J, Dao LH.** Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration. *Artificial Organs*. 2007; 31 (1): 13-22.
- Zhao M, Isom SC, Lin H, Hao Y, Zhang Y, Zhao J, Whyte JJ, Dobbs KJ, Prather RS.** Tracing the stemness of porcine skin-derived progenitors (pSKP) back to specific marker gene expression. *Cloning Stem Cells*. 2009; 11 (1): 111-122.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM.** Evidence of neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *PNAS*. 2003; 100: 7925-7930.

ZhenHua R, Yu Z. Cells therapy for Parkinson's disease - so close and so far away. *Science in China Series C: Life Sciences*. 2009; 52 (7): 610-614.

Zhou JM, Chu JX, Chen XJ. An improved protocol that induces human embryonic stem cells to differentiate into neural cells in vitro. *Cell Biology International*. 2008; 32: 80-85.

APÉNDICE

Durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral (2007-2010) parte de los resultados obtenidos han sido difundidos mediante publicación y participación en diversas reuniones científicas.

PUBLICACIONES

García Parra P, Cavaliere F. Dermal niche for future autologous transplantation in Parkinson's Disease patients. *Current Situation and Future Prospects of Regenerative Medicine in Parkinson's Disease*, 2009; 3: 41-52. Editorial: Research Singpost. Editores: G. Linazasoro, F. Cavaliere. ISBN: 978-81-308-0271-8.

REUNIONES CIENTÍFICAS

Autores: Patricia García Parra, José Iñaki Álava Marquínez.

Título: Desarrollo de un nuevo soporte polimérico con componentes de matriz extracelular para diferenciación neuronal *in vitro*.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Reunión científica: GEN XXI: Grupo Español de Neurotransmisión/Neuroprotección.

Lugar: Cardona (Barcelona).

Fecha: 16-18 de diciembre de 2010.

Autores: Patricia García Parra, José Iñaki Álava Marquínez.

Título: Biomateriales aplicados a la terapia neuroreparadora.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Reunión científica: Neurociencia y Biotecnología aplicadas: una mirada hacia las terapias neuroregeneradoras. Curso de verano de la UPV-EHU.

Lugar: San Sebastián.

Fecha: 30 de junio, 1 y 2 de julio de 2010.

Autores: Patricia García Parra, Fabio Cavaliere.

Título: Aislamiento y caracterización de precursores neurales a partir de piel humana adulta.

Tipo de participación: Póster.

Reunión científica: VII Jornadas de Jóvenes Investigadores.

Lugar: Barcelona.

Fecha: 25-27 de febrero de 2009.

Autores: Patricia García Parra, Fabio Cavaliere.

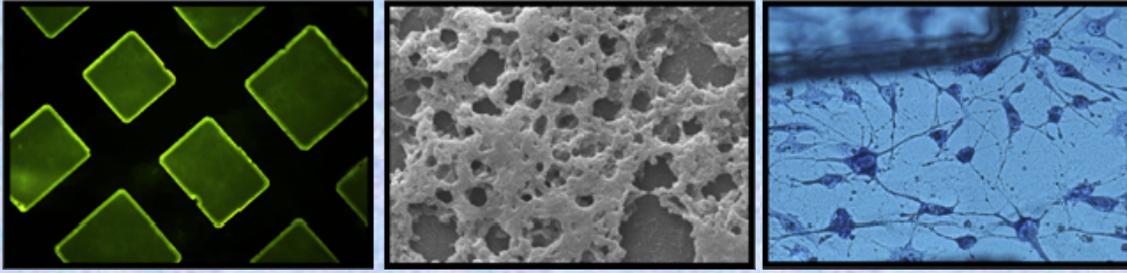
Título: Isolation and characterization of neural precursor cells with dermal origin for future autologous transplantation in Parkinson's disease.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Reunión científica: I Conferencia Internacional de Estudiantes de Ciencias Experimentales - Experimental Science in "Pablo de Olavide" University 2008 (ESPOU'08)

Lugar: Sevilla.

Fecha: 12-16 de noviembre de 2008.



Este trabajo de Tesis Doctoral presenta el desarrollo, la caracterización y la validación de un nuevo soporte polimérico capaz de inducir la diferenciación neuronal *in vitro*, combinando técnicas de fotolitografía y de matrices extracelulares. La biocompatibilidad y eficiencia en la diferenciación neuronal y dopaminérgica sobre el soporte desarrollado, se ha comprobado tanto a nivel de línea celular establecida (PC12) como a nivel de cultivos primarios. En este caso, se han utilizado tres tipos de células: (i) células de hipocampo de rata embrionaria (E18), (ii) células precursoras neurales de zona subventricular de rata neonata (P2-P3), y (iii) células precursoras derivadas de piel de rata adulta. Con estos tres tipos celulares se ha pretendido demostrar, respectivamente, (i) la capacidad de diferenciación neuronal de células ya determinadas al linaje neuronal en estadios tempranos de desarrollo (embrionario); (ii) la capacidad de diferenciación no sólo neuronal sino también dopaminérgica de células multipotentes neurales, con capacidad de plasticidad y relacionadas con la neurogénesis adulta; y (iii) la respuesta de células de origen no neural, descritas en la literatura como una fuente importante de células precursoras neurales con potencialidad en trasplantes autólogos. Como conclusión global al trabajo presentado, se puede decir que el cultivo de células precursoras neurales en sustratos tridimensionales con componentes similares a la propia matriz extracelular neural, representa un medio eficaz para el desarrollo de nuevos tejidos neurales trasplantables, pudiendo servir como una estrategia prometedora en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la Enfermedad de Parkinson. Además, el cultivo de otros tipos celulares en el soporte desarrollado puede servir como modelo de liberación controlada de moléculas implicadas en la diferenciación celular, o como modelo para el estudio de moléculas implicadas en diferentes enfermedades.

