



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IMPACTO DEL USO DE NANOFIBRAS DE POLÍMERO BIOCOMPATIBLE COMO
MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS
TRONCALES EMBRIONARIAS DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ AGAPCEL FELIPE

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA, UNAM.
DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MARZO, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

IMPACTO DEL USO DE NANOFIBRAS DE POLÍMERO BIOCOMPATIBLE COMO

MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS

TRONCALES EMBRIONARIAS DE RATÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ AGAPCEL FELIPE

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA, UNAM.

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2021.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/632/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **MARTÍNEZ RODRÍGUEZ AGAPCEL FELIPE** con número de cuenta **304262076** con la tesis titulada **"IMPACTO DEL USO DE NANOFIBRAS DE POLÍMERO BIOCOMPATIBLE COMO MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DE RATÓN"**, realizada bajo la dirección del **DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
Vocal: DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES
Secretario: DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ
Suplente: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
Suplente: DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO IRIARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de septiembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme todo lo necesario para realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por el apoyo económico brindado durante la realización de la maestría.

A mi tutor, el Dr. Paul Mondragón Terán, por haberme dado la gran oportunidad de integrarme a su laboratorio. Agradezco todos los conocimientos que me brindó para mi crecimiento profesional y personal.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Rolando Hernández Muñoz y el Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, por su orientación y apoyo durante todo el proceso de la maestría.

Agradecimientos personales

A mis padres y hermanos por apoyarme siempre.

A Daniela por estar a mi lado y apoyarme en todos los aspectos de mi vida.

A mi amigo Eve, por brindarme su amistad de ya muchos años.

A mis compañeros de laboratorio que con el tiempo se convirtieron en grandes amigos: Miguel Ángel, Alan, Mario Antonio, Adrián y Abisai.

A la Dra. Rebeca por brindarme su apoyo en momentos difíciles.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías del laboratorio de Microscopia electrónica de barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por su colaboración en el procesamiento de muestras y obtención de material fotográfico para la elaboración de esta tesis.

Por último, a mi tutor el Dr. Paul Mondragón, por guiarme en este trabajo y siempre estar al pendiente de mi formación académica.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. Medicina regenerativa e ingeniería de tejidos..... | 3 |
| 1.2 Células troncales embrionarias de ratón | 4 |
| 1.3 Diferenciación neural | 8 |
| 1.4 Matriz extracelular | 12 |
| 1.5 Matriz extracelular en tejido neural..... | 15 |
| 1.6 Electrohilado | 18 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 22 |
| 3. OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 General | 23 |
| 3.2 Particulares..... | 23 |
| 4. HIPOTESIS | 23 |
| 5. ANTECEDENTES | 24 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 36 |
| 6.1 Cultivo y mantenimiento de Células Troncales Embrionarias de Ratón (CTER) de la línea celular E14Tg2a | 36 |
| 6.2 Cultivo y subcultivo celular de las células troncales de ratón..... | 37 |
| 6.3 Mantenimiento de células troncales embrionarias de ratón | 38 |
| 6.4 Evaluación del estado pluripotente de las CTER a través de la técnica de inmunocitoquímica | 38 |
| 6.5 Cuantificación del área de células troncales embrionarias de ratón..... | 39 |
| 6.6 Cinética de proliferación de las células troncales embrionarias de ratón | 40 |
| 6.7 Optimización de la diferenciación neural de las CTER | 41 |
| 6.8 Evaluación de la diferenciación neural de las CTER a través de la técnica de inmunocitoquímica | 42 |
| 6.9 Electrohilado | 43 |
| 6.10 Cultivo y diferenciación neural en andamios de gelatina/ácido hialurónico..... | 44 |
| 6.11 Evaluación de diferenciación neural de las CTER en los andamios de gelatina/ácido hialurónico. | 45 |
| 6.12 Obtención de imágenes por microscopía electrónica de barrido..... | 45 |
| 7. RESULTADOS | 46 |

| | |
|--|----|
| 7.1 Evaluación del estado pluripotente de las CTER a través de inmunocitoquímica (ICQ) | 46 |
| 7.2 Cinética de proliferación de las CTER de la línea celular E14Tg2a | 47 |
| 7.3 Optimización de la diferenciación neural usando dos medios de cultivo químicamente definidos, NDIFF y RHB-A | 48 |
| 7.4 Optimización en la generación de nanofibras compuestas por gelatina:ácido hialurónico mediante la técnica de electrohilado..... | 54 |
| 7.5 Diferenciación neural en andamios de nanofibras de gelatina/ácido hialurónico | 60 |
| 7.6 Microscopia electrónica de barrido | 68 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 71 |
| 9. CONCLUSIONES | 75 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 76 |

RESUMEN

La medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos se han convertido en disciplinas que han cobrado relevancia debido al prometedor futuro que representan los avances que se han dado, como por ejemplo la diferenciación celular hacia algún linaje en específico a partir de células troncales embrionarias de ratón o la formación de andamios que puedan ser capaces de sostener cultivos celulares para su posterior implantación para la recuperación de algún tejido dañado; por esta razón el objetivo de este estudio fue la construcción de un andamio formado por nanofibras constituidas por una combinación de gelatina y ácido hialurónico; dicho andamio fue diseñado para que en él se realizara una diferenciación neural. La elección de estos biopolímeros se debe a que son el mayor constituyente de la matriz extracelular del cerebro en mamíferos, lo que nos permitiría producir un andamio que mimetizara el ambiente natural que rodea a las células de linaje neural. El constructo final obtenido fue resultado de varias fases en el proyecto, en primera instancia se optimizó el proceso de diferenciación neural, posteriormente se estandarizó la fabricación de nanofibra a través de la técnica de electrohilado, el andamio resultante fue caracterizado mediante imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. Y la última fase de este estudio fue realizar la diferenciación neural en los andamios construidos, dicha diferenciación fue lograda. Así, este trabajo provee de resultados que confirman que existe la posibilidad de llevar a cabo estos procesos de diferenciación en sistemas diferentes al cultivo celular en monocapa.

ABSTRACT

Regenerative medicine and tissue engineering have become disciplines that have gained relevance due to the promising future represented by the advances that have been made, such as cell differentiation towards a specific lineage from mouse embryonic stem cells or the formation of scaffolds that can be affected from cell cultures for subsequent implantation for the recovery of damaged tissue. For this reason the objective of this study was the construction of a scaffolding formed by nanofibers constituted by a combination of gelatin and hyaluronic acid; the scaffolding was designed so that a neural differentiation was carried out. The choice of these biopolymers is because they are the largest constituent of the extracellular matrix of the brain in mammals, which allows us to produce a scaffold that mimics the natural environment surrounding neural lineage cells. The final construct obtained was the result of several phases in the project. Initially the process of neural differentiation was optimized, subsequently the manufacture of the nanofiber was standardized through the electro-spinning technique, the resulting scaffold was characterized through images obtained by scanning electron microscopy. In the last phase of this study we performed neural differentiation in the built scaffolds, and differentiation was achieved. Thus, this work provides results that confirm the possibility of carrying out neural differentiation processes in systems other than monolayer cell cultures.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Medicina regenerativa e ingeniería de tejidos

La medicina regenerativa se define como un campo multidisciplinario que aplica la ingeniería y los principios de las ciencias de la vida para promover la regeneración, potencialmente la medicina regenerativa puede restaurar tejidos enfermos o dañados, e incluso órganos completos. Esta disciplina engloba numerosas estrategias, que incluye el uso de materiales sintéticos, biológicos y células derivadas *in vitro*, así como varias combinaciones de los mismos, para sustituir el tejido faltante, seccionado o no funcional, reemplazándolo estructural y funcionalmente, o bien para contribuir a la restauración del tejido.

La medicina regenerativa tiene el potencial para sanar o reemplazar tejidos u órganos dañados, ya sea por edad, enfermedad, traumatismo, así como para normalizar defectos congénitos. Actualmente existen datos clínicos y preclínicos prometedores que respaldan la posibilidad de tratar ciertas enfermedades crónicas, así como una gama amplia de daños, tales como heridas dérmicas, enfermedades cardiovasculares y tratamientos para ciertos tipos de cáncer (Jaklenec *et al.*, 2012).

Las células utilizadas en estas terapias son autólogas o alogénicas y éstas son típicamente diferenciadas que aún mantienen capacidad proliferativa. Por ejemplo, Carticel, el primer producto biológico aprobado por la FDA en el campo ortopédico utiliza condrocitos autólogos para el tratamiento de los defectos del cartílago articular focal. En este ejemplo, los condrocitos autólogos se recogen del cartílago articular, se expanden *ex vivo*, y se implantan en el sitio de la lesión, lo que resulta en una recuperación comparable a la observada mediante técnicas de microfractura y mosaicoplastia (Dewan *et al.*, 2014).

Desde que la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa surgieron como un área de investigación hace aproximadamente dos décadas, varias terapias han recibido la aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y actualmente se encuentran disponibles comercialmente. Tabla 1.

Tabla 1. Productos basados en la medicina regenerativa aprobados por la FDA.

| Categoría | Nombre | Agente biológico | Uso aprobado |
|---|-------------------|--|--|
| Biológicos | laViv | Fibroblastos autólogos | Mejora de la apariencia del pliegue nasolabial |
| | Carticel | Condrocitos autólogos | Defectos del cartílago por trauma agudo o repetitivo |
| | Apligraf, GINTUIT | Queratinocitos y fibroblastos alogénicos cultivados en colágeno bovino | Afecciones mucogingivales tóxicas, úlceras en piernas y pie diabético |
| | Sangre de cordón | Células hematopoyéticas y progenitoras. | Reconstitución hematopoyética e inmunológica después del tratamiento mieloablativo |
| Dispositivos médicos basados en células | Dermagraft | Fibroblastos alogénicos | Úlcera de pie diabético |
| | Celution | Extracción celular | Transferencia de células troncales adiposas autólogas |
| Biofarmacéuticos | GEM 125 | PDGF-BB Fosfato tricálcico | Defectos periodontales |
| | Regranex | PDGF-BB | Úlceras diabéticas de las extremidades inferiores. |
| | Injerto óseo | BMP-2 | Fractura de tibia |

En resumen, el suministro de células terapéuticas que contribuyen directamente a la estructura y función de los nuevos tejidos es un paradigma fundamental de la medicina regenerativa hasta la fecha (Buckler, 2011).

1.2 Células troncales embrionarias de ratón

Las células troncales embrionarias son un tipo celular peculiar y versátil, debido a su capacidad de dar origen a células de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Aunque la mayoría de las células del cuerpo, como las células del corazón o de la piel, están sujetas a realizar una función específica, una

célula troncal no está comprometida y permanece sin comprometerse, hasta que recibe una señal para convertirse en un tipo celular especializado (Kumar y Singh, 2006).

El estado de pluripotencia presentada por las células troncales embrionarias está regulada por proteínas tales como Oct 4, Klf4, c-Myc y Sox 2. Una de las principales proteínas que interviene en esta cadena de reacciones es Oct 4, el cual es un factor de transcripción, también conocido como Oct-3, Oct-3/4, Otf-3 o NF-A3, que es codificado por el gen *Pou5f1* (localizado en el cromosoma 17 de ratón) perteneciente a la familia de genes que codifican para proteínas con el dominio POU de unión a DNA. Estas proteínas regulan la expresión de los genes blanco mediante la unión al motivo octámero ATGCAAAT dentro de sus regiones promotoras o potenciadoras. Oct-4, cuya expresión está asociada con las propiedades pluripotentes de las células troncales, es un factor esencial que controla la etapa temprana de la embriogénesis de los mamíferos.

En las células troncales embrionarias de ratón (CTER), el LIF (factor inhibidor de la leucemia), a través de la activación de la vía JAK1 / STAT3, es una citoquina esencial que evita la diferenciación, es decir, que coadyuva en mantener el estado pluripotente. Stat3 activa la expresión de un número significativo de genes relacionados con la pluripotencia en estas células (Trouillas *et al.*, 2009). Además, algunos de los genes objetivo de Stat3 también están regulados por Oct4., por ejemplo, Oct4 y Stat3 se unen directamente a la región promotora del gen *Eed* (desarrollo de ectodermo embrionario) que codifica un componente central del complejo represivo Polycomb 2 (Ura *et al.*, 2008; Ura *et al.*, 2011). Además, se requiere Klf4 (factor de transcripción similar a Krüppel 4), un objetivo directo de Oct4 y Stat3, para la auto renovación de las células y el mantenimiento de la pluripotencia (Li *et al.*, 2005; Niwa *et al.*, 2009; Papapetrou *et al.*, 2009). Estos datos revelaron que la cooperación entre la red intrínseca de Oct-4 y la vía LIF extrínseca, es crucial para regular la auto renovación y la pluripotencia de las CTER. Sin embargo, los objetivos de Oct4 y LIF están regulados de diferentes maneras en la diferenciación celular provocada por la retirada de LIF, de hecho, el ARNm y la proteína de Oct4 permanecen en un nivel alto durante unos días tras la retirada de LIF. Esto contrasta con muchos de los objetivos de LIF (denominados genes Pluri como *Mras*, *Ceacam1* y *2*, *Irak3*, *Esrrb*) cuya expresión de ARNm disminuyó en el primer día de retiro de

LIF concomitantemente con la diferenciación celular (Trouillas *et al.*, 2009a; Trouillas,2009b; Mathieu *et al.*, 2012). También se ha demostrado recientemente que la expresión no regulada de *Mras*, una pequeña GTPasa de la familia *ras*, conduce a una alteración en la expresión de *Oct4*, lo que indica un vínculo potencial entre esta pequeña GTPasa y la regulación de *Oct4* (Mathieu, 2013). Figura 1.

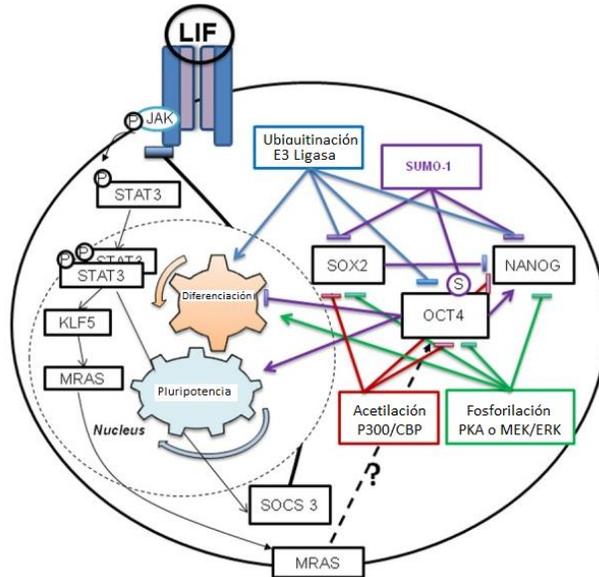
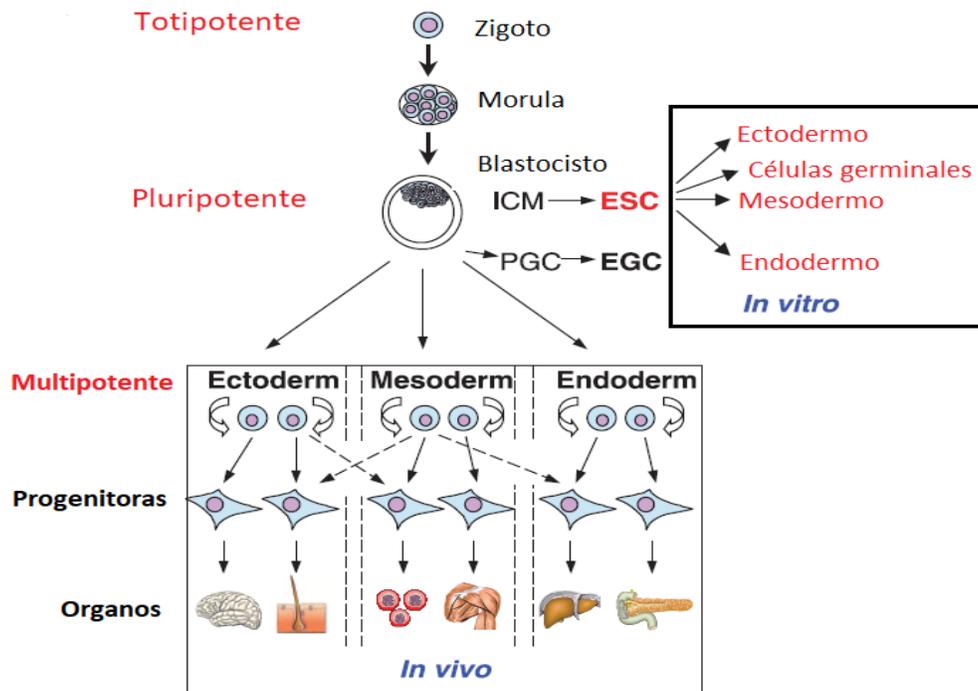


Figura 1. Vía de señalización para el mantenimiento de pluripotencia. El esquema muestra la activación de la vía JAK-STAT, debido a la captación del factor inhibidor de leucemia (LIF); la activación de esta vía desactivará la función de la Ubiquitin E3 ligasa, liberando así a Oct ¾ para realizar la función de inhibir la diferenciación celular, es decir, toda esta sinergia mantendrá el estado pluripotente en las células (Tomado y modificado de Mathieu, 2013).

Muchos de los avances en medicina regenerativa se basan en estudios enfocados al proceso de la embriogénesis de ratón; la cual inicia con el ovulo fertilizado, de donde se generará un organismo completo. Esta capacidad, se define como totipotencia, la cual es retenida por la progenie temprana del cigoto hasta la etapa de ocho células de la mórula. Posterior a esto, la diferenciación celular da como resultado la formación de un blastocisto compuesto por células trofoblásticas externas y células internas no diferenciadas, comúnmente denominadas "masa celular interna" (ICM, por sus siglas en inglés). Las células de la ICM ya no son totipotentes, pero conservan la capacidad de desarrollarse en todos los tipos de células del embrión (pluripotencia; Figura 2). El origen embrionario de las CTER y

las células troncales embrionarias de humano es la razón principal por la que la investigación en este campo es un tema de gran interés científico y de vigoroso debate público, influenciado por posiciones éticas y legales. (Wobus y



Boheler,2005)

Figura 2. Jerarquía de las células troncales. Las etapas de cigoto y de división celular temprana (blastómeros) hasta la etapa de mórula se definen como totipotentes, porque pueden generar un organismo complejo. En la etapa de blastocisto, solo las células de la masa celular interna (ICM) conservan la capacidad de formar las tres capas germinales primarias, el endodermo, el mesodermo y el ectodermo, así como las células germinales primordiales (PGC), las células fundadoras de gametos masculinos y femeninos (Tomado y modificado de Wobus y Kenneth, 2005).

En los tejidos de un organismo adulto, existen células troncales y progenitoras multipotentes en los tejidos y órganos para reemplazar las células perdidas o lesionadas. En la actualidad, no se sabe completamente en qué medida las células troncales adultas también pueden diferenciarse en células de otros linajes o qué factores podrían mejorar su capacidad de diferenciación (líneas discontinuas). Las CTER, derivadas de la ICM, tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* en células de todos los linajes de células somáticas, así como en células germinales masculinas y femeninas.

1.3 Diferenciación neural

El descubrimiento de células troncales neurales se basó en estudios clásicos de hematopoyesis y desarrollo neural de invertebrados, que inspiraron el examen de células progenitoras neurales únicas. Las células troncales neurales son un subtipo de células progenitoras en el sistema nervioso que pueden autorenovarse y generar tanto neuronas como glia. Los primeros estudios condujeron al aislamiento de células similares a células troncales del sistema nervioso central y del sistema nervios periférico de embriones de mamíferos (Stemple y Anderson, 1992). Desde entonces, las células troncales han sido aisladas de muchas regiones del sistema nervioso del embrión lo que indica su ubicuidad (Figura 3). Por otra parte, las células troncales neurales adultas no se han encontrado en dos principales regiones neurogénicas adultas: el hipocampo y la zona subventricular; y aparentemente en algunas zonas no neurogénicas incluyendo a la medula espinal (Gage, 2000). Los primeros estudios proporcionaron los mecanismos celulares para la neurogénesis en adultos, los cuales fueron bien establecidos en aves y posteriormente en mamíferos, planteando así la posibilidad que el tejido más intratable (sistema nervioso central) pudiera convertirse en una fuente para la regeneración.

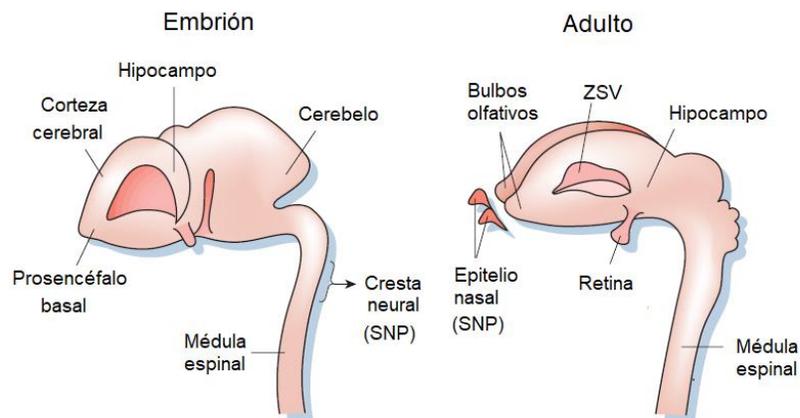


Figura 3. Localización de las células troncales neurales. El esquema muestra las zonas del sistema nervioso central de un embrión de mamífero en donde se ha conseguido aislar células troncales; también se muestra el mismo sistema de un adulto, en donde a diferencia del primero en las zonas del hipocampo y zona ventricular no ha sido posible aislar dichas células troncales. (Tomado y modificado de Temple, 2001).

En la figura 4 se esquematiza el desarrollo de células troncales en el sistema nervioso central de los mamíferos. La alineación de los eventos de desarrollo *in vivo* con el comportamiento *in vitro* de las células troncales derivadas del cerebro anterior embrionario ha llevado al siguiente concepto de cómo las células troncales neurales cambian con el tiempo. Las células neuroepiteliales tempranas son columnares, que tocan las superficies ventricular y pial durante el ciclo celular. En la mitad de la gestación, las neuronas jóvenes han migrado por encima de la zona del ventrículo germinal (ZV), la glía radial continúa en contacto tanto con el ventrículo como con el pia, guiando la migración neuronal, y surge una segunda zona germinal, la zona subventricular (SZV). En las edades postnatales, la glía radial se ha transformado en astrocitos y la ZV también desaparece, pero la ZSV permanece en la edad adulta en algunas áreas. Las células troncales presentes en el neuroepitelio cortical cerebral temprano se dividen simétricamente primero y luego asimétricamente para generar una progenie diferenciada. Las neuronas se producen primero, y migran a lo largo de la glía radial hacia la superficie pial donde se asientan en la subplata (SP) y la placa cortical (CP). Después del período neurogénico, la célula troncal produce células progenitoras gliales que proliferan en gran medida en la SVZ. Al nacer, la célula troncal se ha desarrollado y tiene diferentes características, como el responder a factores de crecimiento. El desarrollo de las células troncales podría ser impulsado por una combinación de programas temporales intrínsecos y señales extracelulares del entorno cambiante del cerebro en desarrollo (Temple, 2001).

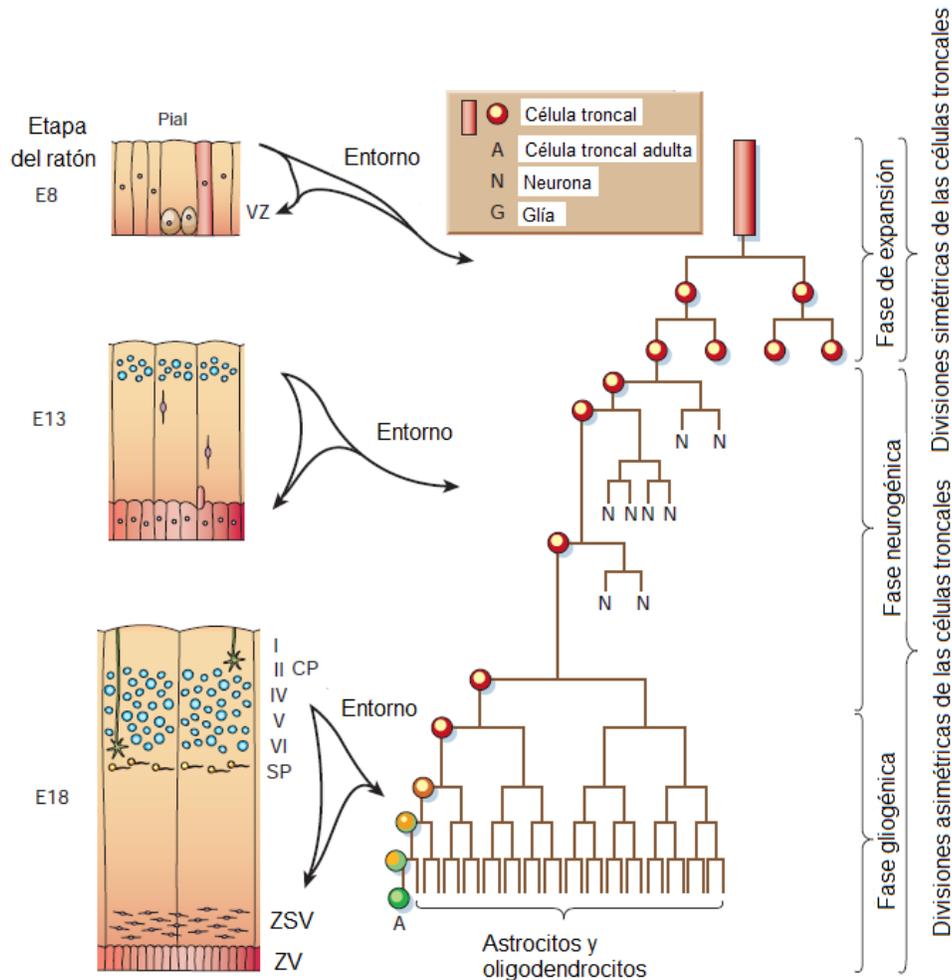


Figura 4. Desarrollo de las células troncales del sistema nervioso central de mamíferos. Diferenciación del linaje neural en mamíferos a través del tiempo, en la etapa 8 (E8), se observa un proceso de expansión celular de células troncales, a partir de la etapa 13 (E13), éstas células se empiezan a diferenciar hacia neuronas, a partir de la etapa 18 (E18) las neuronas se empiezan a especializar hacia otros tipos celulares como por ejemplo: astrocitos y oligodendrocitos. En esta etapa (en una menor medida) aún es posible observar la presencia de células troncales (A). (Tomado y modificado de Temple, 2001).

El aislamiento y cultivo de CTER ha abierto la posibilidad de generar un número ilimitado de células de cualquier tipo celular. Esto es de particular interés para los neurobiólogos, debido a que no existen cantidades suficientes de poblaciones de células homogéneas para caracterizar las neuronas del cerebro a nivel molecular. Además, como las células troncales embrionarias pueden manipularse

genéticamente o aislarse fácilmente de ratones portadores de mutaciones relevantes, se pueden comparar neuronas de tipo silvestre y mutantes y así identificar los mecanismos que causan la pérdida de tipos celulares específicos en enfermedades neurodegenerativas. Conforme las vías de diferenciación que conducen a la generación de neuronas específicas a partir de células troncales embrionarias se comprendan mejor, también puede ser posible aislar células en diferentes etapas de diferenciación para caracterizar los precursores neuronales.

El interés clínico en el uso de estas células troncales embrionarias ha sido estimulado por varios estudios mostrando que células humanas aisladas con propiedades de células troncales propias de la masa interna celular o el desarrollo de células germinales pueden ofrecer una fuente de precursores somáticos. Varios estudios han definido las condiciones *in vitro* para promover el desarrollo de tipos celulares específicos como, por ejemplo, células hematopoyéticas, mesodermales y neuroectodermales (Bain, 1995)

Un problema importante que queda por resolver al usar células troncales embrionarias para generar neuronas es la heterogeneidad celular. Típicamente, los cultivos neuronales derivados de células troncales embrionarias contienen una variedad de subtipos neuronales, así como células no neurales, incluyendo células gliales y en cierto alcance, células troncales embrionarias no diferenciadas. Recientemente, se ha progresado con el uso de señales inductivas, tanto definidas como indefinidas, y factores de transcripción para enriquecer sustancialmente los subtipos de neuronas, particularmente las neuronas dopaminérgicas y las neuronas motoras. Así, los factores de transcripción como Nurr1 o el cultivo de células troncales con otros tipos de células aumentan notablemente la generación de neuronas dopaminérgicas, mientras que los factores extrínsecos como Sonic heghog aumentan el de las neuronas motoras. Además, se ha demostrado que las neuronas motoras así generadas, se integran en el tejido del huésped después del trasplante (Bibel et al., 2004).

1.4 Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) tiene importantes roles en el desarrollo, función y homeostasis de todas las células eucariotas. Adicionalmente provee un soporte físico a las células, la MEC participa activamente en el establecimiento y mantenimiento de diferentes tejidos y órganos, ya que regula la cantidad de factores de crecimiento, así como de receptores, el nivel de hidratación y pH del ambiente celular (Mecham, 2012). Estas diversas funciones se logran a través de su compleja composición química y organización; aunque está compuesta principalmente de agua, proteínas y polisacáridos, la MEC muestra una exquisita especificidad en cada tejido como resultado de las composiciones y topografías únicas de ésta, que se generan a través de una dinámica interacción bioquímica y biofísica entre las distintas células de cada tejido y el microentorno (Naba, 2012). La MEC madura también puede someterse a una remodelación dinámica en respuesta a estímulos ambientales, como la fuerza aplicada o lesiones, lo que permite al tejido mantener la homeostasis y responder a los desafíos y estrés fisiológicos, como puede ser una enfermedad (Lu *et al.*, 2011).

En mamíferos la MEC está compuesta por alrededor de 300 proteínas, conocidos como el núcleo del matrisoma y ésta se define como la unidad de proteoglicanos que se repite y que aloja entre sus cadenas de condroitín sulfato, numerosos electrones que conforman la carga eléctrica negativa del campo de la matriz extracelular, lo que le confiere la capacidad de mantener la homeostasis osmótica, iónica, electromagnética, electrónica y protónica, tanto a nivel local como sistémico (Naranjo *et al.*, 2009).

Este matrisoma además está constituido por proteínas tales como colágena, proteoglicanos y glicoproteínas (Figura 4). Dentro de las glicoproteínas podemos encontrar a las fibronectinas, constituidas por dos cadenas de polipéptidos unidos por puentes disulfuro. Dentro de su estructura poseen sitios de unión que permitirán unirse a otras moléculas como la colágena, algunos proteoglicanos, glucosaminoglicanos, fibrina, heparina y a proteínas de la superficie celular como las integrinas. Estas fibronectinas también pueden aparecer como fibras insolubles en tejidos conectivos o de manera soluble presente en el plasma de los fluidos

corporales, por ejemplo, en la sangre. En el desarrollo embrionario las fibronectinas poseen un rol importante generando vías por donde les es posible a las células migrar de un lugar a otro dentro del embrión.

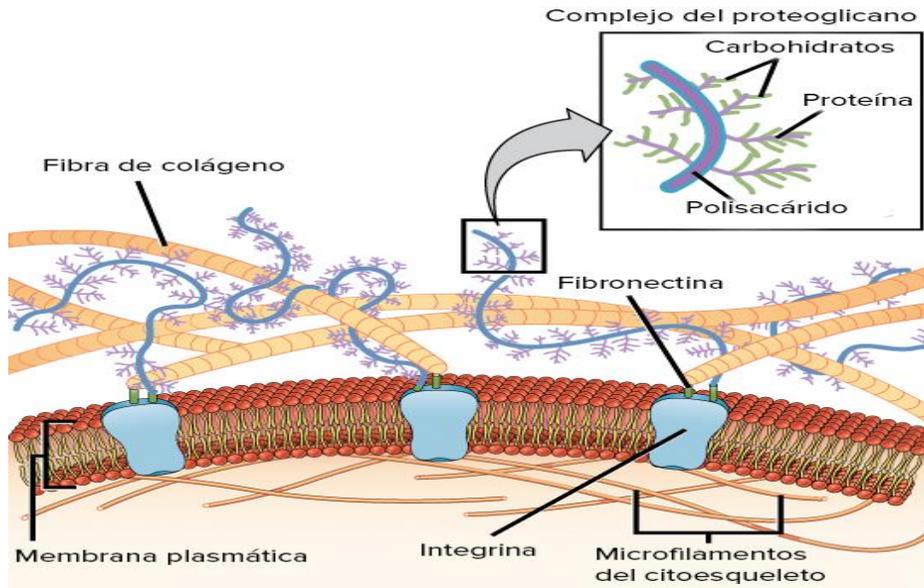


Figura 5. Matriz extracelular. Composición de la matriz extracelular en mamíferos, en donde es apreciable una mayor presencia de colágeno (constituido principalmente por los aminoácidos prolina, lisina y glicina) y fibronectina.

Por otra parte, la MEC ofrece mucho más que soporte mecánico y estructural, con implicaciones en los patrones de desarrollo y nichos de células troncales para mantener su estado y diferenciación. La MEC provee una estructura espacial que permite eventos de señalización entre receptores para factores de crecimiento y moléculas de adhesión como las integrinas (Soo-Hyun Kim, 2009). Es decir, las moléculas presentes en la MEC van a transmitir sus señales hasta las células circundantes a través de las integrinas. Estas integrinas van a actuar como mecanorreceptores, con la capacidad de traducir una señal mecánica y transmitirla desde la superficie celular a través de una vía molecular específica para convertirla en cambios bioquímicos intracelulares, el estímulo de multitud de otros receptores o la inducción de la expresión génica.

Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos estructuralmente compuestos de dieciocho subunidades α y ocho subunidades β que pueden ensamblarse de forma no covalente en 24 combinaciones (Soo-Hyun Kim, 2011). Las integrinas tienen una capacidad única para responder a la composición molecular y las propiedades físicas de la MEC e integran señales tanto mecánicas como químicas a través de la asociación directa con el citoesqueleto, lo que también determina la selección de las especies de integrinas específicas involucradas (figura 5).

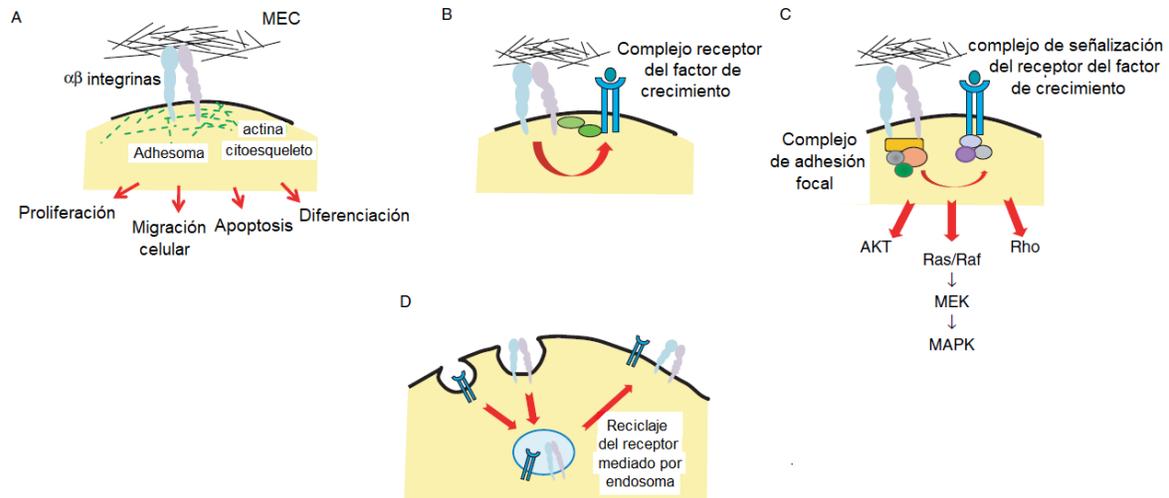


Figura 6. Mecanismos propuestos para la regulación de la señalización del factor de crecimiento por integrinas. (A) El repertorio de integrinas expresadas en una célula particular puede especificar la ruta de la señal debido a la afinidad de unión diferencial de los ligandos de MEC para las integrinas. La rigidez del tejido y la composición de la matriz pueden iniciar vías de señalización específicas que regulan el comportamiento celular. El agrupamiento y la activación de las integrinas/complejos de actina fortalecen la interacción de adhesión focal e inician el marco para la señalización celular a través del ensamblaje de adhesomas. (B) Las integrinas, a través de su dominio citoplásmico, reclutan adaptadores específicos para la membrana plasmática, que regulan la señalización del receptor del factor de crecimiento. Por ejemplo, la integrina b1c recluta a Gab1 / Shp2 y presenta Shp2 a IGF1R, lo que resulta en la defosforilación del receptor (Goel *et al.*, 2005). (C) En respuesta a la estimulación del factor de crecimiento, las integrinas se co-localizan en la adhesión focal con los receptores del factor de crecimiento y sus moléculas de señalización asociadas, como Src y FAK, así como con las moléculas del citoesqueleto como paxillin, talin y vinculina. Por ejemplo, la integrina a2b1 co-localiza con EGFR (Yu *et al.*, 2000), que eventualmente regula la actividad de los efectores posteriores como ERK, AKT, JNK y las GTPasas de Rho. (D) Las integrinas pueden cambiar la tasa de internalización y degradación del receptor del factor de crecimiento. Un ejemplo de ello es la interacción de la integrina EGFR1 y a5b1, que se recicla de manera coordinada a la membrana plasmática, regulando la señalización de la proteína quinasa B

(PKB) (Caswell *et al.*, 2009). La adhesión celular mediada por integrina también puede alterar la tasa de degradación de PDGFR a través de la ubiquitinación (Baron y Schwartz 2000).

Para comprender la diferenciación celular, la morfogénesis de los tejidos y la remodelación fisiológica es necesario comprender los componentes de la MEC producidos por las células, así como el ensamblaje de esas macromoléculas en una estructura tridimensional funcional. Las macromoléculas que constituyen la MEC han desarrollado propiedades químicas y estructurales que son particularmente adecuadas para sus funciones biológicas específicas en sus respectivos tejidos. Las subunidades modulares pequeñas forman homopolímeros y heteropolímeros que se convierten en ensamblajes supramoleculares con organizaciones altamente especializadas. Estos conjuntos contienen dominios de unión para los factores de crecimiento y las quimiocinas, establecen superficies de adhesión complejas y forman barreras de difusión entre diferentes capas celulares; por lo tanto, las moléculas de la MEC pueden funcionar como soporte para las células y como participantes activos en la señalización para controlar el comportamiento celular (Rowe y Weiss, 2008; Schaefer y Schaefer, 2010). En todos los casos, cada clase de molécula de MEC ha desarrollado la capacidad de interactuar con otra clase para producir propiedades físicas y de señalización únicas que apoyan la estructura, el crecimiento y la función del tejido (Mecham, 2012). Por tanto, sus componentes, la organización estructural y la biomecánica se torna un campo muy interesante para el diseño y fabricación de biomateriales, especialmente cuando se trata de la generación de implantes (Svenja, 2015).

1.5 Matriz extracelular en tejido neural

La matriz extracelular en el cerebro contiene componentes fibrosos tales como colágenas, fibronectinas y otras moléculas. Sin embargo, estas proteínas representan un pequeño porcentaje de la MEC del cerebro, en el cual predomina el ácido hialurónico, que se define como un glicosaminoglicano importante que se encuentra en la matriz extracelular de muchos tejidos blandos en animales superiores. En la figura 4 se muestra la estructura química del ácido hialurónico el

cual es un polisacárido natural lineal compuesto de unidades de disacáridos repetidos de ácido-D-glucurónico $\beta(1\rightarrow4)$ y N-acetil-D-glucosamina $\beta(1\rightarrow3)$. La completa biocompatibilidad del ácido hialurónico ha llevado a una extensa investigación sobre su uso en aplicaciones biomédicas, que incluyen oftalmología, administración de fármacos, dermatología, andamiaje de tejidos e implantes médicos (Huskisson y Donnelly, 1999).

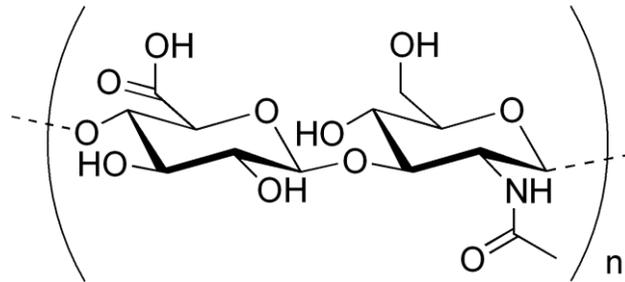


Figura 7. Composición del ácido hialurónico. Representación química de los elementos repetidos que conforman al ácido hialurónico, ácido-D-glucurónico $\beta(1\rightarrow4)$ y N-acetil-D-glucosamina $\beta(1\rightarrow3)$.

Al inicio del desarrollo, la MEC neural es producida y secretada tanto por las neuronas como por las células gliales (Ruoslahti, 1996). La composición y organización de la MEC neural es altamente dinámica a lo largo del desarrollo y varía en diferentes partes del cerebro adulto (Bandtlow y Zimmermann, 2000; Schwartz y Domowicz, 2004; Barros *et al.*, 2011). Se caracteriza por agregados de proteínas amorfas y es similar en organización al componente proteoglicano del cartílago. Tanto en el cerebro en desarrollo como en el adulto, el ácido hialurónico, que es un polisacárido lineal grande, funciona como una molécula de organización central alrededor de la cual se agregan los otros componentes de la MEC (Deepa *et al.*, 2006).

Las glicoproteínas pertenecientes a la familia tenascina tienen una estructura oligomérica que facilita este ensamblaje, y los proteoglicanos con dominios de unión al ácido hialurónico en sus extremos N y los dominios de unión a glicoproteína en sus extremos C conectan estas proteínas (Yamaguchi, 2000; Chiquet-Ehrismann y Tucker, 2011). En las matrices o en la lámina basal, los agregados de MEC neurales forman una red enrejada que varía en su composición y organización a lo largo del desarrollo. Dependiendo de la etapa de desarrollo, esta red puede estar compuesta

principalmente por neurocanos, versicanos y tenascina C, como se encuentra en las primeras semanas de vida, o brevicanos y agrecanos, como es el caso en el cerebro adulto (Howell y Gottschall, 2012; Frischknecht y Gundelfinger, 2012). Estos diferentes perfiles de proteoglicanos se corresponden con una red "suelta" que se compone de proteoglicanos más grandes en el desarrollo temprano, que se reemplaza y se refuerza con proteoglicanos más pequeños a medida que se desarrolla el cerebro. Estas redes sueltas proporcionan espacio para que el cerebro en desarrollo crezca y extienda la red neuronal; las redes estrechas en la vida posterior restringen el crecimiento y refuerzan las conexiones existentes (Lau, *et al.*, 2013) (Figura 8).

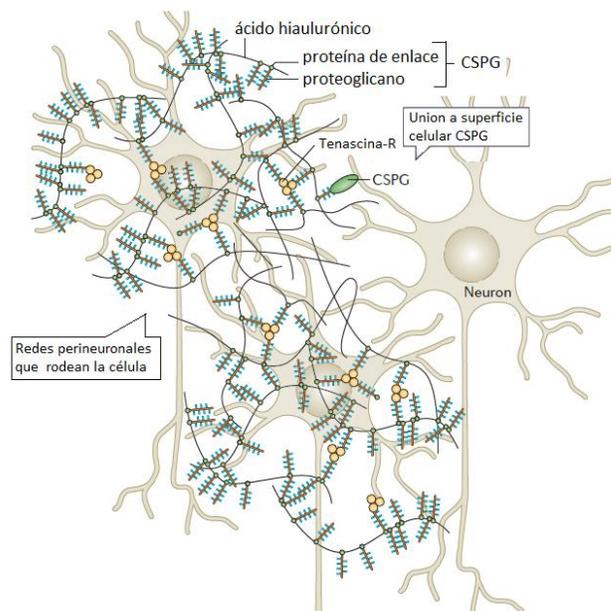


Figura 8. Redes perineuronales de la matriz extracelular del cerebro. Esquematización de la matriz extracelular de mamíferos, la cual está constituida por redes perineuronales formadas por ácido hialurónico. (Tomado y modificado de Lau *et al.*, 2013).

Hay muchas proteínas en varios tamaños presentes en la matriz extracelular y cada una de éstas tienen un impacto único en el comportamiento celular; por lo tanto, el uso de estas proteínas como biomateriales para aplicaciones de medicina regenerativa permite potencialmente la generación de andamios funcionales. La elección de la proteína o la combinación de diferentes proteínas depende de la aplicación de destino y el efecto deseado. Hay muchas opciones para adquirir estas moléculas. Una forma común de obtener proteínas nativas es aislarlas de tejidos

humanos o animales (Pacak, *et al.*, 2014); sin embargo, el método predominante para la producción biofarmacéutica es la secreción de proteínas recombinantes que utilizan células de ovario de hámster chino (Tharmalingam *et al.*, 2011). Además, las llamadas proteínas artificiales o de tipo MEC son de gran interés en la producción de andamios de biomateriales. Estas moléculas pueden generarse sintéticamente y son comparables a las proteínas de longitud completa (Yeo *et al.*, 2015).

1.6 Electrohilado

La sustitución artificial de tejidos dañados y enfermos se ha convertido en un eje central en el campo de investigación de la medicina regenerativa. En últimas décadas, se han logrado avances significativos en el desarrollo de muchos biomateriales generadores de tejidos, por ejemplo, se han producido nuevas composiciones bioactivas y se han diseñado nuevos procesos y metodologías. En este contexto, la reciente aparición de la nanotecnología ha enriquecido el campo de los biomateriales y la ingeniería de tejidos (Lavik y Langer, 2004).

En el centro de estos avances tecnológicos se encuentra el proceso de electrohilado, técnica que permite la generación de nanofibras, las cuales pueden estar constituidas ya sea de biopolímeros o polímeros sintéticos. En particular, muchos polímeros naturales -proteínas, polisacáridos y ácidos poli (α -hidroxilo)- y sintéticos, se han transformado en fibras con diámetros en el rango de decenas a cientos de nanómetros (Kim *et al.*, 2005). Este tipo de estructura nanofibrosa se considera una arquitectura prometedora en el sentido de que la matriz extracelular natural (MEC) presenta una estructura fibrosa con diámetros en la nanoescala, que es mucho más pequeña que la que se puede lograr con otros métodos de procesamiento convencionales (Wnek *et al.*, 2003).

La obtención de nanofibras por medio del proceso de electrohilado se fundamenta en el estiramiento coaxial de una solución viscoelástica. Las fibras obtenidas presentarán características únicas, entre las que se pueden enlistar las siguientes: un área más grande en relación con el volumen, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, interconexión entre los poros y un rendimiento mecánico superior al que

presenta el material en su estado natural. Estas características permiten que las nanofibras puedan ser empleadas en el campo de la ingeniería de tejidos y en diversas aplicaciones médicas (Ramakrishna, 2005).

El equipo de electrohilado está constituido básicamente por tres elementos que son necesarios para la formación de las nanofibras: una fuente de poder que suministre un alto voltaje, un capilar o aguja de diámetro pequeño y un colector. Básicamente, en el proceso se hace uso de un alto voltaje para crear un hilo de solución del polímero. Antes de alcanzar el tubo de recolección, el solvente se evapora mientras que el polímero se solidifica, y se recolecta como una red interconectada de pequeñas fibras (Deitzel *et al.*, 2001; Figura 9).

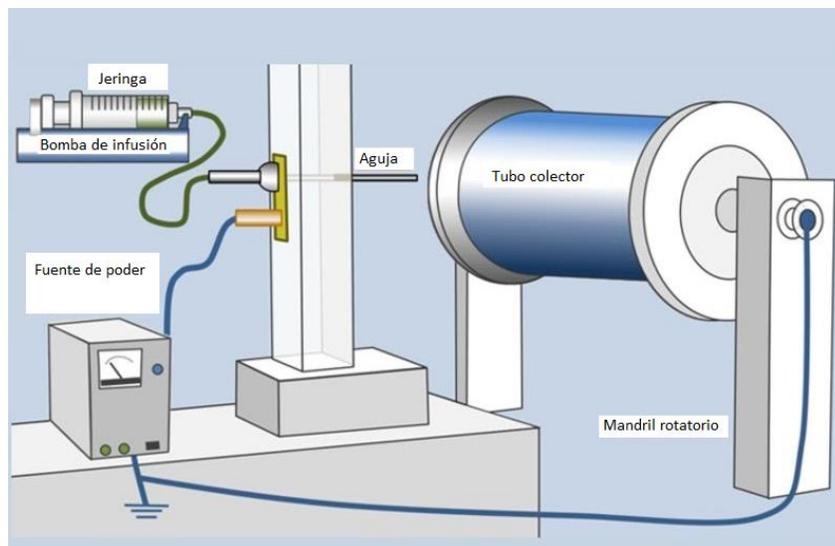


Figura 9. Componentes del equipo de electrohilado. La fabricación de las nanofibras es realizada a través de un equipo de electrohilado conformado por una jeringa, tubo colector, bomba de infusión y fuente de poder.

Un electrodo es conectado con la jeringa de donde es infundida la solución, mientras que, en la mayoría de los casos, el colector está simplemente conectado a tierra. El campo eléctrico está sujeto al extremo del tubo capilar que contiene el líquido de la solución retenido por su tensión superficial. Esto induce una carga en la superficie del líquido. La repulsión de carga mutua y la contracción de las cargas superficiales al contraelectrodo causan una fuerza directamente opuesta a la tensión superficial.

A medida que aumenta la intensidad del campo eléctrico, la superficie hemisférica del fluido en la punta del tubo capilar (aguja) se alarga para formar una forma cónica conocida como cono de Taylor. Aumentando aún más el campo eléctrico, se alcanza un valor crítico con el cual la fuerza electrostática repulsiva supera la tensión superficial y el chorro cargado de fluido se expulsa de la punta del cono de Taylor (Taylor, 1969; Figura 10).

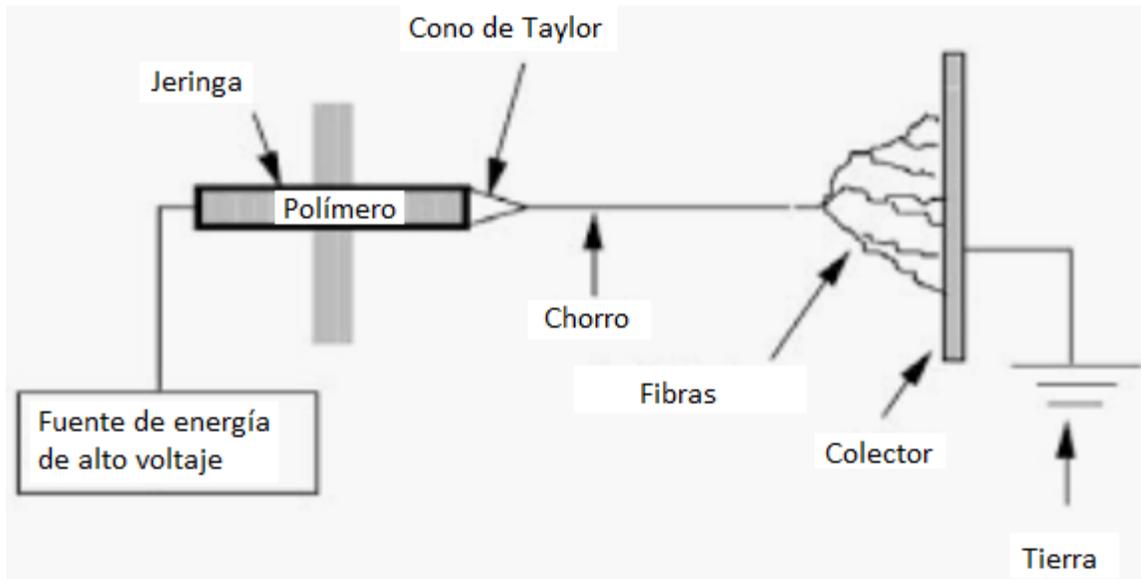


Figura 10. Esquema de la formación del cono de Taylor. La formación del cono de Taylor dependerá del voltaje necesario para romper con la tensión superficial del polímero en solución.

Se han realizado varias investigaciones en el campo de obtención de nanofibras bajo esta técnica, en donde destaca la exploración de diferentes materiales que puedan ser electrohilados y caracterizados, para encontrar nuevas aplicaciones para éstas.

En la Tabla 2 se incluye un resumen de algunos polímeros que se han electrohilado con éxito. También se incluyen en la tabla los solventes que se han utilizado, las concentraciones de polímeros en diferentes solventes y las aplicaciones propuestas o en perspectiva de las fibras correspondientes.

Tabla 2. Polímeros electrohilados en forma de solución.

| Polímero | Solvente | Concentración | Perspectiva de aplicación |
|--|--|-----------------------|--|
| Oxido de polietileno, PEO | Agua destilada: etanol (3:2) | 4% peso | Cableado microelectrónico, interconexiones |
| Colágena-PEO | Ácido clorhídrico | 1-2% peso | Curación de heridas, ingeniería de tejidos, agentes hemostáticos |
| Policaprolactona, PCL | Cloroformo: metanol (3:1) | | Andamios para ingeniería de tejidos |
| Ácido poliláctico, PLA | Diclorometano | 14% | Sistemas de liberación de drogas |
| Polímero similar a la seda con funcionalidad de fibronectina | Ácido fórmico | 0.8-16.2% peso | Dispositivo implantable |
| Mezcla de seda y PEO | Soluciones acuosas de seda | 4.8-8.8% peso | Biomaterial para andamios |
| Poli vinil fenol | Tetrahidrofurano | 20-60% (peso/volumen) | Agente antimicrobiano |
| PLGA | Tetrahidrofurano:dimetil formamida (1:1) | 1g/20 ml | Biomaterial para andamio |
| Colágena | Hexafluoro-2-propanol | | Biomaterial para andamio |

Muchos parámetros pueden influir en la transformación del polímero en nanofibras a través de esta técnica. Los parámetros del polímero en solución que deben tomarse en cuenta son: viscosidad, elasticidad, conductividad y tensión superficial; en cuanto a las variables de control se puede enlistar a la presión hidrostática en el tubo capilar, el potencial eléctrico en la punta del capilar y el espacio (distancia entre la punta y el tubo colector, y por último, también se deben considerar a los parámetros ambientales como la temperatura de la solución, la humedad y la velocidad del aire en el cámara de electrohilado (Doshi y Reneker, 1995).

2. JUSTIFICACIÓN

Cientos de millones de personas en todo el mundo sufren trastornos neurológicos. Aproximadamente 6,2 millones de personas mueren cada año por accidentes cerebrovasculares, y más del 80% de estas muertes se producen en países de ingresos bajos o medianos. El desarrollo de cultivos celulares basados en el uso de nano estructuras que promuevan y guíen el crecimiento axonal-neuronal, proveen una oportunidad para acceder a sistemas biológicos *in vitro* como modelo de enfermedades neurodegenerativas, o bien como un sistema de producción de sustitutos biológicos potencialmente con implicaciones en terapia celular.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Determinar el efecto del uso de nanofibras de biopolímeros como sustrato de cultivo durante el proceso de diferenciación neural de células troncales embrionarias de ratón.

3.2 Particulares

- Diseñar y caracterizar una matriz extracelular artificial que mimetice el nicho natural de las neuronas en el cerebro de mamíferos y permita el proceso de diferenciación neural.
- Construir andamios formados por nanofibras de ácido hialurónico/gelatina.
- Observar y evaluar el crecimiento axonal en los diferentes tipos de andamios.
- Realizar ensayos de inmunocitoquímica para identificar el linaje neural obtenido a partir de células troncales embrionarias de ratón.

4. HIPOTESIS

Es posible generar nanofibras compuestas de gelatina y ácido hialurónico, así como utilizarlas para la diferenciación neural a partir de células troncales embrionarias de ratón

5. ANTECEDENTES

Uno de los objetivos en el uso de las células troncales embrionarias es lograr diferenciarlas hacia un tipo celular específico, como, por ejemplo, la obtención de neuronas. En el año 2000, Lee y colaboradores presentaron un método para la obtención de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas; también se demostró que se podían obtener neuronas de manera eficiente e ilimitada a partir de las células troncales. En este trabajo, primero se generaron progenitores del sistema nervioso central para posteriormente ser expandidas y así promover la diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas, esto con la ayuda de mitógenos y moléculas de señalización específicas. La diferenciación y maduración de las células neuronales se completó después de la extracción del mitógeno del medio de crecimiento. Este sistema experimental proporcionó una herramienta muy útil para analizar los mecanismos moleculares que controlan las funciones de estas neuronas *in vitro* e *in vivo*, y potencialmente para entender y tratar enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas. El protocolo que se siguió para la obtención de este tipo celular consistió de varias etapas, en primer lugar se obtuvo la generación de cuerpos embrioides, posteriormente se propuso un medio definido (Insulina/Transferrina/Selenio/Fibronectina) para seleccionar las células troncales del sistema nervioso central, de forma consecutiva se añadió el mitógeno (bFGF, factor de crecimiento fibroblástico básico), y por último la diferenciación de las células troncales mediante la eliminación de dicho mitógeno.

Para determinar que efectivamente se habían obtenido un linaje neural se realizó una inmunocitoquímica para identificar a las proteínas Tuj1, tirosina hidroxilasa, GABA y serotonina (Figura 11). También se realizó la extracción de RNA para un análisis de RT-PCR con el fin de determinar la expresión de genes PAX 2, PAX 5 y Gli 1, los cuales están relacionados con estirpes de origen neural.

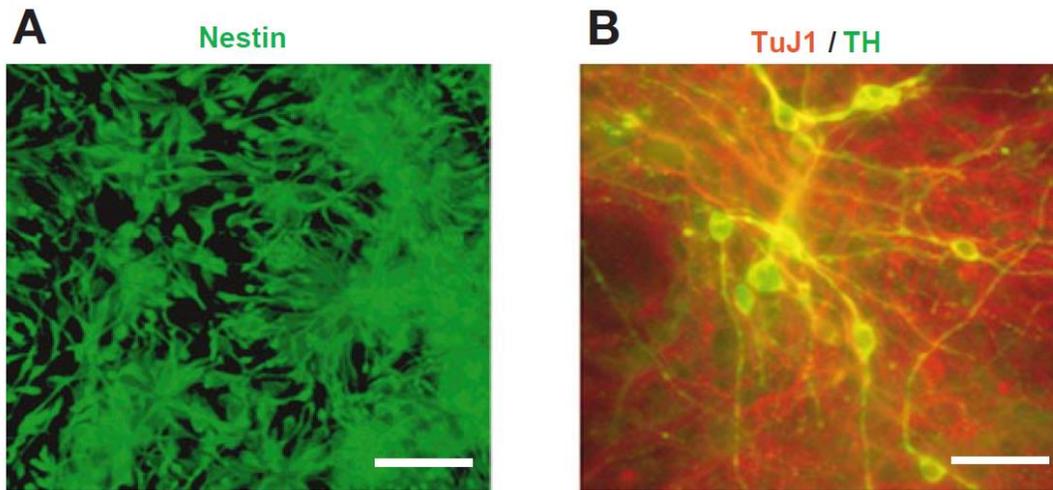


Figura 11. Inmunocitoquímica de neuronas obtenidas a partir de células troncales. En A se muestra el cultivo después de la expansión y suplementado con bFGF; la imagen B es posterior a la remoción de bFGF. (Escala de la barra= 20 μ m). (Lee, *et al.*, 2000)

Posteriormente en 2004, Bibbel y colaboradores crearon un método para la obtención de una población homogénea de precursores neurales siendo positivos para Pax6, un marcador para células gliales radiales. Estas células obtenidas se convirtieron rápidamente en neuronas con las características bioquímicas y funcionales que se esperan para un linaje descrito en la corteza cerebral. El procedimiento que siguieron fue cultivar las células troncales en monocapa, para posteriormente ser transferidas a una placa de cultivo bacteriana no adherente, con el objetivo de obtener cuerpos embrioides en suspensión, después de 4 días posterior a la formación de los cuerpos embrioides, el medio fue suplementado con ácido retinoico por 4 días más. Terminado este lapso los cuerpos embrioides se disocian y se colocan en placas de poliornitina o poli-D-lisina/laminina en medio N2. El medio N2 se cambia después de 2 h. En esta etapa, la mayoría de las células precursoras tienen una morfología de forma de huso y por último el medio de diferenciación neuronal (modificando algunos elementos de lo descrito en 1989 por Brewer y Cotman) se añade después de 48 h. La presencia de este tipo celular se determinó a través de una prueba de inmunocitoquímica contra β III-tubulina (figura 12).

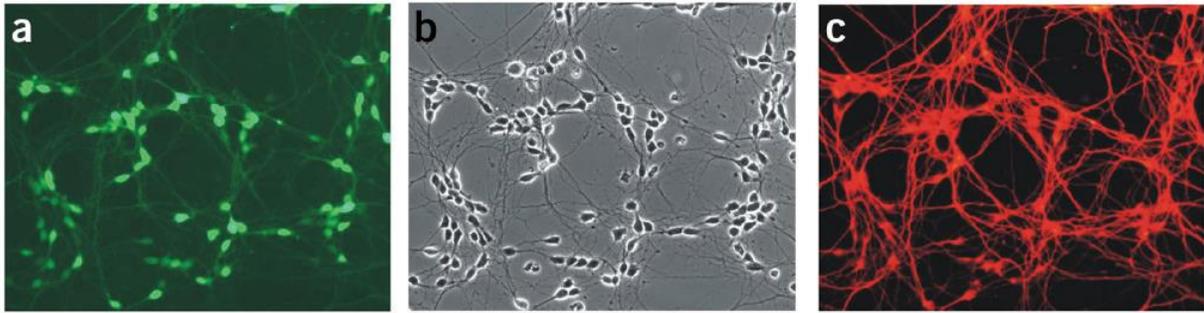


Figura 12. Diferenciación neural. Después de 4 días de cultivo. a) La expresión de GFP es impulsada por el promotor de *Mapt* endógeno, lo que permite la visualización de las neuronas y sus procesos bajo luz UV. (b) Imagen de contraste de fase correspondiente a la imagen a. (c) β III-tubulina clase III (mismo campo que a y b). La mayoría de las células que se muestran son neuronas (Bibel *et al.*, 2004).

En este estudio también se tiñeron las células con Sinaptofisina, una proteína que integra a las vesículas presinápticas, esto con el fin de determinar si existían un contacto sináptico entre las células de linaje neural obtenidas; con el fin de apoyar aún más esta idea se probó si estas neuronas usan glutamato como neurotransmisor, por lo cual se tiñeron las células con un anticuerpo contra el transportador vesicular de glutamato, vGlut1, una proteína de membrana expresada por la mayoría de las neuronas piramidales en la corteza cerebral y en el hipocampo (Figura 13).

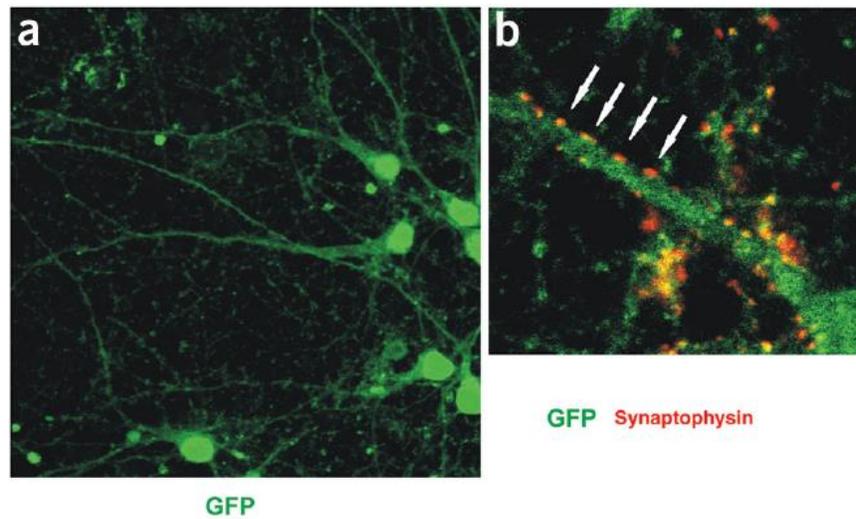


Figura 13. Morfología de las neuronas positivas a GFP y sinaptofisina. (a, b) es posible observar la forma piramidal de los cuerpos celulares neuronales (a) y numerosos grupos de sinaptofisinas (flechas) inmediatamente adyacentes a los procesos positivos para GFP (b) (Bibel, *et al.*, 2000).

En 2008, Wichterle y Peljto propusieron un método para la obtención de neuronas motoras a partir de células troncales embrionarias de ratón, las cuales se agregaron para la formación de cuerpos embrioides, después de dos días los factores de crecimiento (presentes en el medio ADFNK) adicionados son retirados, lo cual permite que los cuerpos embriones respondan fácilmente al efecto del ácido retinoico y de la proteína Sonic hedgehog, lo que permitirá la diferenciación a células nerviosas motoras. El progreso en la diferenciación de las células troncales se monitoreó mediante análisis inmunocitoquímicos de marcadores de linaje restringido (Figura 14).

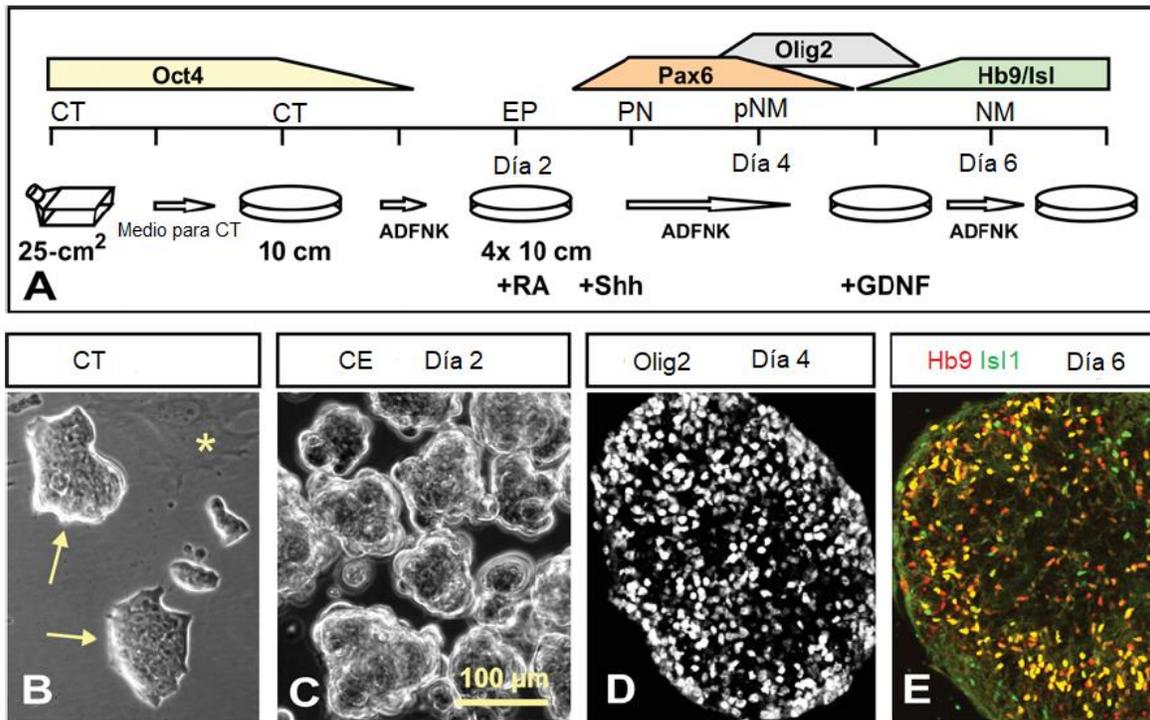


Figura 14. Proceso de diferenciación neural en células troncales embrionarias de ratón. (A) Línea de tiempo de diferenciación de células troncales embrionarias. El perfil temporal de la expresión de los marcadores de desarrollo (Oct4, Pax6, Olig2 y Hb9/Is1) se muestra sobre el eje. El esquema del protocolo de diferenciación está por debajo del eje. (B) Forma típica de las colonias de células troncales embrionarias (flechas) antes de la tripsinización. El asterisco muestra a los fibroblastos. (C) Cuerpos embrioides a los 2 días de diferenciación. (D, E) Expresión del marcador de neuronas motoras, Olig2 (D) Marcadores de una neurona motora posmitótica Hb9 e Isl1 (E) Secciones inmunocontenidas de cuerpos embrioides. Abreviaturas: CT, células troncales embrionarias; EP, ectodermo primitivo; PN, placa neural; pNM, neurona motora progenitora; NM, neurona motora; AR, ácido retinoico; Shh, proteína Sonic Hedgehog; GDNF, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; CE's, cuerpos embrioides (tomado y modificado de Wichterle y Peljto, 2008).

Debido a la propuesta de utilizar nanofibras conformadas por una mezcla de proteínas como MEC para el soporte durante el proceso de diferenciación de células troncales embrionarias de ratón, es importante mencionar los trabajos realizados en el campo del electrohilado y en especial utilizando el ácido hialurónico. En 2004, Um y cols., realizaron experimentos con el fin de electrohilar este polímero usando como solvente al etanol, con el fin de obtener nanofibras. Como es bien sabido esta técnica depende mucho de la variación en los distintos elementos que la conforman;

en dicho trabajo se usaron dos distintos pesos moleculares del ácido hialurónico uno alto ($M_w=3\ 500\ 000$) y uno bajo ($M_w=45\ 000$), así como el porcentaje de concentración en la solución. El mayor problema con este polímero es la viscosidad, por lo cual se usaron varias concentraciones del ácido hialurónico. De tal forma se obtuvo un rango de concentración óptimo igual a 1.3-1.5 % p/v. Además, se controló la temperatura ambiente del sistema cerrado, siendo a 57 °C la mejor opción para realizar el electrohilado. En la figura 15, se muestran las nanofibras a través de microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

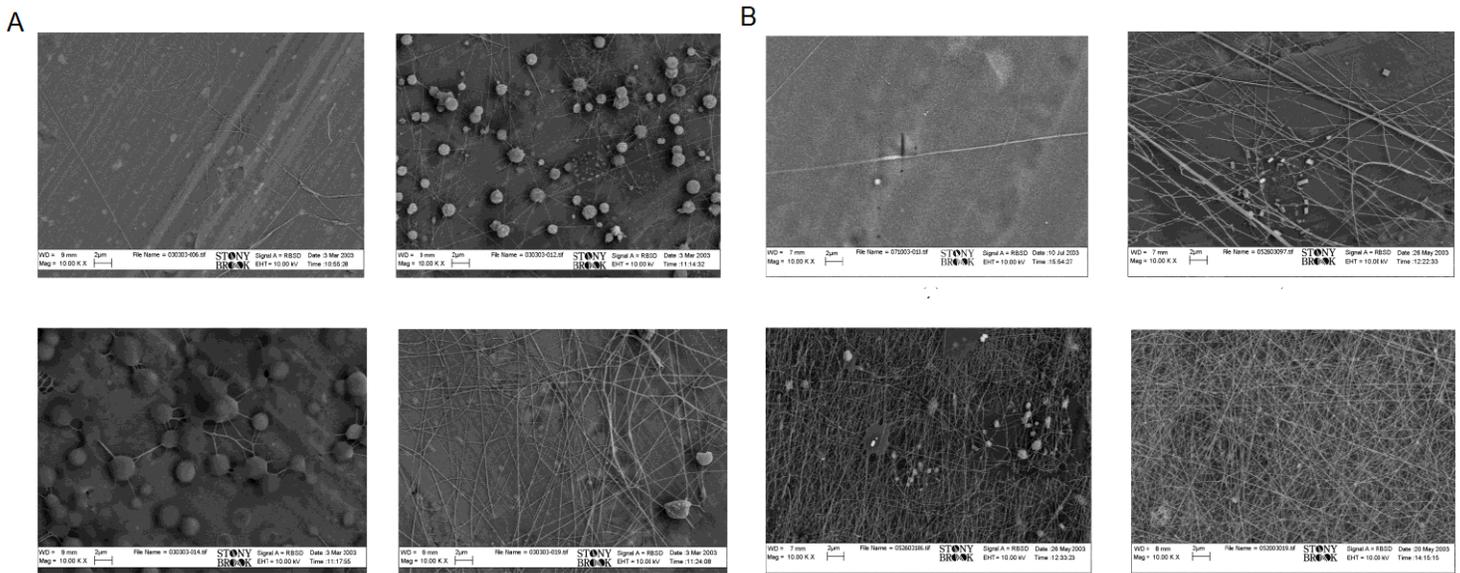


Figura 15. Nanofibras de ácido hialurónico obtenidas a partir de electrohilado. En la columna A se probaron diferentes porcentajes de concentración, siendo al 2% p/v, donde se obtuvieron mejores resultados. En la columna B se usó una concentración al 2% y se varió la temperatura del aire usado para infundir el polímero, donde a los 57 °C se obtuvo una mayor producción de nanofibras (Um *et al.*, 2004).

Son pocos los reportes de nanofibras con ácido hialurónico (AH) debido a la complejidad del sistema viscoso que se obtiene al disolver al ácido hialurónico y/o sus posibles combinaciones. Algunos reportes se enfocan exclusivamente a determinar las condiciones óptimas para generar las nanofibras de AH, incluso sin valorar su posible uso para el cultivo celular. Por tanto, el mayor aporte de este

trabajo citado fue el proporcionar los parámetros posibles para la obtención de nanofibras de este polímero, así como su caracterización (diámetro de las fibras, porosidad y composición), ayudándose de la microscopia electrónica de barrido.

En 2006, el grupo de Ji, lograron generar nanofibras de ácido hialurónico modificado, es decir se sintetizó una molécula derivada de este polímero, al cual le fueron añadidos grupos tiol, aunado a esto, este nuevo compuesto fue mezclado con óxido de polietileno (PEO), con el fin de modificar la viscosidad y tener la posibilidad de electrohilar. Al igual que en otros estudios de electrohilado, se probaron varias concentraciones y proporciones del polímero con el PEO, en la figura 16, se muestran los resultados obtenidos variando dichas concentraciones.

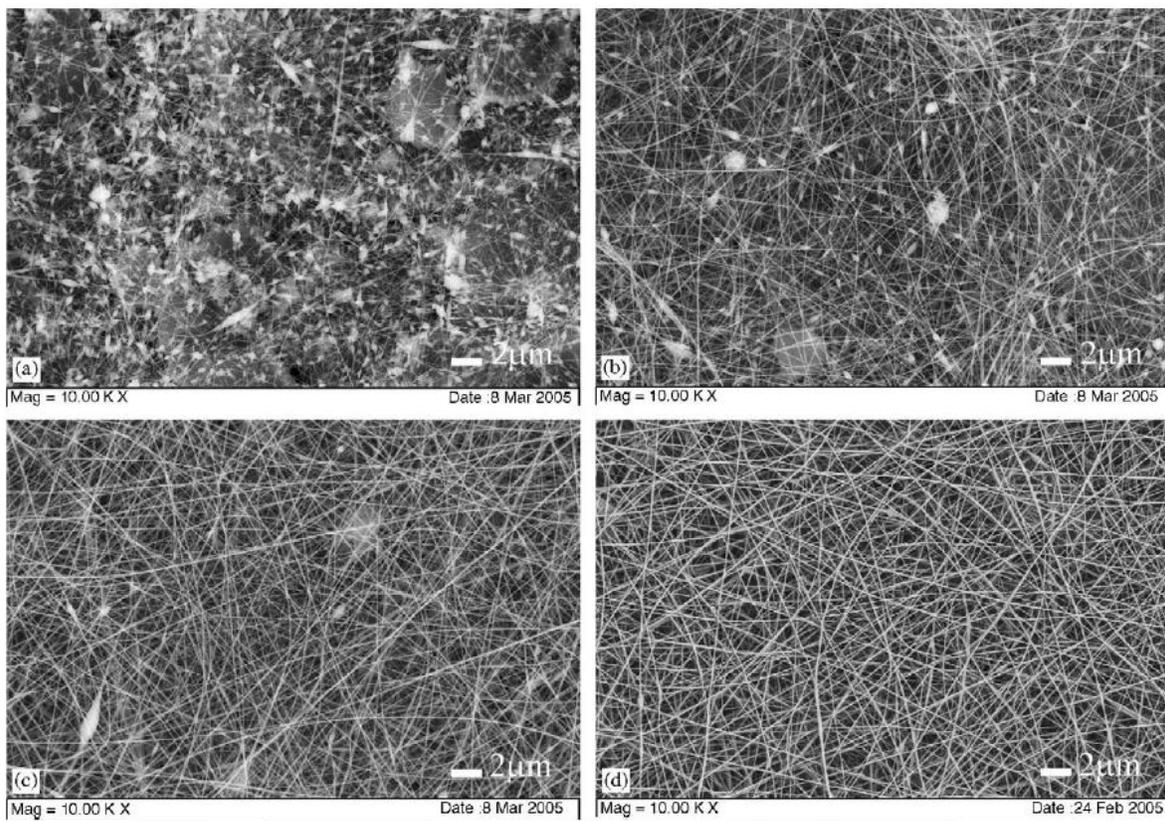


Figura 16. Nanofibras obtenidas a partir de la variación de la proporción de sus polímeros.

Imágenes obtenidas a través de microscopia electrónica de barrido, a diferentes proporciones y concentraciones de la mezcla del ácido hialurónico modificado y el PEO. (a) HA 2.0% (p/v): PEO 0.5% (p/v) (4:1); (b) HA 2.0% (p/v): PEO 1.0% (p/v) (2:1); (c) HA 2.0% (p/v): PEO 1.5% (p/v) (4:3); and (d) HA 2.0% (p/v): PEO 2.0% (p/v) (1:1). Tamaño de la escala: 2 μm. (Ji *et al.* 2006).

Este estudio se complementó con una prueba de adhesión celular, en este caso se usó una línea celular de fibroblastos (3T3), así, se diseñó un experimento en donde el control se basó en un cubreobjetos de vidrio, pretratado con fibronectina, en tanto que el modelo experimental fue un cubreobjetos de vidrio con las nanofibras del ácido hialurónico modificado, en la Figura 16, se puede observar que evidentemente si hubo una adhesión celular por parte de los fibroblastos en el andamio de nanofibras, así como en el control.

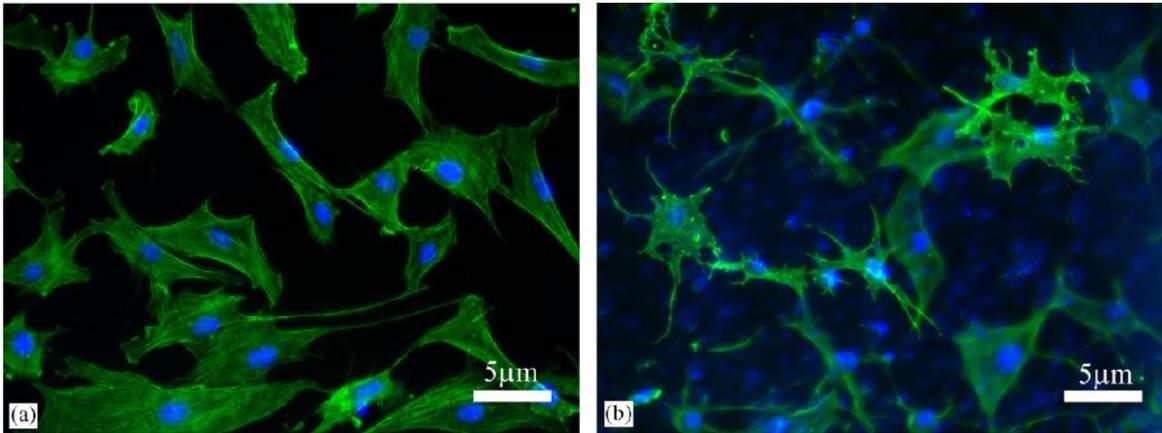


Figura 17. Fibroblastos obtenidos a partir de células troncales. Imágenes donde se muestran los fibroblastos adheridos, en (a) cubreobjetos de vidrio con fibronectina y (b) nanofibras de ácido hialurónico (Ji *et al.*2006).

Los avances mostrados en estos trabajos dieron lugar a diseñar experimentos donde se fabricarán andamios capaces de sostener y favorecer la diferenciación neural de las células troncales embrionarias. Por ello en 2009, Xie y colaboradores realizaron andamios constituidos de nanofibras de policaprolactona fabricados por electrohilado, y en los cuales fueron cultivados células para su futura diferenciación neural. En este trabajo, primero se promovió la formación de cuerpos embrioides para después ser sometidas a una dosis de ácido retinoico para inducir la formación de progenitores neurales. El cultivo se detuvo a los 14 días y las células obtenidas se analizaron por una prueba de inmunocitoquímica para revelar si efectivamente se había obtenido un linaje neural; los marcadores elegidos fueron Tuj1 (neuronas), O4(oligodendrocitos) y GFAP (astrocitos). En la Figura 18 se puede observar que si hubo una expresión de los marcadores usados lo que confirma que es posible la diferenciación en este tipo de andamios.

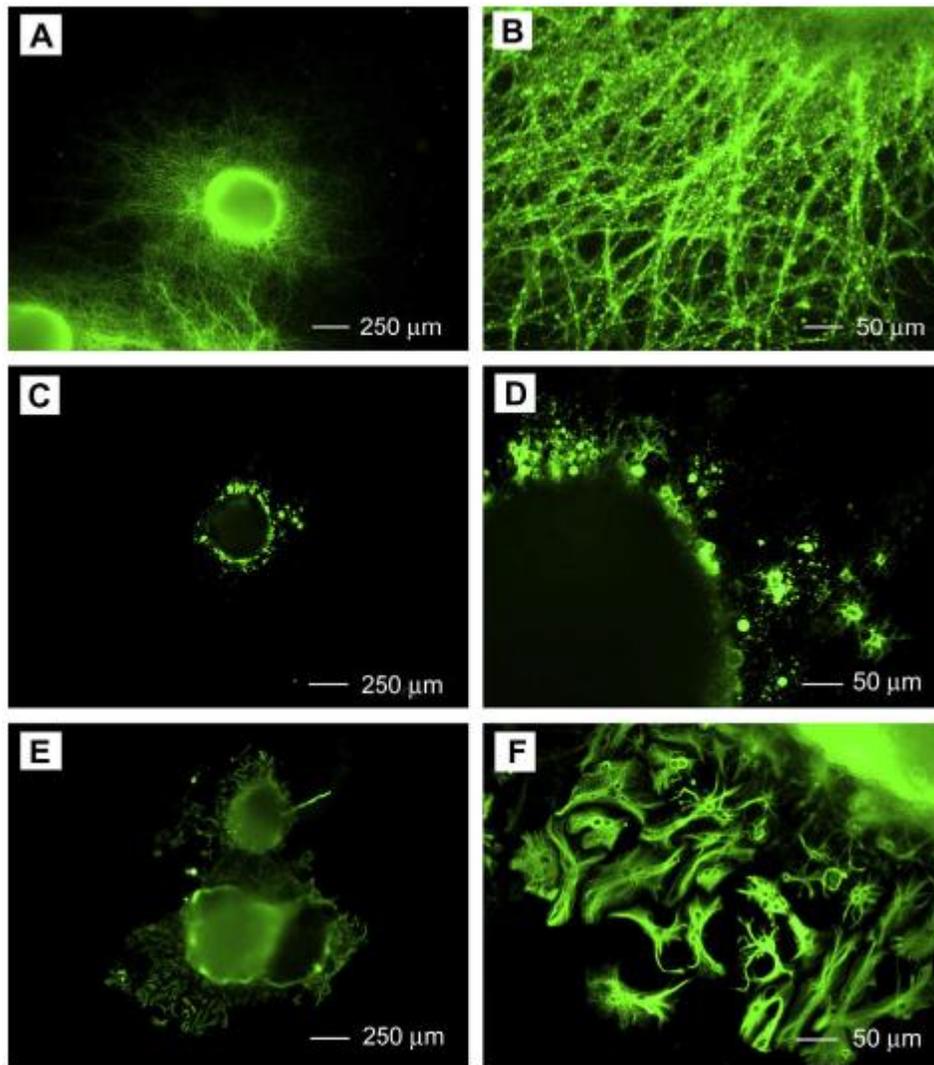


Figura 18. Cuerpos embrioides cultivados en nanofibras de policaprolactona. Inmunohistoquímica aplicada a los cuerpos embrioides después de 14 días de cultivo en nanofibras de PCL para los siguientes marcadores: (A, B) Tuj1, (C, D) O4 y (E, F) GFAP (Xie *et al.*, 2009).

En 2010, Lim y *co/s.*, realizaron también una diferenciación neural en nanofibras (480 nm) de policaprolactona (PCL), obtenidas por la misma técnica mencionada anteriormente; este trabajo es muy parecido anterior, ya que usaron el mismo marcador Tuj 1 para identificar a las posibles neuronas que pudieran ser obtenidas después de la diferenciación. En este trabajo no fue necesaria la formación de cuerpos embrioides para después ser sometidos a la diferenciación neural; para este proceso las células fueron cultivadas en un principio en un medio constituido por DMEM/F12/N2 adicionado con FGF-2; posterior a 24 horas, el cultivo fue enriquecido con ácido retinoico para optimizar la diferenciación neural. En la Figura 19 se pueden observar las imágenes obtenidas después de la inmunocitoquímica.

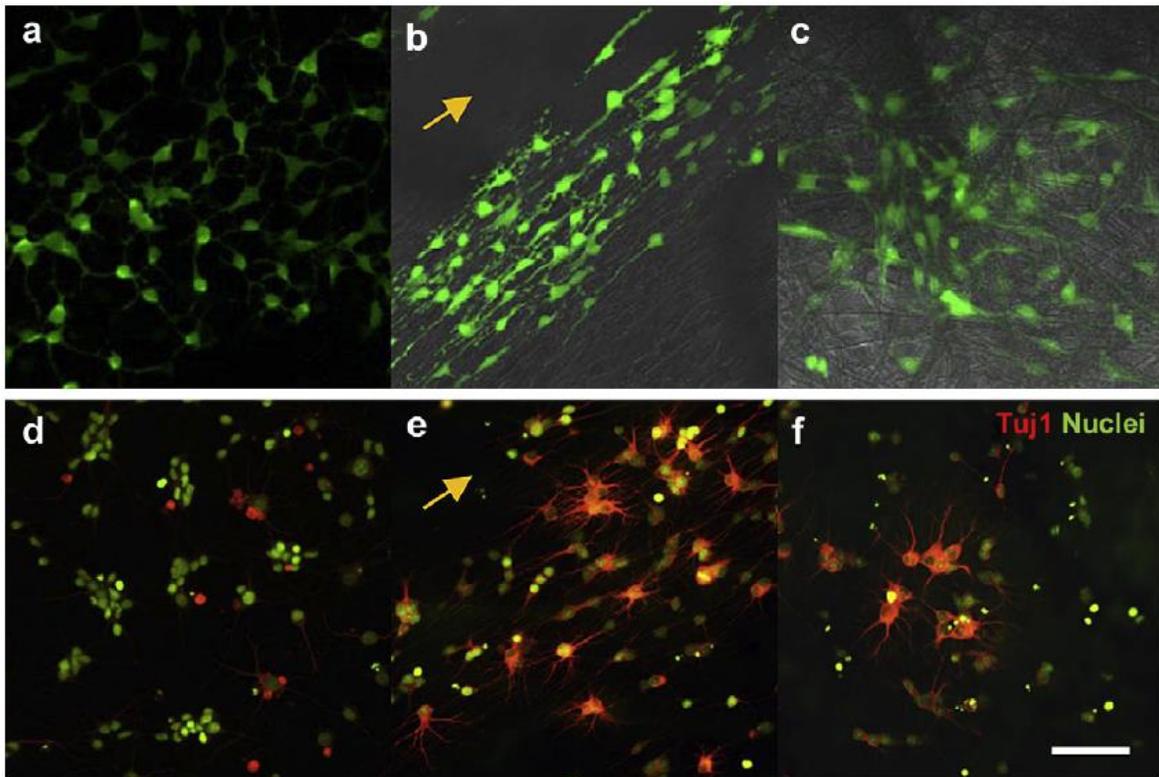


Figura 19. Diferenciación neural sobre nanofibras de PCL. Inmunocitoquímica de las células diferenciadas en el andamio formado por nanofibras de PCL; en (a) se observan a las células cultivadas sin nanofibras, en (b) a las células cultivadas en nanofibras alineadas y en (c) el cultivo en nanofibras no alineadas. En d-f se muestran la diferenciación celular después de 5 días. Los núcleos fueron teñidos en verde, en tanto que Tuj 1 se aprecia en color rojo. La flecha indica la dirección de alineación de la nanofibra. Valor de la escala es 50 μm (Lim *et al.*, 2010).

En 2012 Kabiri y colaboradores fabricaron andamios constituidos de ácido poliláctico (PLLA); en este trabajo también se hizo uso de la formación de cuerpos embrioides para después ser cultivados en los andamios. En este trabajo el medio de cultivo también fue enriquecido con ácido retinoico para inducir a las células a diferenciarse a neuronas. De la misma manera se hizo una prueba de inmunocitoquímica usando el marcador β III-tubulina para identificar células de linaje neural. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos en el estudio.

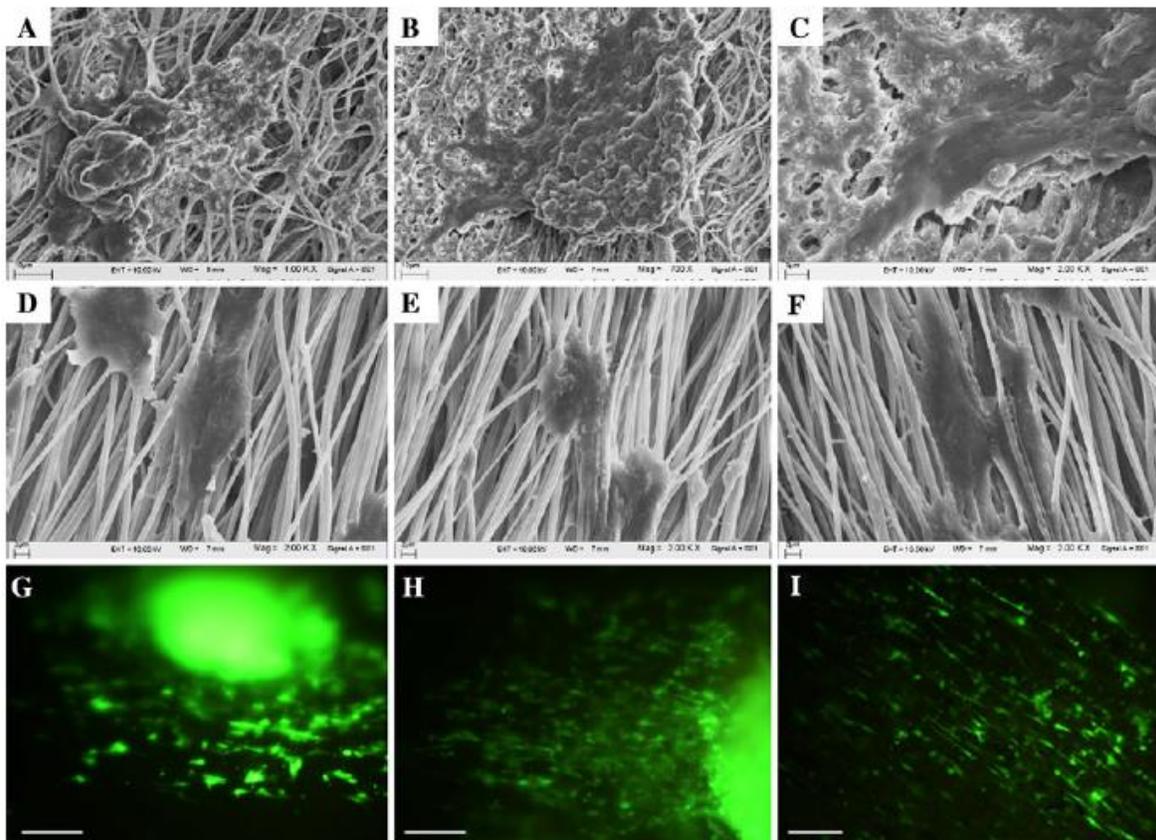


Figura 20. Diferenciación neural sobre nanofibras de PLLA. Células obtenidas de la diferenciación neural. En (A-F) se muestran imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido y donde se aprecia la adhesión celular de los cuerpos embrioides con las nanofibras, en (G-I). Escala de la barra, 100 μ m (Kabiri *et al.*, 2012).

En 2018, Silantjeva y su grupo de trabajo, demostraron que mediante el uso de nanofibras (diámetro igual a 212 ± 63 nm), de PCL modificadas con el péptido GYIGSR, podían acelerar el proceso de diferenciación neural, con respecto al método clásico de monocapa, usando como matriz extracelular a la laminina. En este trabajo también se utilizó a la β III-tubulina como marcador para identificar a las neuronas al finalizar la diferenciación celular (Figura 21).

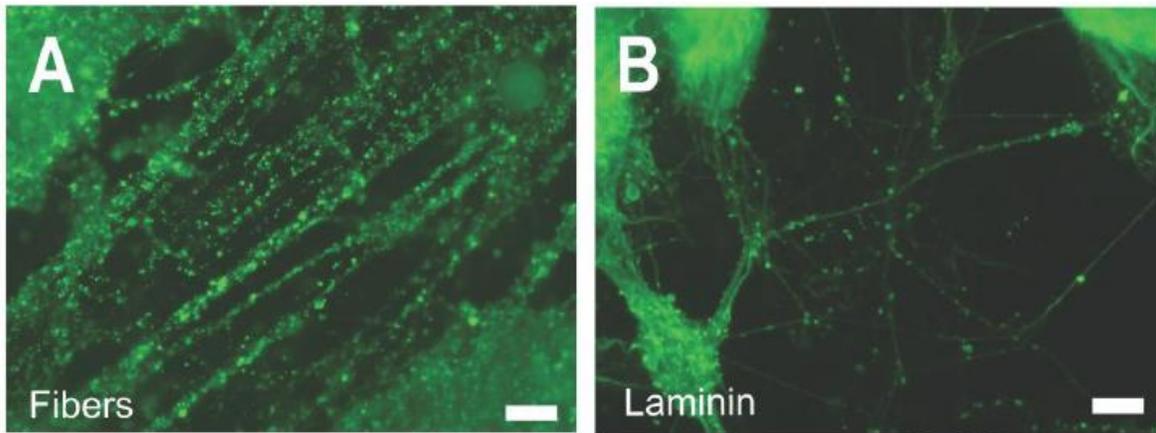


Figura 21. Diferenciación celular en monocapa y nanofibras. Inmunocitoquímica que muestra una mayor expresión de β III-tubulina en el andamio construido de nanofibras alineadas (A), comparada con las células cultivadas en una superficie pretratada con laminina (B) (Silantyeva *et al.*, 2018).

Los trabajos mencionados anteriormente representan los avances que se han generado a nivel mundial, en tanto que en México este campo ha sido poco o nulamente explorado. Sin embargo, existen algunos trabajos de tesis de licenciatura, maestría y doctorado que han aportado valiosos datos para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa en este país. En la mayoría de estos trabajos el polímero propuesto ha sido la policaprolactona (polímero sintético); sin embargo, en muchos de estos trabajos sólo se enfocan en la caracterización de las nanofibras obtenidas por electrohilado, sin realizar pruebas de adhesión celular. Hasta donde es de nuestro conocimiento, no existen reportes en los que se utilice AH para formar nanofibras y su uso durante la diferenciación de células troncales embrionarias hacia linaje neural, siendo el AH el principal componente de la matriz extracelular del cerebro en mamíferos. Por lo que este proyecto se basa en la construcción de andamios de polímeros naturales (gelatina y ácido hialurónico) y comprobar si son capaces de servir de andamio a las células troncales embrionarias de ratón, así como permitir la diferenciación neural.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo y mantenimiento de Células Troncales Embrionarias de Ratón (CTER) de la línea celular E14Tg2a

Las células troncales embrionarias de ratón derivadas del blastocito de ratón (*Mus musculus*) de la línea celular E14Tg2a del banco maestro del Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” fueron donadas por el “Grupo de Medicina Regenerativa y Bioprocesos de Células Troncales” (University College of London, R.U.). Las células fueron previamente adaptadas a expansión, libres de células alimentadoras, a través de selección de subclonas.

Para su cultivo y mantenimiento de su estado pluripotente se utilizaron frascos de cultivo T25 recubiertos con gelatina porcina al 0.1% empleando medio GMEM (Glasgow´s Minimal Essential Medium, por sus siglas en inglés; SIGMA, EUA) adicionado con Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés; Gibco, EUA) a una concentración del 9.2% (v/v), L-Glutamina mM (Gibco, Brasil)/piruvato sódico (Gibco/China) a una concentración del 1.9 % (v/v), aminoácidos no esenciales (Gibco, EUA) a una concentración del 0.9% (v/v), 2-β Mercaptoetanol (SIGMA, Japón) 0.1 M a una concentración del 0.009% y 1×10^6 unidades/ml de Factor Inhibidor de Leucemia de ratón recombinante, liofilizado (LIF, por sus siglas en inglés; Gibco, EUA). Adicionalmente se utilizó GMEM no completo para la inactivación de la tripsina durante el subcultivo de las CTER, este medio contiene los mismos elementos y concentraciones que el medio GMEM-completo, excepto que no contiene LIF.

6.2 Cultivo y subcultivo celular de las células troncales de ratón

Para iniciar con el cultivo celular se descongelo un criovial de CTER E14Tg2a con el siguiente procedimiento: Se trató 1 pozo de una caja de cultivo celular de 9.8 cm² con gelatina porcina (SIGMA, EUA) 0.1% (p/v), durante 20 minutos, para la generación de una matriz extracelular que permita a las células adherirse a la base del pozo. Tras transcurrir los 20 minutos se retiró el contenido en exceso de gelatina y se desechó. El medio utilizado en la criopreservación contiene Dimetil-Sulfóxido (DMSO por sus siglas en inglés; SIGMA, EUA), el cual es tóxico a temperatura ambiente, se estimó un tiempo máximo en la descongelación del criovial de 2 minutos en baño María a 37 °C. El contenido del criovial se aspiró y trasladó a un tubo para centrifuga de 15 ml con 3 ml de medio GMEM completo y se centrifugó durante 5 minutos a 1400 rpm. Se retiró el sobrenadante evitando romper el pellet, el cual fue resuspendido en 3 ml de medio GMEM completo, teniendo en cuenta que las células se hallan en un periodo de estrés, la resuspensión debe de ser lenta para evitar una disminución en la viabilidad celular. La resuspensión se traspasó al pozo de la caja de cultivo previamente tratado con gelatina porcina.

Las células se mantuvieron en una incubadora (Sanyo-Panasonic modelo MCO – 19AICUV – PA) con ambiente controlado con temperatura de 37°C, con una concentración de dióxido de carbono (CO₂) al 5% y control de humedad relativa.

El cultivo se observó en el microscopio invertido a las 6 horas, para verificar la adhesión a la base del pozo, a las 24 horas se examinó la viabilidad celular y la formación de colonias. A las 48 horas el cultivo ha alcanzado la fase exponencial de crecimiento, por lo cual deberá presentar una confluencia entre el 70 y 80%, con la que es posible la realización del pasaje o subcultivo celular.

6.3 Mantenimiento de células troncales embrionarias de ratón

El pasaje celular se realizó cada 48 horas. Se retiró el medio deteriorado y se desechó, se realizó un lavado a la base del pozo con DPBS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco, EUA) posteriormente se agregó solución de Tripsina 1X [1% de suero de pollo (Gibco, Nueva Zelanda), 1% de tripsina 2.5% (Gibco, EUA) y 0.036% de ácido etildiaminotetraacético (EDTA por sus siglas en inglés; Gibco, EUA) en DPBS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$], incubado durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente la tripsina fue inactivada con medio GMEM no completo.

La mezcla fue recuperada y se centrifugó a 1400 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante fue aspirado evitando romper el pellet, el cual posteriormente fue resuspendido en medio GMEM completo y se inoculó en un frasco de cultivo T25 pretratado con gelatina porcina al 0.1% (p/v), durante 20 minutos, posterior a los 20 minutos la gelatina fue retirada y se desechada. El cultivo y mantenimiento de las células troncales embrionarias de ratón, se realizó con base en el protocolo de Mondragón y colaboradores en el 2011. Los pasajes posteriores fueron realizados en frascos de cultivo T25. La estabilización de un cultivo recién despertado puede tomar de 1 a 2 semanas.

6.4 Evaluación del estado pluripotente de las CTER a través de la técnica de inmunocitoquímica

Para esta prueba se usaron tres pozos de 9.6 cm² cultivados con células troncales embrionarias de ratón de la línea e14Tg2a, las cuales se encontraban en la fase exponencial de crecimiento. El medio fue retirado y desechado, posteriormente se realizaron dos lavados con DPBS al 1X $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ con el fin de eliminar cualquier residuo del GMEM. Para la fijación de estas células se usó paraformaldehído al 4% (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se realizaron tres lavados, con duración de 4 minutos cada uno con PBS 1X; inmediato a estos lavados, se agregó 1 ml de solución de bloqueo -constituido por 0.05% de suero de cabra, 0.25% de Triton 100x, diluidos en PBS 1X- a cada uno de los pozos, con el objetivo de permeabilizar las membranas celulares, este tratamiento se dejó por 30

minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo se hicieron 3 lavados con PBS 1X (4 minutos entre cada lavado) para quitar cualquier residuo de la solución de bloqueo.

Posteriormente, a uno de los pozos se le agregaron 400 μ l de Anti-Oct 3/4 conjugado con AlexaFluor 488 (1:100); a otro pozo se le añadió 400 μ l del anticuerpo primario Anti-Nanog (1:200 Abcam, EUA), ambos pozos fueron incubados en oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, los pozos fueron lavados con PBS 1X para retirar el excedente de anticuerpos, cada lavado tuvo una duración de 4 minutos. Ya que el pozo tratado con el anticuerpo Nanog no poseía el fluorocromo se debió agregar el anticuerpo secundario, Goat TRITC Anti-mouse (1:200 Abcam, EUA), realizado esto, se incubo durante 60 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1X (4 minutos entre cada lavado) para eliminar el exceso del anticuerpo secundario. Para finalizar, a los tres pozos se les agrego 1ml de DAPI (Molecular Probes, EUA) a una concentración de 300 mM, se dejó incubar por 5 minutos para posteriormente realizar un lavado de 5 minutos con PBS 1X para retirar el exceso de DAPI en los pozos; el pozo que no fue tratado con ningún anticuerpo fue usado como control negativo.

Las células tratadas mediante esta técnica fueron observadas por medio de un microscopio OLYMPUS IX71, modificado para detectar fluorescencia, el objetivo utilizado fue a 10x; para la captura y análisis de las imágenes obtenidas se utilizó el software ImageProPlus Version 5.1 para Windows.

6.5 Cuantificación del área de células troncales embrionarias de ratón

Una vez obtenidas las microfotografías, se usó el software ImageJ 1.48v (NIH) para cuantificar el área (μm^2) de células positivas para los marcadores de pluripotencia Oct 3/4 y Nanog, seguido de la medición del área total (μm^2) de células positivas para DAPI. Con estas mediciones se calculó el porcentaje de área positiva para los marcadores ya mencionados, y considerando como un 100% al área cubierta con DAPI. Los resultados se muestran como promedio de dos diferentes fotografías para cada anticuerpo, evaluados en la fase exponencial de proliferación.

6.6 Cinética de proliferación de las células troncales embrionarias de ratón

El conteo celular se realizó con una cámara de Neubauer utilizando los 4 extremos con cuadros de 0.25 mm x 0.25 mm, con una tinción con Azul de Tripán (1:1), discerniendo entre las células vivas y muertas.

En la realización de la cinética se utilizaron 8 placas de cultivo de 9.5 cm². Cada pozo fue tratado previamente con gelatina al 0.1%. Las células troncales embrionarias de ratón tras alcanzar una confluencia aproximada del 70% fueron recolectadas del frasco de cultivo T25, y se realizó un conteo celular con cámara de Neubauer, inoculando 1x10⁴ células·cm⁻². Se realizó el conteo celular y la viabilidad celular cada 24 hasta las 192, con la renovación del medio cada 48 horas.

Con la información obtenida, se realizó la cuantificación de la Velocidad Específica de Crecimiento (μ), así como el Tiempo de Duplicación Celular (Td). Los valores fueron calculados, en la etapa de crecimiento exponencial, que comprende entre las 24 horas a las 96 horas de la cinética de proliferación de las células troncales embrionarias de ratón.

Los parámetros se calcularon de acuerdo con las ecuaciones siguientes:

Velocidad de Crecimiento Específico (μ)

$$\mu = \frac{[\ln(x_2) - \ln(x_1)]}{t_2 - t_1}$$

Dónde:

μ = Tasa de proliferación específica

ln= logaritmo natural

X₁=Biomasa producida en el primer lapso de tiempo

X₂= Biomasa producida en el segundo lapso de tiempo

t₁= Tiempo inicial

t_2 = Tiempo final

Tiempo de Duplicación Celular (Td)

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Dónde:

Td= tiempo de duplicación

ln= logaritmo natural

μ = tasa de proliferación específica

6.7 Optimización de la diferenciación neural de las CTER

El protocolo de diferenciación fue modificado del método reportado por Abranches y cols (2009). En el proceso de diferenciación se realizaron cultivos adherentes en monocapa, evaluando la optimización de la matriz extracelular: gelatina porcina al 0.1, matrigel 1.5%, o laminina 10mg/mL en pozos de cultivo de 9.5 cm², el tratamiento fue de 20 minutos. Para este modelo de diferenciación también se evaluó la optimización del medio de cultivo, para lo cual se utilizaron dos tipos de medio de cultivo de diferenciación neural Ndiff227 (Takara, Japón) y R-HBA (Cellartis, Suecia). Los pozos pretratados con gelatina, matrigel y laminina se les inoculó una concentración aproximada de 1×10^4 células*cm⁻². El cultivo fue incubado a 37 °C de temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂, con renovación de medio total cada 48 horas durante un periodo total de 192 horas. Al final del proceso todas las placas se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) para su posterior análisis por inmunocitoquímica

6.8 Evaluación de la diferenciación neural de las CTER a través de la técnica de inmunocitoquímica

Para determinar la presencia de neuronas se identificó la expresión de β III-tubulina. Posterior a 192 horas de cultivo, las células fueron fijadas en el pozo retirando el medio utilizado durante la diferenciación neuronal. Cada pozo fue lavado con PBS 1X para eliminar completamente el medio de cultivo, se fijaron por exposición directa con paraformaldehído al 4% (v/v) a temperatura ambiente por 20 minutos. Se realizaron tres lavados con PBS 1X con un intervalo de 5 minutos entre cada lavado. Se agregó 1 mL de solución permeabilizadora (0.25% Triton 100X diluidos en PBS 1X), durante un periodo de 25% a temperatura ambiente, y seguido de 3 lavados con PBS 1X. A continuación, fueron bloqueados los sitios inespecíficos con solución de bloqueo (0.1% de Tritón X100 y 0.5% de suero de cabra en PBS 1X) durante 20 minutos y realizando 3 lavados adicionales con PBS 1X. Se colocó el anticuerpo primario o Anti- β III tubulina [1:300 (Abcam, EUA)] durante 2 horas en un agitador orbital a 24 rpm, un pozo no será adicionado con un anticuerpo primario, que será utilizado como control negativo; para eliminar el exceso de anticuerpos se realizaron 3 lavados con PBS 1X con intervalos de 5 minutos entra cada uno de ellos. Debido a que el anticuerpo Anti- β III tubulina no se encuentra conjugado fue incorporado el anticuerpo secundario Goat Anti-rabbit conjugado con AlexaFluor 488 (Life Technologies, USA) se adicionó a los pozos incluyendo el control negativo durante 2 horas en un agitador orbital a 24 rpm, protegidos de la luz con papel aluminio seguido de 3 lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpos. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (300 mM), incubados en oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente. Los pozos se mantuvieron con PBS 1X para su conservación.

Las muestras se analizaron con el microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS IX71); con un aumento de 10x, se obtuvieron las micrografías con el software Image Pro Plus Versión 5.1 para Windows.

6.9 Electrohilado

La fabricación de nanofibras se llevó a cabo con un equipo de electrohilado, el cual consta de seis componentes: bomba de infusión (Modelo AO-74905-04 de COLE-PARMER), jeringa de 3ml, aguja 22g (0.7mm), generador de alto voltaje (SPELLMAN CZE 1000R), mandril giratorio (WEST 6100+) y varilla colectora, Figura 22. En la elaboración de las nanofibras se probaron diferentes variaciones en el voltaje, velocidad de infusión y distancia entre la aguja y el colector. Para la recolección de las nanofibras se adaptó un cubreobjetos de vidrio a la varilla colectora.



Figura 22. Equipo de electrohilado. El equipo con el que se cuenta en el “CMN 20 de Noviembre, ISSSTE” se le fue adaptada a la varilla colectora un cubreobjetos de vidrio, para la recolección de las nanofibras que serían usadas para el cultivo celular.

La solución de polímeros utilizada para el electrohilado consistió en: 10% de gelatina (p/v) disuelta en ácido acético glacial; en tanto que la concentración del ácido hialurónico fue al 2.5 % (p/v) usando como solvente agua con alcohol (9:1). Debido a que fue necesario optimizar las concentraciones y proporciones de gelatina y AH, fue necesario evaluar varias combinaciones de gelatina y ácido hialurónico: 1:1, 10:1, 15:1 y 20:1. Las fibras obtenidas se recubrieron por pulverización con oro antes de obtener imágenes con un microscopio electrónico de barrido (Facultad de Ciencias, UNAM, México) a un voltaje de aceleración de 15 kV.

La caracterización de las fibras se realizó a través del software ImageJ. Las muestras preparadas para su uso en cultivo celular se insertaron en una placa de cultivo de seis pozos, y se esterilizaron a través de un ciclo de luz UV, y se mantuvieron con GMEM previamente adicionado con anti/anti al 10x en incubación, hasta su uso.

6.10 Cultivo y diferenciación neural en andamios de gelatina/ácido hialurónico

En experimentos por triplicado se usaron tres pozos que contenían cubreobjetos cubiertos con nanofibras (los cubre objetos fueron adheridos al pozo por medio de 100 μ L de gelatina al 1%); para el proceso de diferenciación se usó el pasaje número 25 de la línea celular E14TG2a, cultivadas en una caja T25; el GMEM-completo fue retirado, y se lavó con 2 mL de DPBS, posteriormente se agregó 1 mL de tripsina por 5 minutos en incubación, se añadieron 2 mL de GMEM-no completo para recuperar las células en un tubo de 15 mL; enseguida fueron centrifugadas a 1400 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante fue retirado y el pellet fue resuspendido en 2 mL de NDIFF. Se tomaron 20 μ L de NDIFF con células para el conteo celular en la cámara de Neubauer. Para la inoculación fueron necesarias 3×10^4 cel·cm⁻² las cuales se encontraban en 17 μ L; esta cantidad se resuspendió en 9 mL de NDIFF (previamente adicionado con anti/anti 10x). Cada pozo fue recubierto con 3 mL de NDIFF con células. Se incubaron a 37 °C, y cambio total de medio cada 48 horas. El cultivo se mantuvo por 9 días.

Para el control positivo, en el cual no se usaron nanofibras, sino pozos de 9.6 cm² pretratados con gelatina (probada con éxito en la estandarización) el procedimiento usado fue exactamente el mismo al ya descrito anteriormente.

6.11 Evaluación de diferenciación neural de las CTER en los andamios de gelatina/ácido hialurónico.

Para la detección de las neuronas obtenidas en cultivo utilizando nanofibras de gelatina:AH, se realizó una prueba de inmunocitoquímica en los pozos control y en los andamios, como se describió en la sección 7.2. Se utilizó el anticuerpo anti- β III tubulina y Sinaptofisina para la identificación de linaje neural y de actividad sináptica, respectivamente. Las microfotografías fueron adquiridas con el microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS IX71).

6.12 Obtención de imágenes por microscopía electrónica de barrido.

Para la identificación de las CTER sometidas a diferenciación neural a nivel de ultraestructura se procedió a la fijación de al menos tres pozos de 9.6 cm² con paraformaldehído al 4%, posteriormente éstos fueron deshidratados con etanol, el cual se basó en colocar a las muestras a diferentes concentraciones de etanol, se empezó con una concentración al 10% por cinco minutos (todos los cambios duraron este tiempo), aumentando la concentración en 10% cada vez, así hasta llegar a una concentración del 90%, concentración en la que las muestras se mantuvieron hasta ser llevadas al laboratorio de microscopía electrónica de barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM; en este sitio las muestras fueron desecadas con el objetivo de retirar el etanol sobrante de las muestras, posterior a este tratamiento las células fueron recubiertas con oro para que finalmente se observaran en el equipo JEOL JSM-5310LV. Se adquirieron las microfotografías identificando la presencia de células para su posterior análisis.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del estado pluripotente de las CTER a través de inmunocitoquímica (ICQ)

Los resultados obtenidos después de la prueba de inmunocitoquímica (ICQ) mostraron una alta expresión de los marcadores Nanog y Oct $3/4$ en las células utilizadas para este trabajo. Las microfotografías presentadas en la Figura 23, muestran a las colonias de las células troncales embrionarias de ratón (e14Tg2a) cultivadas durante la fase exponencial de cultivo (48 horas). Derivado de un análisis del área cubierta con DAPI/OCT3/4 y DAPI/Nanog, se determinó con el uso de Image J que aproximadamente el $95 \pm 2\%$ de las células fueron positivas para los marcadores de pluripotencia antes descritos.

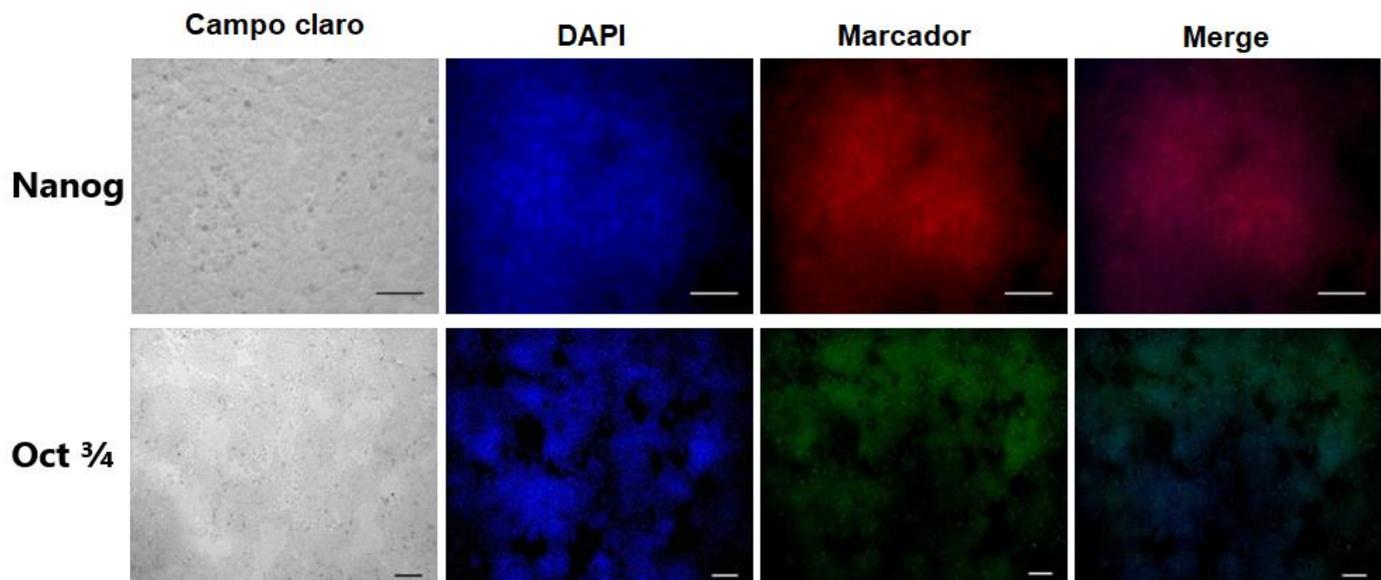


Figura 23. Inmunocitoquímica de las células troncales embrionarias de ratón (E14Tg2a). En la columna izquierda se muestran las imágenes tomadas en campo claro, donde se observan las colonias características de las células troncales embrionarias de ratón. En la siguiente columna se tiñeron los núcleos con DAPI. En la tercera columna se observan los marcadores de pluripotencia, NANOG en rojo y Oct $3/4$ en verde. En la última columna se observa el traslape de los marcadores con los núcleos.

7.2 Cinética de proliferación de las CTER de la línea celular E14Tg2a

La cinética de proliferación representada en la Figura 24, en donde las gráficas muestran al número de células por centímetro cuadrado y su viabilidad (%). Se detectó un incremento exponencial en las primeras 24 horas de cultivo, el cual se mantiene hasta las 96 horas. Después de estas 96 horas se puede observar una fase estacionaria con una duración aproximada de 24 horas; en el lapso que comprende las 120 horas hasta las 168 horas se puede apreciar la etapa de muerte celular. La viabilidad celular del cultivo fue alrededor del 85% durante el tiempo en que se realizó el experimento; la viabilidad de las células decreció de manera lenta tal como se observa en el gráfico.

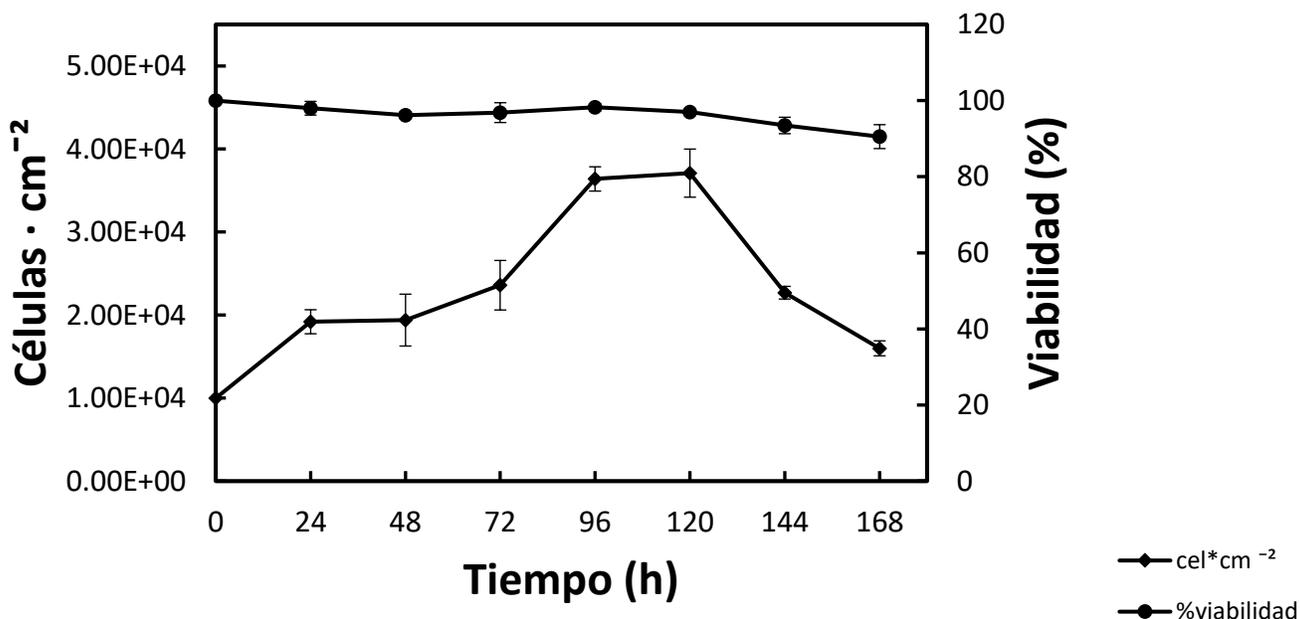


Figura 24. Cinética de proliferación de las células troncales embrionarias de ratón. La gráfica representa los datos obtenidos del comportamiento celular, en donde se reconoce una fase exponencial de crecimiento en las primeras 96 horas, y a partir de las 120 horas, las células entran en una fase de muerte; sin embargo la viabilidad celular se mantiene en el cultivo, es decir, aunque el número de células haya disminuido (probablemente por inhibición por contacto), en el número total de células que se mantienen en la caja de cultivo celular, aproximadamente el 95% están vivas.

Con estos datos obtenidos se calculó la tasa de proliferación específica para la fase exponencial, la cual corresponde de las 24 horas hasta las 96 horas; aplicando la ecuación de velocidad específica de crecimiento (μ), se obtuvo una μ de 0.02 h^{-1} con un tiempo de duplicación (T_d) de 34.66 horas para esta línea celular; incubadas a una temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a una concentración al 5% de CO_2 , sin realizar subcultivo, y con cambio de medio cada 48 horas.

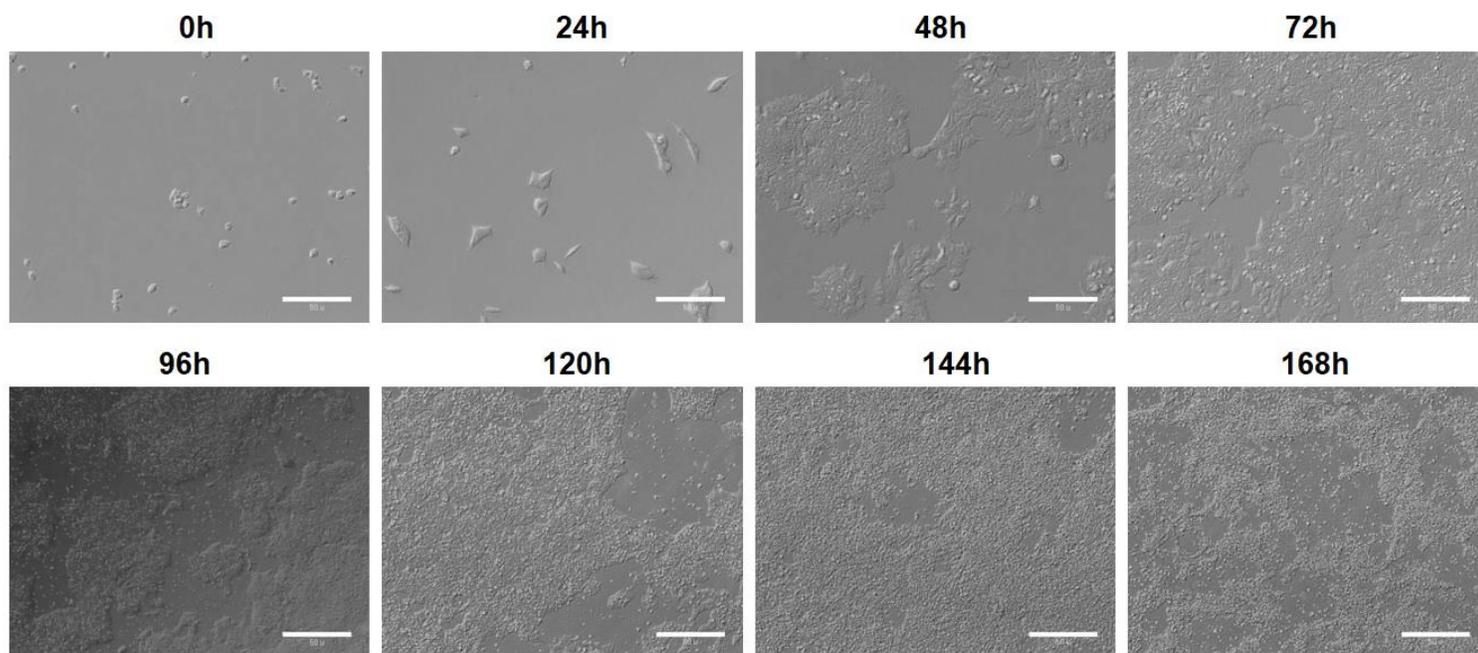


Figura 25. Microfotografías de células troncales embrionarias de ratón. Se obtuvieron fotografías a través del tiempo del cultivo en monocapa de las CTER, a partir de la inoculación y hasta las 48 horas se aprecia una expansión celular, y a partir de las 72 horas, las células comienzan a formar colonias; alcanzando una confluencia del 80% a las 120 horas. A partir de las 144 horas las células entran en una fase de muerte, por lo que las colonias reducen su tamaño. Tomadas con un aumento de 10x.

7.3 Optimización de la diferenciación neural usando dos medios de cultivo químicamente definidos, NDIFF y RHB-A

Para la optimización de la diferenciación neural se realizó la comparación de dos medios: NDIFF y RHB-A. Cada uno de estos medios fue probado en tres distintos tipos de matrices: laminina, gelatina y matrigel, se utilizó una densidad de inóculo de $3 \times 10^4 \text{ cél-cm}^{-2}$. El cultivo se mantuvo durante siete días y posteriormente se realizó la inmunocitoquímica para la detección de anti- β III tubulina para la

identificación de linaje neural. En la Figura 26 se muestra imágenes en campo claro de la evolución de la CTER hacia linaje neural usando NDIFF, y en donde es evidente que en los tres tipos de matriz se ve una adhesión y expansión celular. En la imagen también es apreciable la formación de proyecciones celulares, no observables en el estado pluripotente de las CTER.

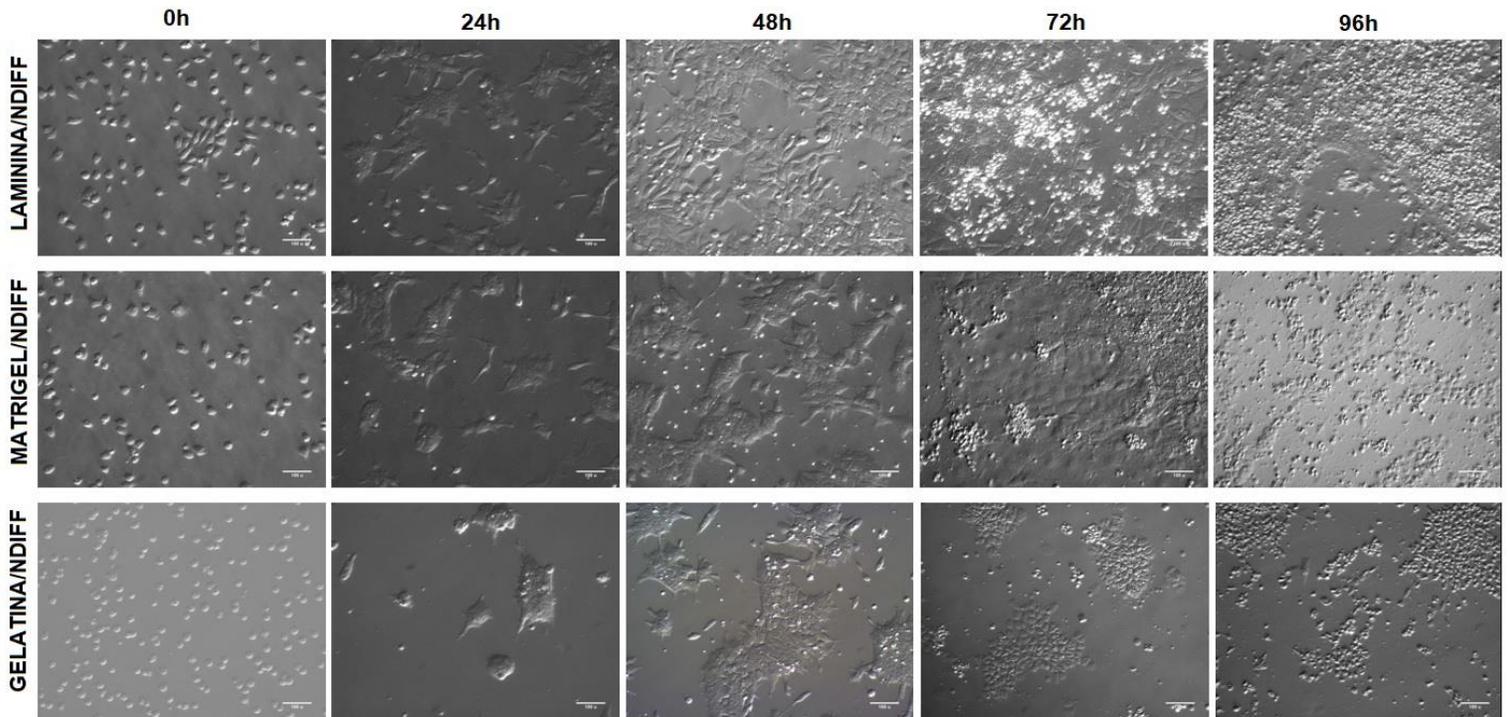


Figura 26. Aspecto del cultivo celular durante la diferenciación neural en tres tipos diferentes de proteínas como matriz extracelular y medio de diferenciación NDIFF. Microfotografías en campo claro de CTER en proceso de diferenciación en un cultivo en monocapa; en las tres condiciones, a partir de las 24 horas después de la inoculación, la morfología de las células cambia, formando pequeñas proyecciones, a partir de las 48 horas, las células empiezan a formar colonias. En las tres condiciones se ve una expansión y diferenciación neural muy similar.

En la Figura 27 se muestran imágenes usando las tres mismas proteínas como matrices extracelulares (laminina, gelatina y matrigel), pero cambiando el medio de cultivo, en este caso a RHB-A. En las imágenes también se puede observar una adhesión y crecimiento celular muy similar al usar NDIFF.

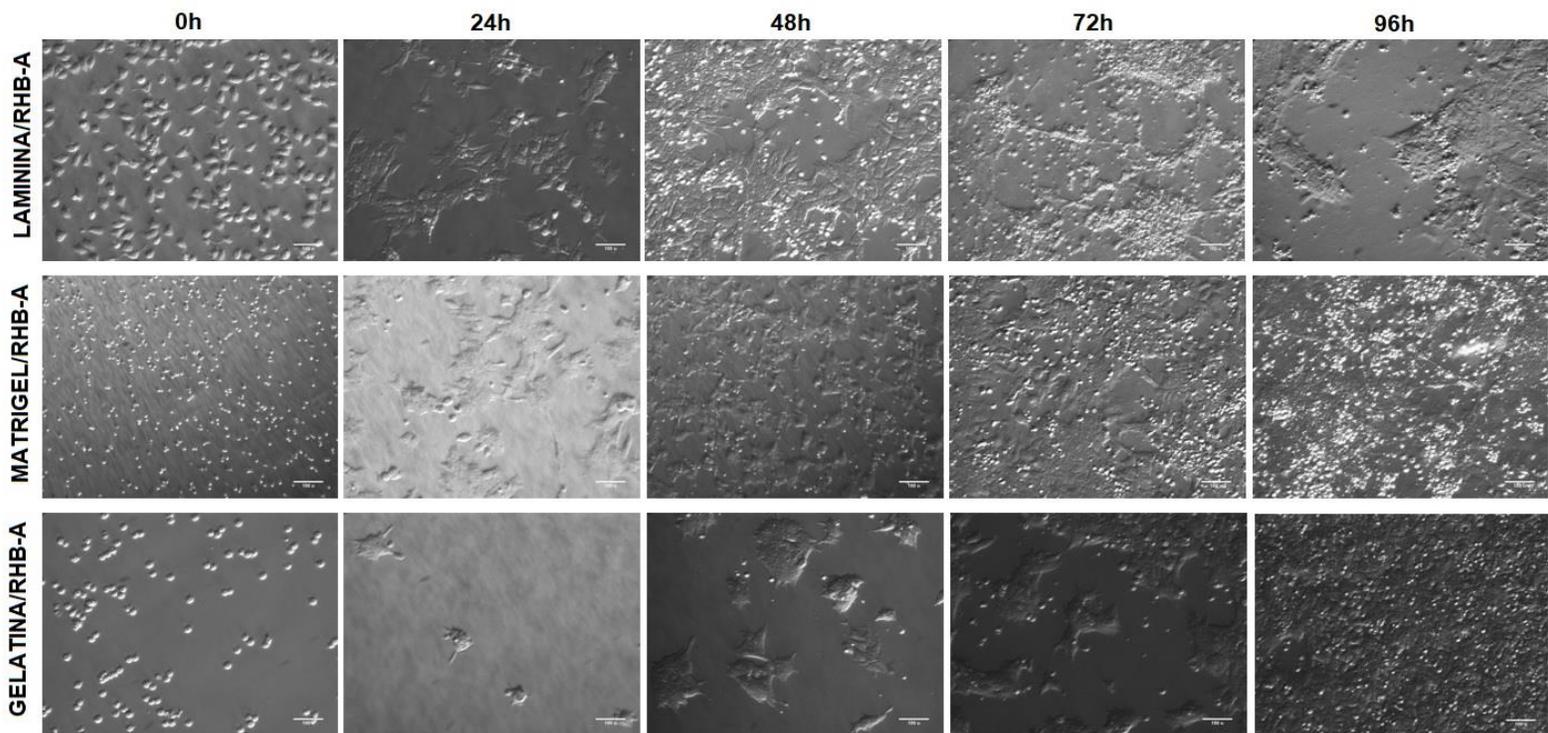


Figura 27. Aspecto del cultivo celular durante la diferenciación neural en tres tipos diferentes de proteínas como matriz extracelular y medio de diferenciación RHB-A. Microfotografías en campo claro de las CTER, en proceso de diferenciación, a las 24 horas se ve un cambio en la morfología de las células; sin embargo, la formación de colonias es muy poco apreciable a partir de las 72 horas. En el caso del uso de gelatina es donde se ve una menor eficiencia en el proceso de diferenciación neural.

Después de los siete días de cultivo se realizó la inmunocitoquímica con el propósito de determinar si la morfología adquirida por las células correspondía a un linaje neural. En la figura 28 se enlistan las fotos obtenidas usando el anticuerpo contra β III tubulina, para el cultivo celular donde fue usado el medio NDIFF. En los tres casos se aprecia la expresión de β III tubulina, en donde la laminina es la matriz donde es menos evidente dicha expresión. Por la evidencia fotográfica se puede observar una baja diferenciación neural, en donde, matrigel y gelatina presentan una mayor expresión con respecto a la laminina.

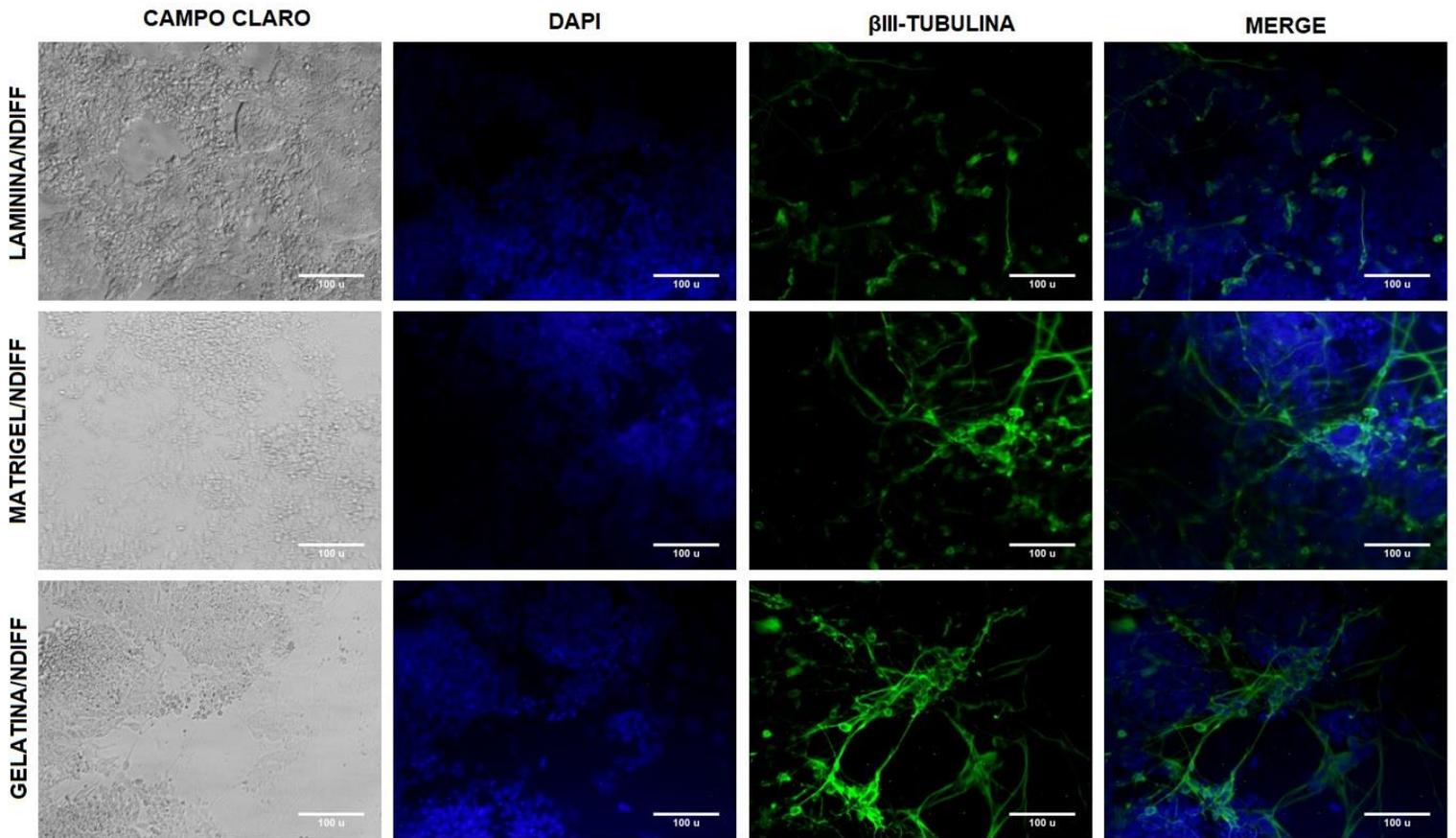


Figura 28. Inmunocitoquímica para detectar β III tubulina usando medio NDIFF. En la primera columna se observa las microfotografías en campo claro de la diferenciación neural, en la segunda columna se usó DAPI para la detección de núcleos; en la siguiente columna se muestra la localización del marcador β III tubulina. En la última columna se hizo un emparejamiento para observar la co-localización de los núcleos con la β III tubulina. Con estas imágenes obtenidas se aprecia una mayor presencia de β III tubulina en donde las células son cultivadas sobre una matriz compuesta de gelatina. Escala de la barra igual a 100 μ .

En la Figura 29 aparecen las imágenes de la diferenciación neural usando en este caso el medio RHB-A, al igual que con el medio NDIFF, en donde es detectado el anticuerpo β III tubulina. Incluso se ve un ligero aumento en la cantidad de dicha proteína.

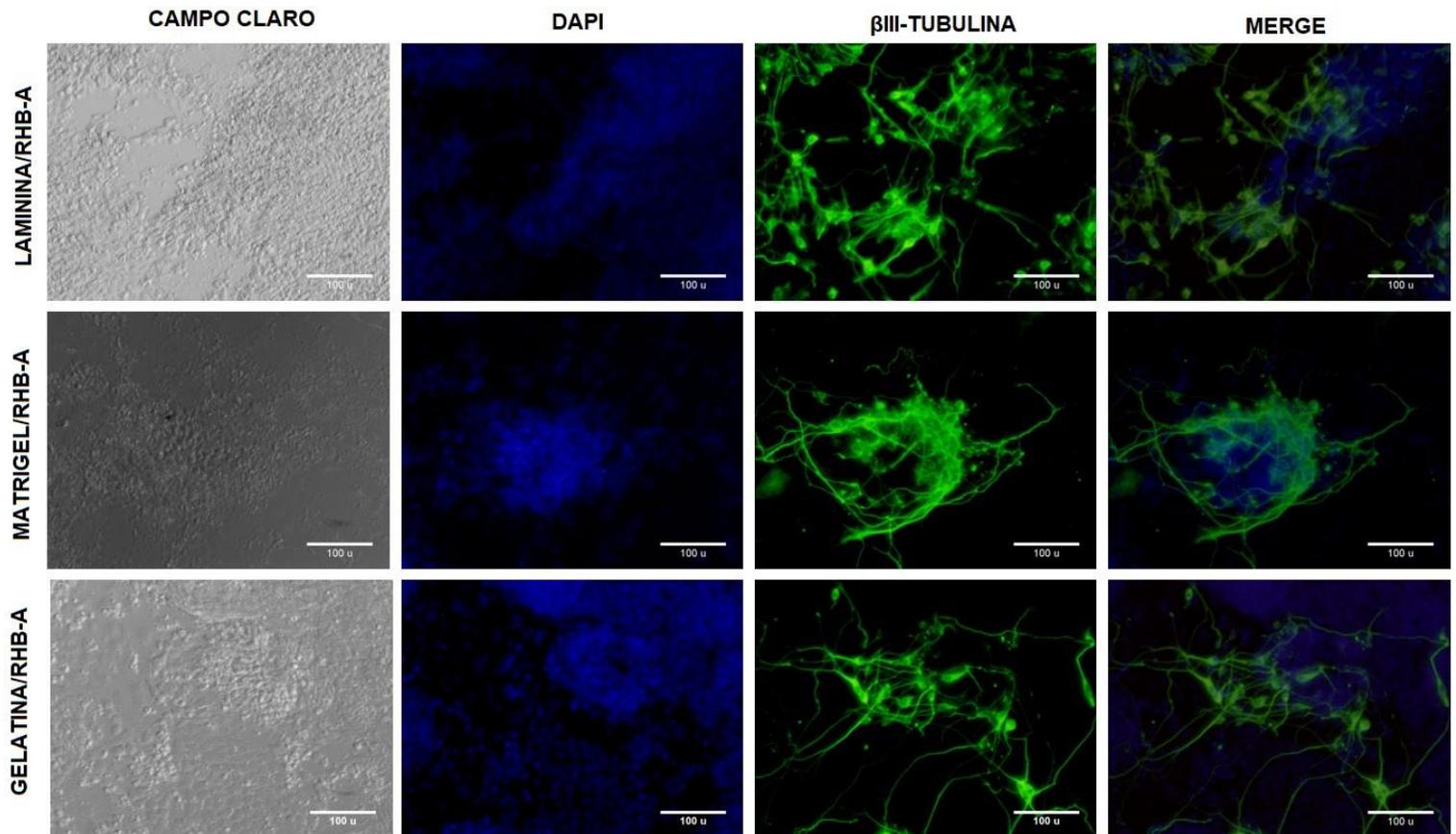


Figura 29. Inmunocitoquímica para detectar β III tubulina usando medio RHB-A. En estas microfotografías se aprecia en la primera columna las células en proceso de diferenciación en campo claro. En esta toma de imágenes también se hizo un emparejamiento entre DAPI y β III tubulina, en donde la presencia de este último marcador en los tres casos es muy similar.

Posteriormente se estimó la proporción de diferenciación de cada una de las combinaciones de los tres sustratos (gelatina, laminina y matrigel) con los medios de diferenciación (NDIFF y RHB-A); para esta estimación, las imágenes fueron procesadas con el software Image J, con el cual se midió el área correspondiente a los núcleos celulares teñidos con DAPI (color azul), y posteriormente se realizó el mismo procedimiento con el área que era positiva para el anticuerpo β III-tubulina (color verde); en este proceso, se procesaron diez fotos por cada uno de los seis combinaciones existentes. Todos los datos obtenidos fueron organizados y procesados en Excel, en donde se realizó el cálculo de la proporción entre β III-tubulina y el número total de núcleos. Con este procedimiento, se determinó de manera indirecta la eficiencia de la diferenciación neural de las CTER. Con estos

resultados se decidió en experimentos posteriores usar la combinación de gelatina con medio NDIFF (Figura 30).

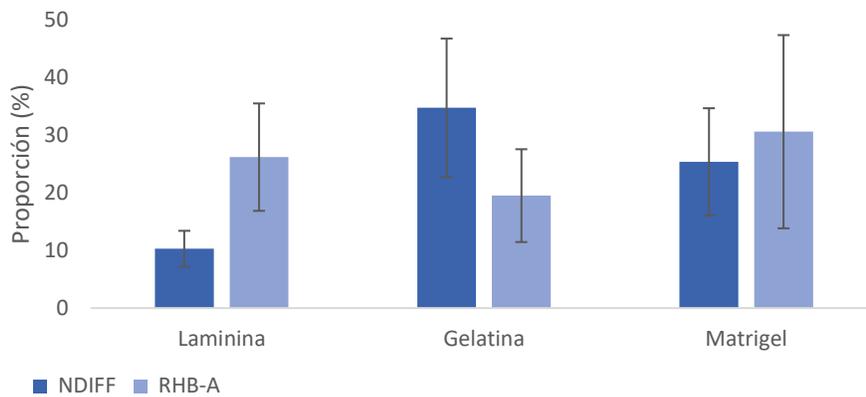


Figura 30: Proporción de la diferenciación neural. Graficas que representan en porcentaje obtenido del anticuerpo β III-tubulina, con respecto al número total de células. Las condiciones que presentaron el mayor porcentaje -35%- fue el de Gelatina y NDIFF, en tanto que el que obtuvo el menor valor fue la combinación laminina/NDIFF, con 10%.

Posterior a la toma de las imágenes se realizó un análisis por inmunocitoquímica, en donde se utilizó el anticuerpo Sinaptofisina para determinar de manera indirecta la existencia de una posible sinapsis entre las células diferenciadas. En la figura 31 se muestran las imágenes obtenidas por el microscopio de epifluorescencia.

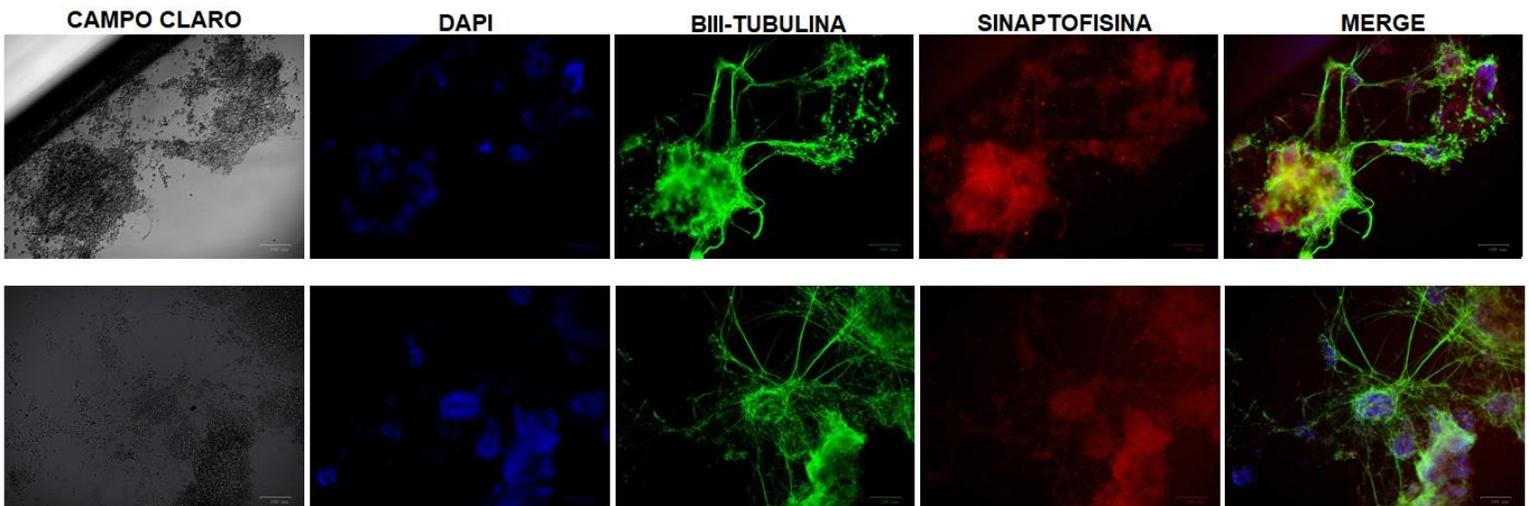


Figura 31. Inmunocitoquímica para la identificación de β III-tubulina y Sinaptofisina. La inmunocitoquímica realizada a las 192 horas, muestra la expresión de las dos proteínas: β III-tubulina indicadora de neuronas tempranas y de Sinaptofisina para determinar la presencia de neuronas maduras. Tomadas en 10x, la escala representa 100 μ m.

7.4 Optimización en la generación de nanofibras compuestas por gelatina:ácido hialurónico mediante la técnica de electrohilado

Se analizaron diferentes combinaciones de gelatina con ácido hialurónico a diferentes proporciones, 10:1, 15:1 y 20:1, respectivamente; las dos primeras combinaciones no fueron posibles de electrohilar. Con la proporción 20:1 y las condiciones siguientes: 15 kV, 0.05 ml/h de velocidad de infusión, 2000 rpm y a 15 cm de distancia de la aguja al colector, si fue posible detectar depósitos de polímero colectado en el cubreobjetos de vidrio tal como se muestra en la figura 32.

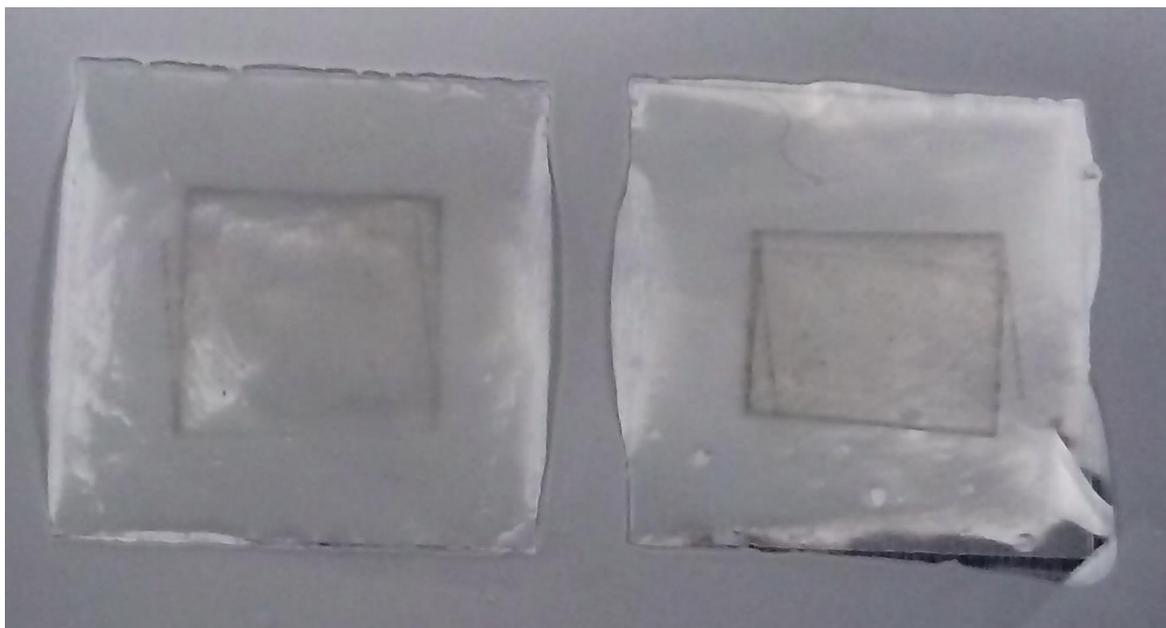


Figura 32. Cubre objetos adaptados para la recolección de nanofibras. Los cubreobjetos fueron colocados en la varilla colectora con el fin de que las nanofibras producidas se situaran sobre éstos; terminado el proceso de electrohilado, en la superficie del cubre objetos se observó una película de color blanco.

Para determinar si lo recolectado efectivamente se trataban de nanofibras, las muestras (en este caso, cuatro) fueron preparadas para su observación en un microscopio electrónico de barrido. En la figura 33 se observan las microfotografías obtenidas, y es evidente que no fue posible electrohilar, en este caso sólo se ven gotas acumulados en toda el área colectada.

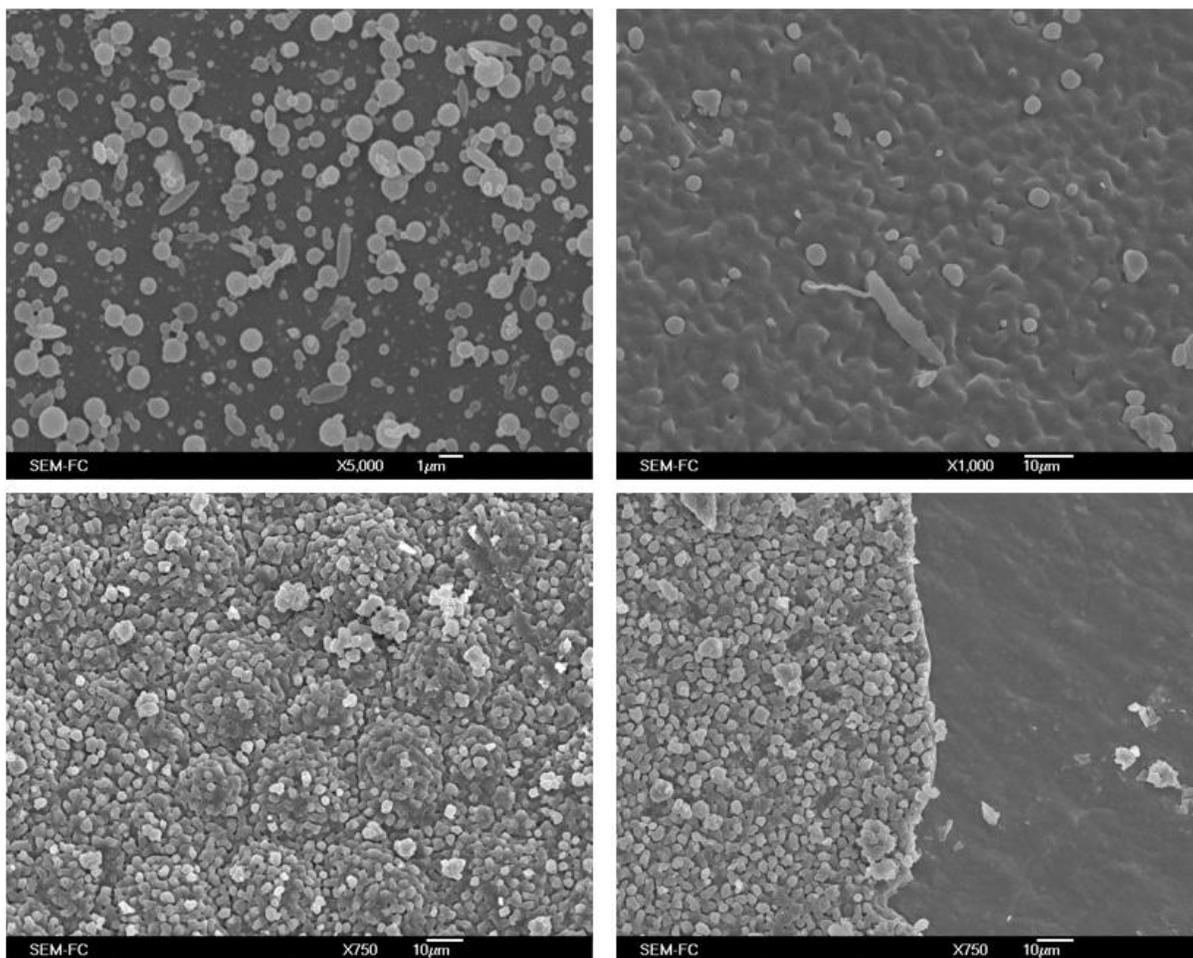


Figura 33. Microscopia de barrido para material colectado en cobreobjetos. Las imágenes obtenidas sólo mostraron la acumulación en esferas de los polímeros usados en el electrohilado. es decir, no se encontró presencia alguna de nanofibras.

Continuando con la optimización para el proceso de generación de nanofibras de gelatina:AH se propuso inicialmente generar nanofibras constituidas solamente por gelatina. Algunas de las variables del electrohilado fueron modificadas para este propósito. Tras varias pruebas se determinó que con las condiciones: distancia de la aguja al colector de 10 cm, velocidad de infusión de $0.006 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$, diámetro de la aguja de 22G, y una velocidad de rotación de $2000\pm 10 \text{ rpm}$ fue posible generar nanofibras formando una red alrededor del cobreobjetos (Figura 34). Aunado a la modulación de las variables ya mencionadas, se utilizó un calentador para mantener una temperatura más estable en la sala donde se encuentra el equipo, la temperatura registrada oscilo alrededor a los 22°C .

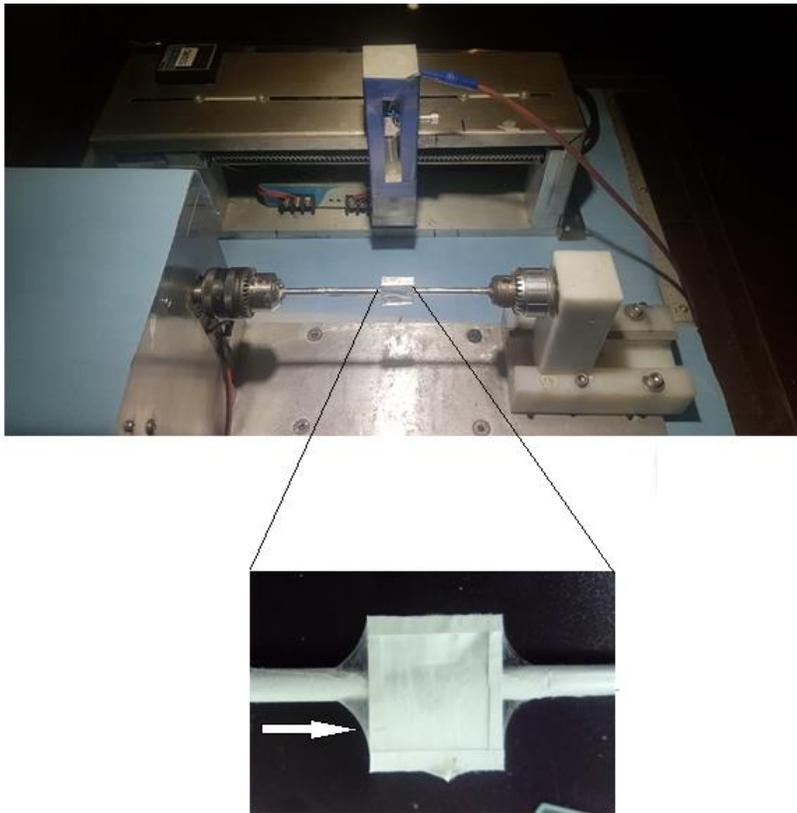


Figura 34. Cubreobjetos cubiertos por nanofibras. En estas nuevas pruebas se apreció la formación de una malla formado por pequeñas fibras alrededor del cubre objetos, la cual se indica con la flecha, denotando la posible presencia de nanofibras.

Se generaron cuatro muestras con las condiciones descritas para nuevamente ser tratadas para su observación en el microscopio electrónico de barrido. En la figura 35 se muestran las fotos obtenidas, en donde se observa la formación de nanofibras dispuestas de manera azarosa.

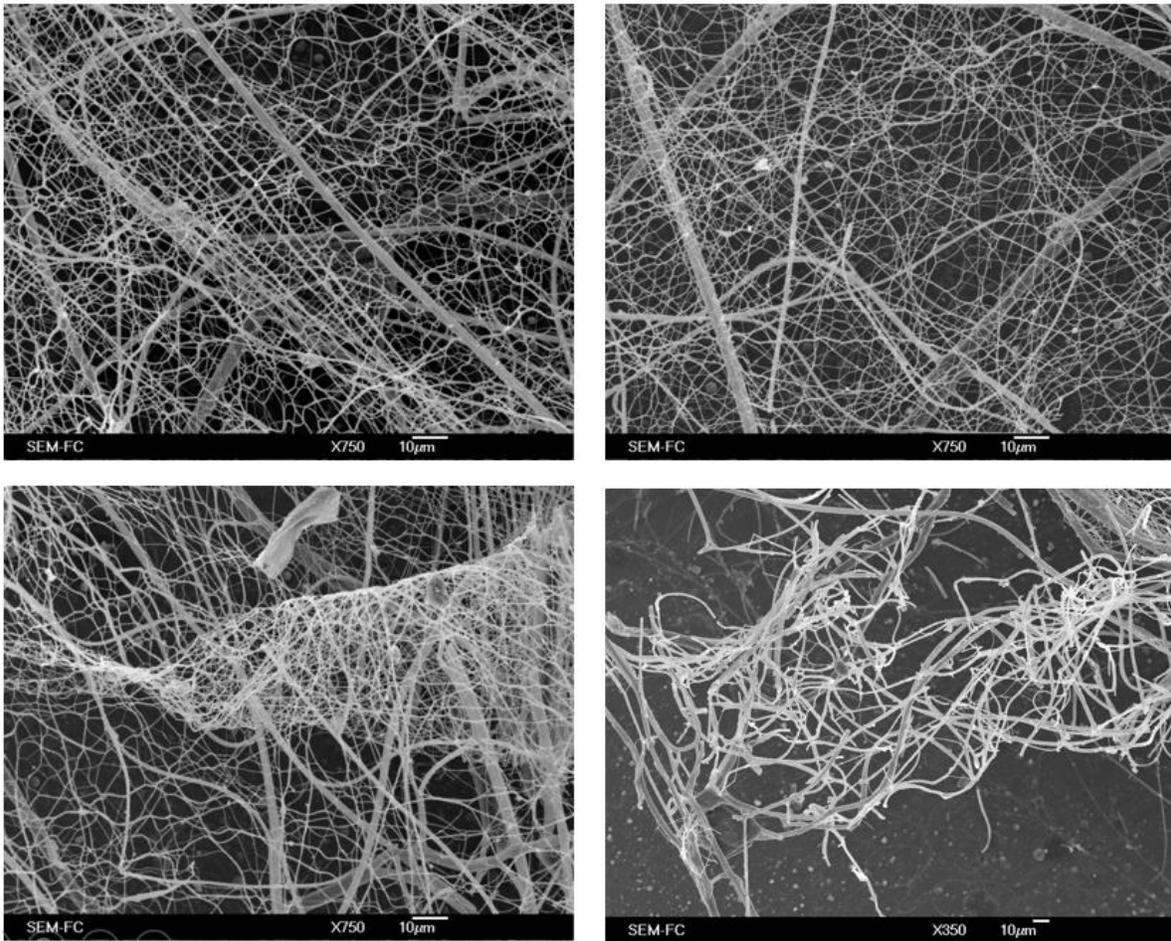


Figura 35. Microscopia electrónica de barrido de nanofibras de gelatina. Las imágenes muestran la formación de nanofibras, en donde es posible observar que éstas están formadas de manera continua, con una casi total ausencia de aberraciones (pequeños cúmulos de polímero).

Una vez establecidas las condiciones anteriores del equipo de electrohilado, fue necesario realizar variaciones en el voltaje para lograr la formación de nanofibras de gelatina:ácido hialurónico (20:1). El voltaje usado fue de 18kV, mientras que las demás variables se mantuvieron igual que en el caso de las condiciones optimizadas para la generación de nanofibras de gelatina. Al igual que en la recolección de nanofibras de gelatina, fue perceptible la generación de nanofibras de fibras en el perímetro del cubreobjeto. Se analizaron cuatro muestras independientes para determinar la presencia de nanofibras de gelatina:AH con la

técnica de microscopía electrónica de barrido, tal y como se muestran en la Figura 36.

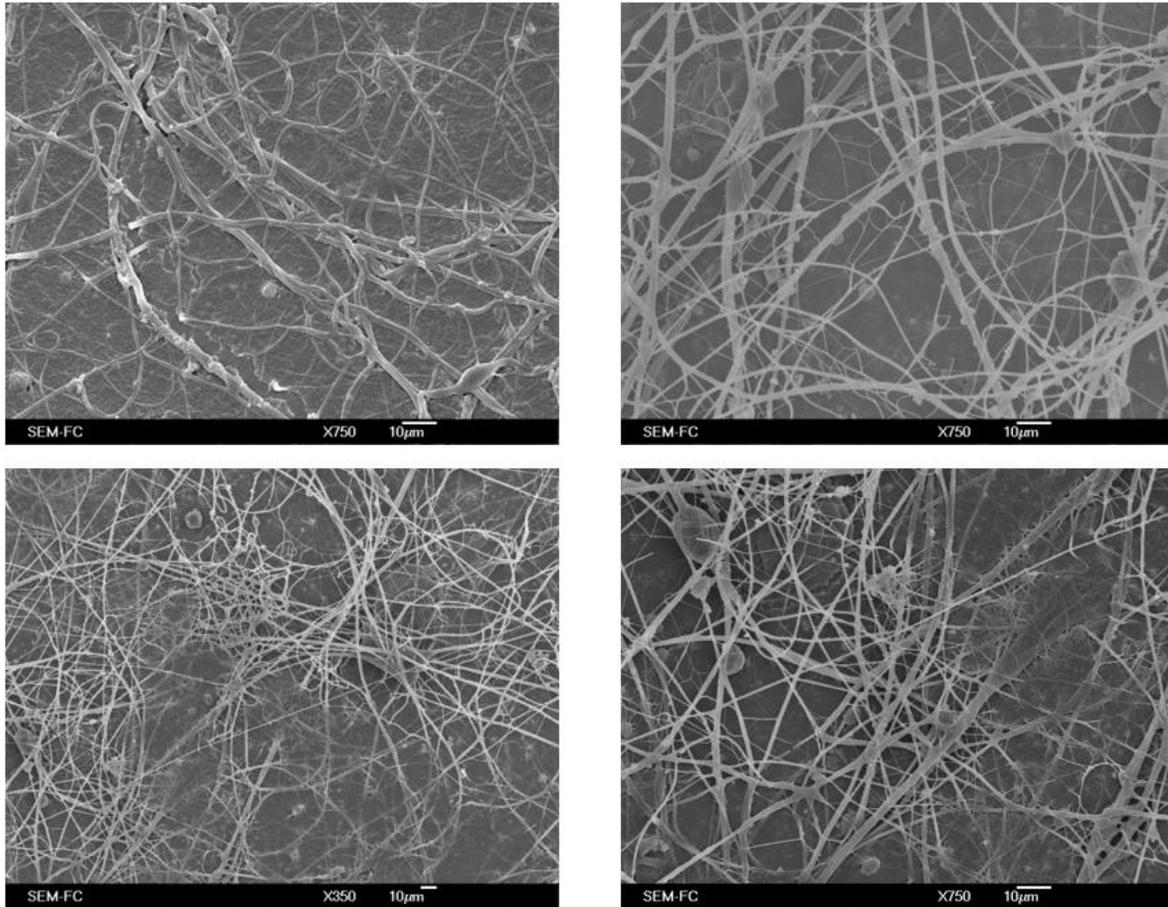


Figura 36. Microscopía electrónica de barrido de nanofibras de gelatina:ácido hialurónico. Con las imágenes obtenidas se observa que no existen abundantes aberraciones, sin embargo, el tamaño de poro es mayor que en los observados en las nanofibras de gelatina.

Las nanofibras de gelatina/ácido hialurónico presentaron un diámetro mayor que las que solo estaban constituidas por gelatina. Para la caracterización de las nanofibras obtenidas se usó el software Image J, con el cual se evaluó el diámetro de las fibras, un conteo de aberraciones y el tamaño de poro formado por estas fibras. El diámetro promedio de las nanofibras de gelatina fue de 336 ± 100 nanómetros, en tanto que para las que estaban constituidas por gelatina y ácido hialurónico, el valor fue de 490 ± 190 nanómetros. En tanto que en las nanofibras de gelatina se encontró un promedio de 23 aberraciones, mientras que en combinación con ácido hialurónico se contabilizaron 32 aberraciones (Figura 37).

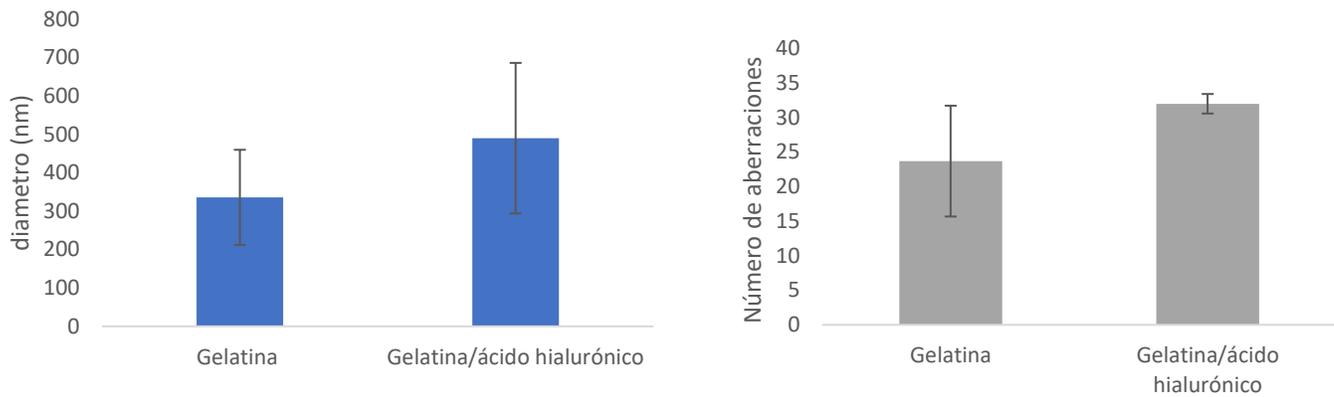


Figura 37. Diámetros de las nanofibras producidas por electrohilado. Las gráficas muestran el diámetro de las nanofibras, donde se observó que, al usar una combinación de ácido hialurónico y gelatina, las nanofibras aumentaban su tamaño, en comparación a las nanofibras compuestas solamente por gelatina. También se contabilizó el número de aberraciones el cual fue un número muy bajo, sobre todo en el caso de las nanofibras de gelatina.

Con la intención de evaluar la biocompatibilidad de las nanofibras de gelatina:AH con cultivo celular, se inocularon CTER a una densidad de 2.5×10^4 células·cm⁻² en un cubreobjeto cubierto con estas nanofibras. Lo anterior para evaluar la toxicidad o compatibilidad para la adhesión y expansión celular. En la figura 38 se observan las fotografías en campo claro a través de 96 horas, tiempo en el cual fue claro el anclaje de las células en los andamios.

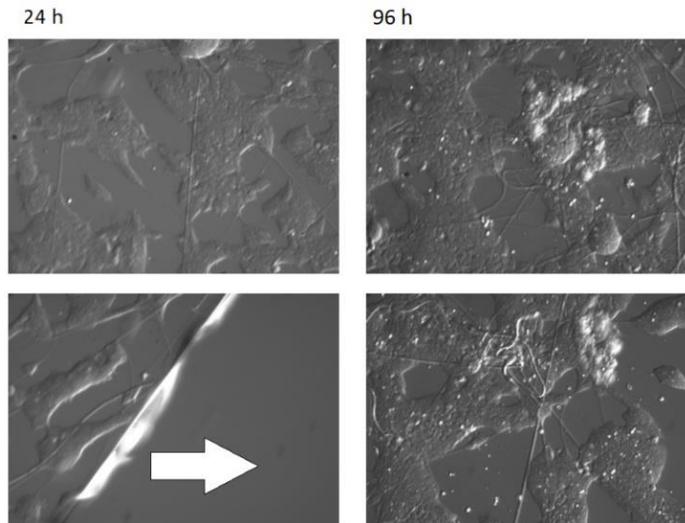


Figura 38. Prueba de adhesión celular con andamios de nanofibras. Microfotografías a 10x, donde se aprecia la proliferación y anclaje de las CTER en los andamios, la parte que señala la flecha es el espacio libre que queda en el pozo de plástico no tratado (y donde no se observa ningún tipo de adhesión celular), y donde no hay presencia de células.

7.5 Diferenciación neural en andamios de nanofibras de gelatina/ácido hialurónico

Para la diferenciación neural de CTER en nanofibras de gelatina:AH se utilizó una densidad de inóculo de 3×10^4 cél·cm⁻². De acuerdo al procedimiento ya descrito, se utilizó medio NDIFF suplementado con antibiótico/antimicótico a una concentración de 10x. En la figura 39 se muestran las microfotografías obtenidas a través del tiempo (192 h) de la diferenciación neural.

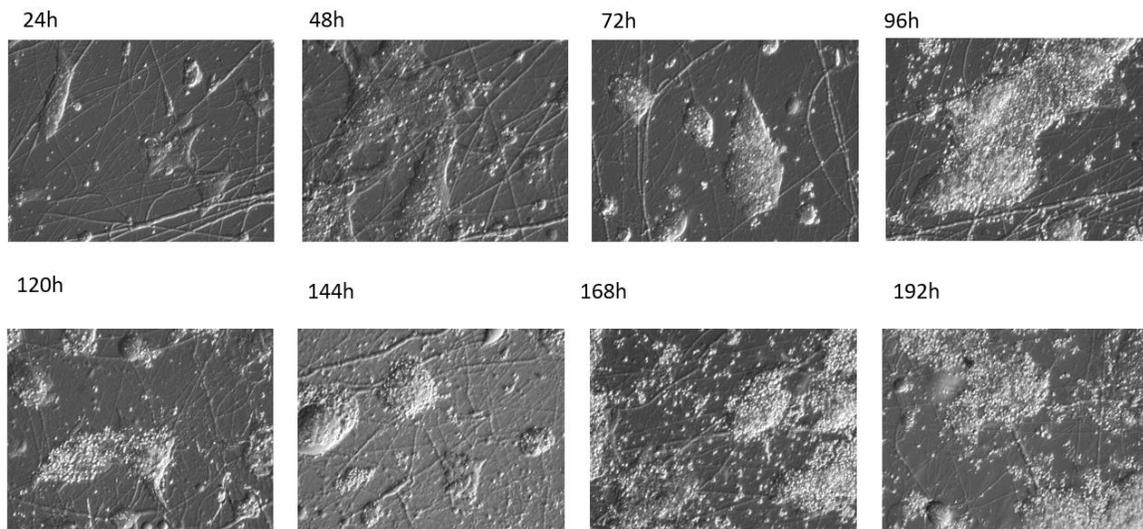


Figura 39. Diferenciación neural en andamios compuestos de nanofibras de gelatina:ácido hialurónico. A partir de las 24 horas la morfología de las CTER empieza a cambiar, formando pequeñas proyecciones, algunas de estas proyecciones se ven alineadas con las nanofibras. Después de las 48 horas, es posible observar que una fracción de las células cultivadas se empiezan a adherir sobre las fibras promoviendo la formación de colonias. A las 144 horas las colonias se tornan de forma circular. A las 192 horas el cultivo se detuvo.

A las 24 horas es apreciable la proyección y alineamiento en las nanofibras de las células cultivadas. A las 144 horas se observa un cambio característico en la morfología de las colonias celulares al ser sometidas a diferenciación neural, es decir, la formación de colonias en forma circular. En la figura 40 se muestra un acercamiento de dichas estructuras, en las que se señala con una flecha las proyecciones celulares, así como las colonias celulares.

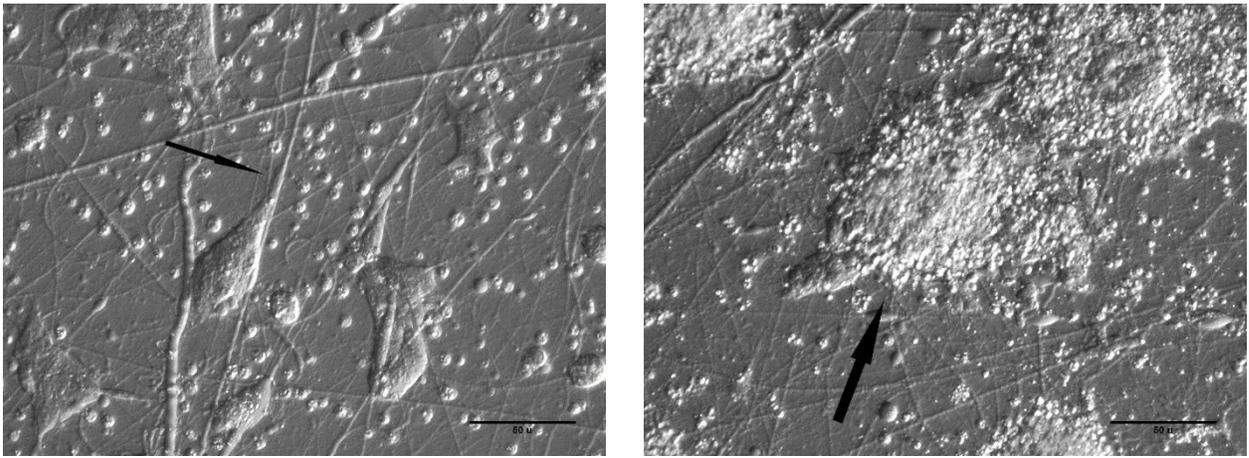
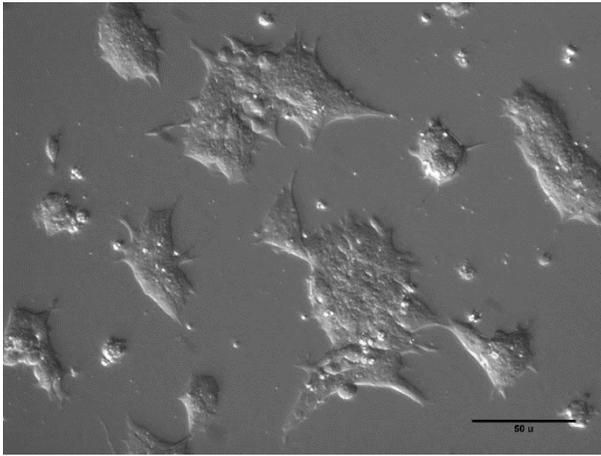


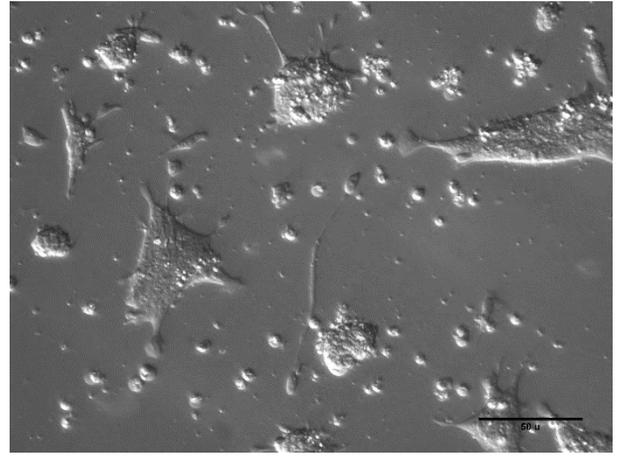
Figura 40. Alineamiento de proyecciones celulares. Las flechas indican las proyecciones a las 24 horas (izquierda); y a las 144 horas (derecha) se pueden apreciar grandes colonias celulares. Aumento de 10x.

Como control del proceso de diferenciación neural en nanofibras de gelatina:AH, se utilizó la diferenciación neural en monocapa en placas de plástico tratado para cultivo celular. Se utilizó la misma línea celular (E14Tg2a), usando como matriz extracelular gelatina en pozos de 9.6 cm² con el medio de diferenciación NDIFF, a las mismas condiciones de cultivo (5%CO₂ y 37°C, con control de Humedad relativa). En la figura 41 se muestra la evolución del cultivo sometido a la diferenciación neural en monocapa como control. En estos cultivos también son visibles las formaciones de colonias muy densas de células a partir de las 72 horas, y la formación de proyecciones axonales a partir de las 144 horas.

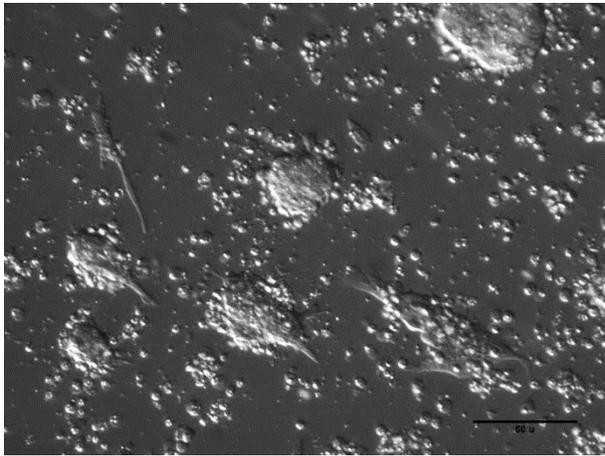
24h



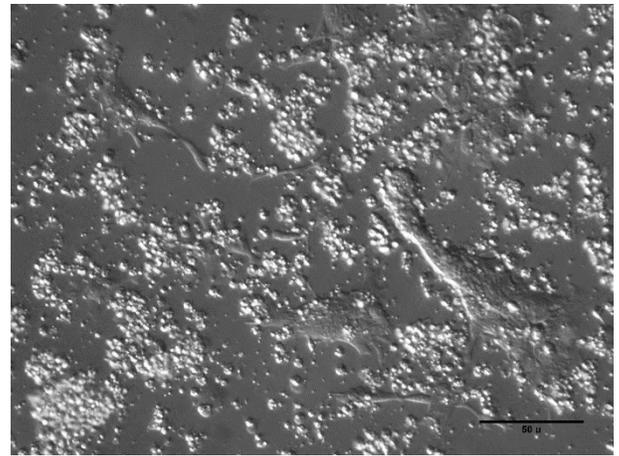
48h



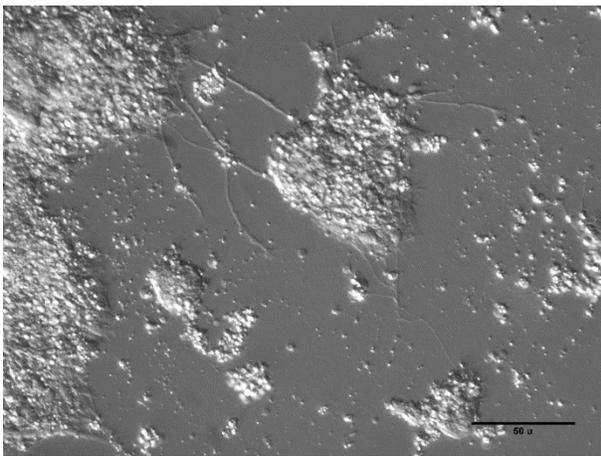
72h



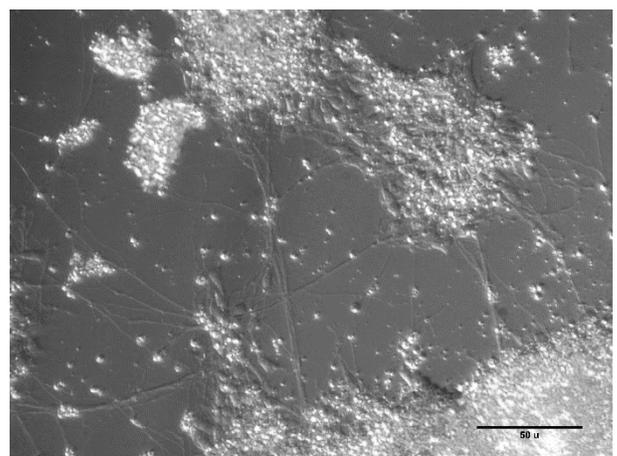
96h



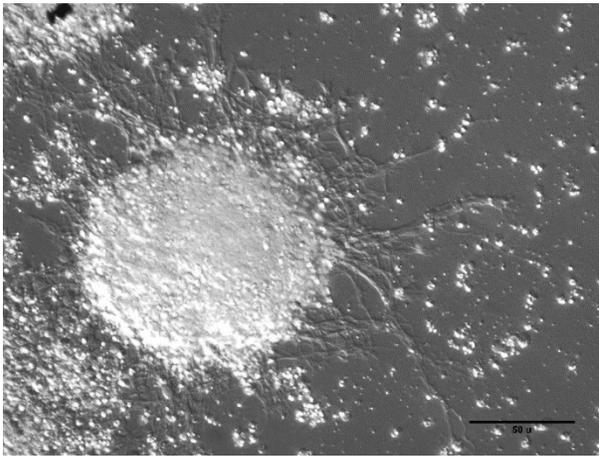
120h



144h



168h



192h

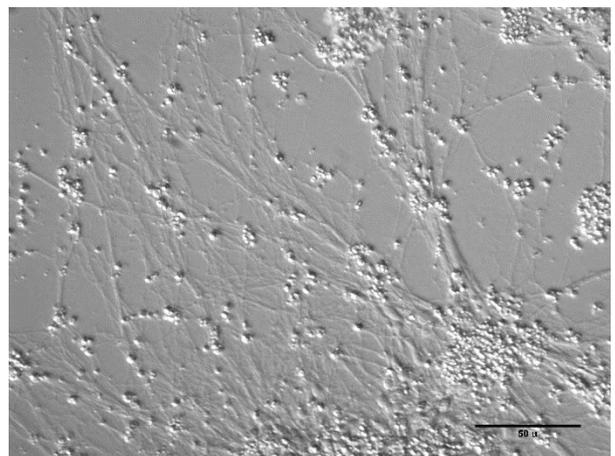
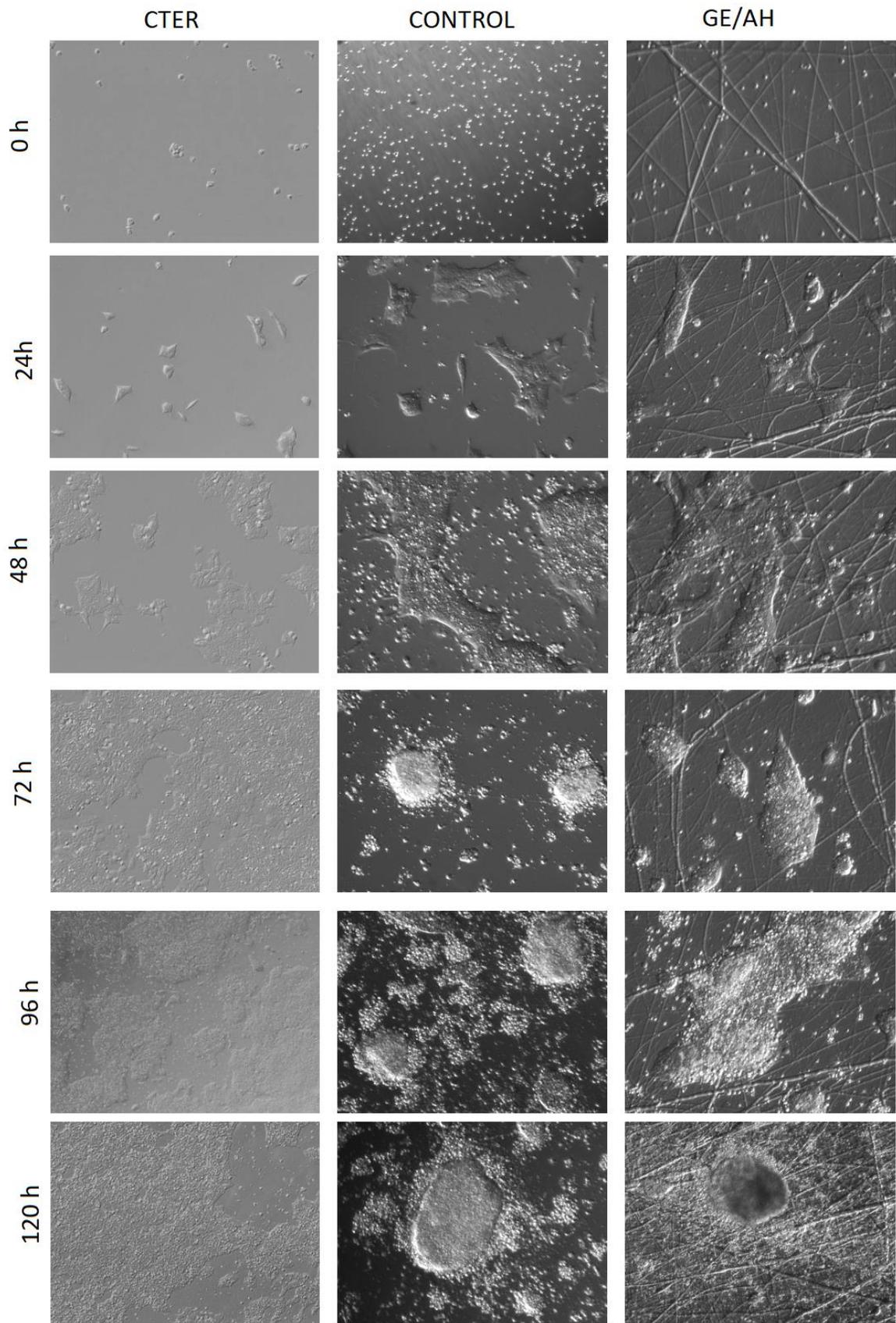


Figura 41. Proyecciones celulares durante la diferenciación neural. Microfotografías obtenidas a lo largo del proceso de diferenciación neural. Las flechas indican los cúmulos de células en cuya periferia se observan las proyecciones celulares a un aumento de 10x.

Se realizó un análisis comparativo entre el control (cultivo y diferenciación en monocapa) y el cultivo y diferenciación en nanofibras de gelatina:ácido hialurónico. En la figura 42 se puede observar una similitud entre el control y las células inoculadas en las nanofibras, en ambas se observa un cambio morfológico representado principalmente por proyecciones y la formación de colonias celulares de forma circular. En ambos casos también se observa una morfología celular muy parecida en ambos sistemas de cultivo. Contrastados estos cambios con lo observado en la cinética de proliferación de las células troncales embrionarias de ratón en el mismo intervalo de tiempo, se puede inferir que existe diferenciación celular en ambas condiciones de cultivo.



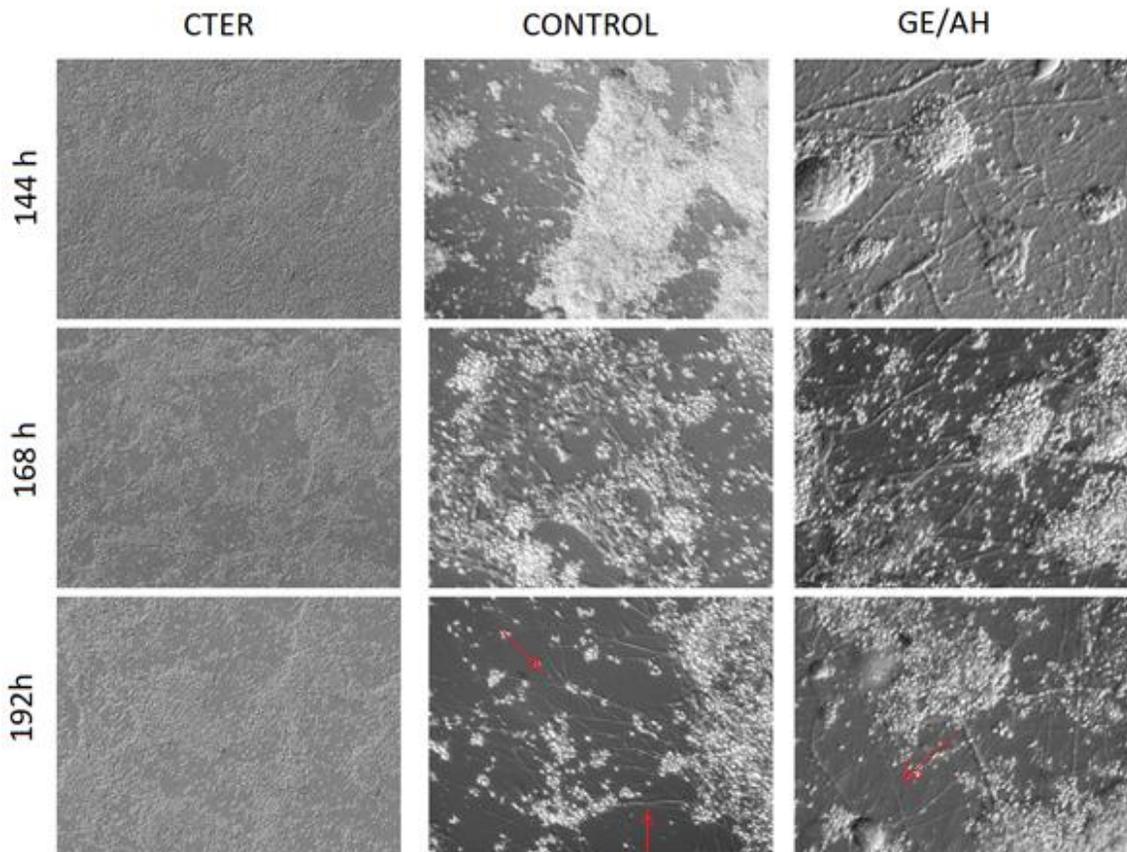


Figura 42. Comparativa entre el cultivo en monocapa de las CTER y su diferenciación neural contra la diferenciación neural en nanofibras. En la columna izquierda se muestra la cinética de proliferación de las CTER en un cultivo en monocapa, la formación de colonias es apreciable a las 72 horas, sin embargo, su morfología no presenta proyecciones. En la columna central se enlistan las microfotografías de la diferenciación neural en un cultivo en monocapa a través del tiempo, a partir de las 48 horas se observa la formación de colonias, así como de proyecciones celulares, a las 72 horas aparece colonias muy densas, a las 192 horas es evidente un parcial cambio morfológico de las células, acompañadas por algunos axones (flechas rojas). En la columna derecha, se muestra la diferenciación neural sobre las nanofibras de gelatina/ácido hialurónico, también se observa un cambio parcial en la morfología celular, la cual es similar a la observada en el cultivo en monocapa. En este caso también se pueden apreciar la formación de axones (flecha roja). Aumento a 10x.

Se utilizó inmunocitoquímica para la detección de β III tubulina, como indicador de la presencia de linaje neural en la diferenciación de CTER en nanofibras de gelatina: ácido hialurónico. A pesar de que existe cierto grado de autofluorescencia por las

mismas nanofibras, fue posible identificar la presencia de neuronas a través de este marcador. Tal como se observa en la Figura 43.

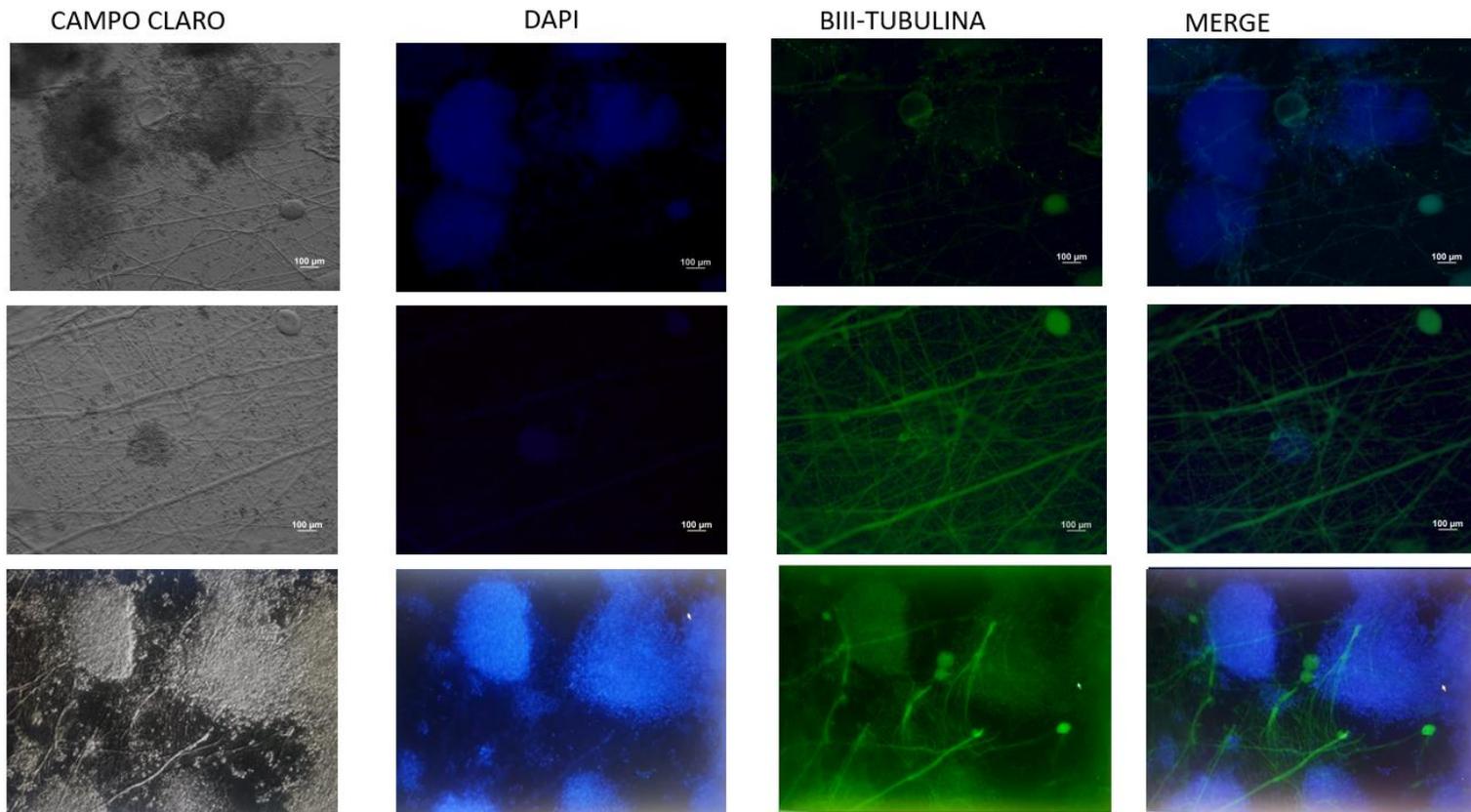


Figura 43. Inmunocitoquímica para la identificación de β III-tubulina en diferenciación neural en nanofibras. Se muestran las células después de la diferenciación celular en las nanofibras.

La prueba de inmunocitoquímica no fue determinante debido a que, al observarse los cultivos, los andamios presentaron autofluorescencia, como se aprecia en la figura 44. En dichas imágenes no fue posible distinguir entre las proyecciones propias de las células y las fibras que estaban constituyendo el andamio.

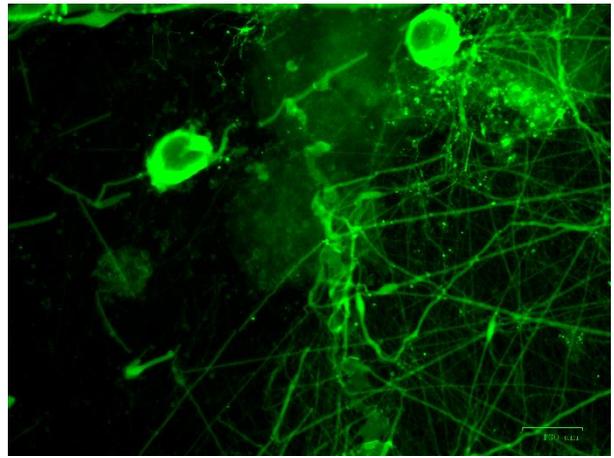
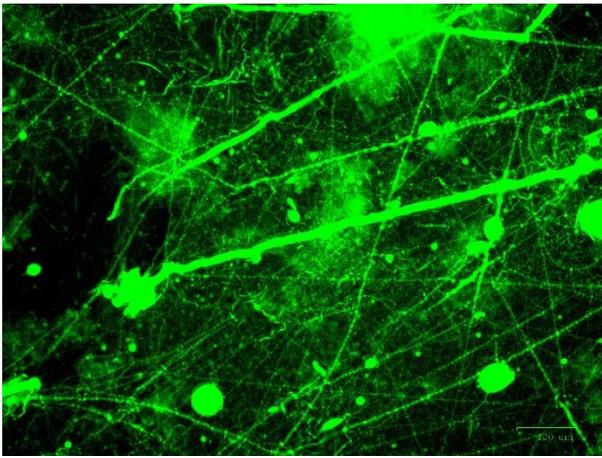


Figura 44. Imágenes de cultivo sobre andamio de nanofibras. Autofluorescencia presentada por las nanofibras de los andamios.

7.6 Microscopia electrónica de barrido

Para determinar de manera indirecta la adhesión celular a los andamios de gelatina/ácido hialurónico se realizó un análisis de las muestras con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5310LV). Fue posible corroborar que las neuronas obtenidas por la diferenciación de las CTER tuvieron adhesión al andamio, el cual, cabe mencionar se vio afectado por el tratamiento llevado a cabo para su observación en esta técnica. Por otra parte, se puede apreciar la formación de proyecciones neurales (indicadas por flechas rojas) Figura 45.

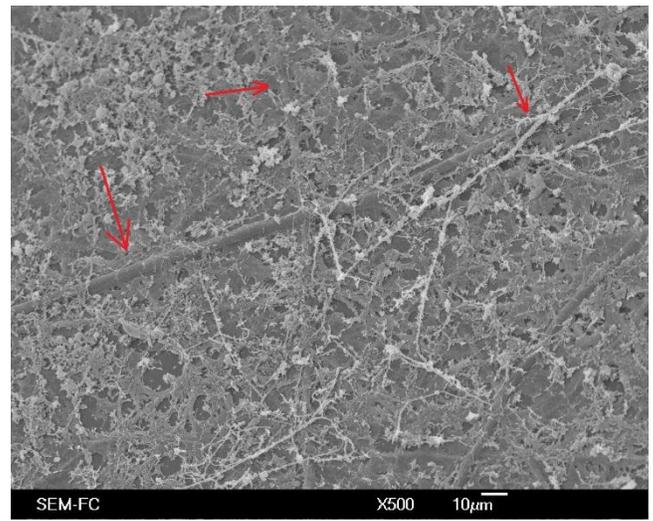
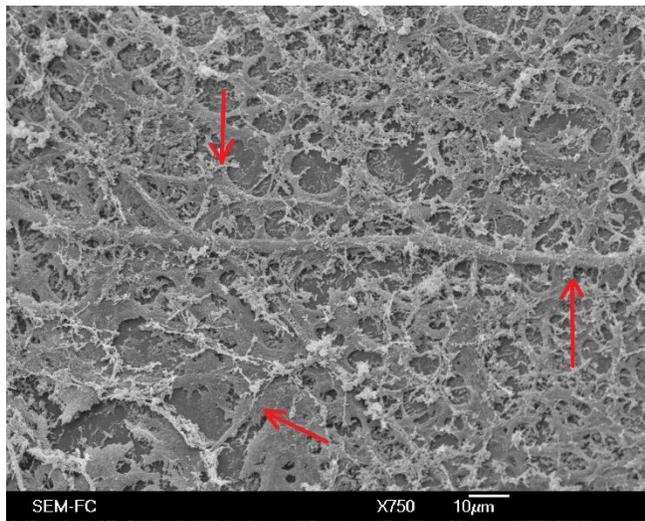


Figura 45. Microfotografías de microscopía electrónica de barrido de células diferenciadas sobre nanofibras. Las imágenes muestran las proyecciones neurales (indicadas con flechas rojas) de las células adheridas a las nanofibras.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de observar a las células mediante esta técnica fue el de tener la capacidad de apreciar si las células se habían adherido a la matriz constituida por las nanofibras elaboradas en el laboratorio. En la figura 46 se muestra el enfoque de ambas partes, donde se encontraba el andamio y la parte de vidrio donde no se recolectaron las fibras, así fue posible determinar si existía de manera indirecta una adhesión celular por parte de las CTER depositas en los andamios.

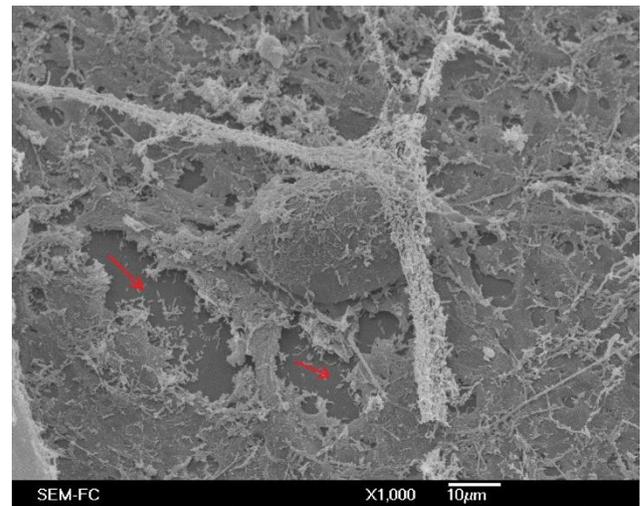
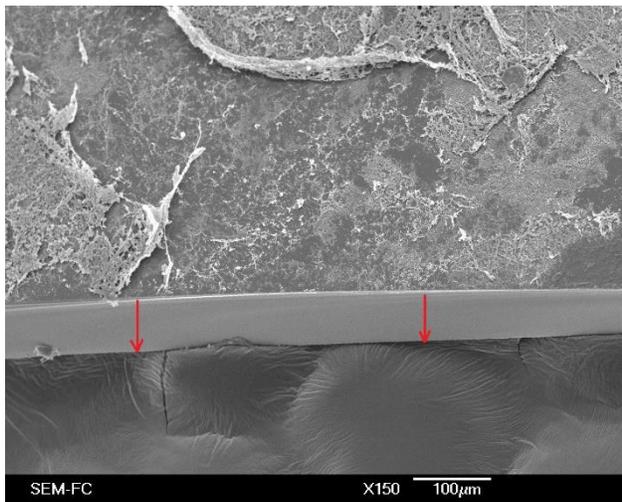


Figura 46. Acercamiento de neurona obtenida por microscopía electrónica de barrido. Microfotografías por microscopía electrónica de barrido. Se muestra ausencia de adhesión celular en el sitio del portaobjetos en la que no existían nanofibras (lado izquierdo). En el sitio de depósito de nanofibras de gelatina/ácido hialurónico, se detectó adhesión celular, y morfología neuronal de acuerdo con la literatura (lado derecho).

En la figura 47 se presenta una imagen de microscopía electrónica de barrido de precursores neurales anclados en un andamio de nanofibras de poli-L-ornitina y laminina. Esta imagen es ilustrativa para comparar lo obtenido en este estudio con lo observado en otros trabajos.

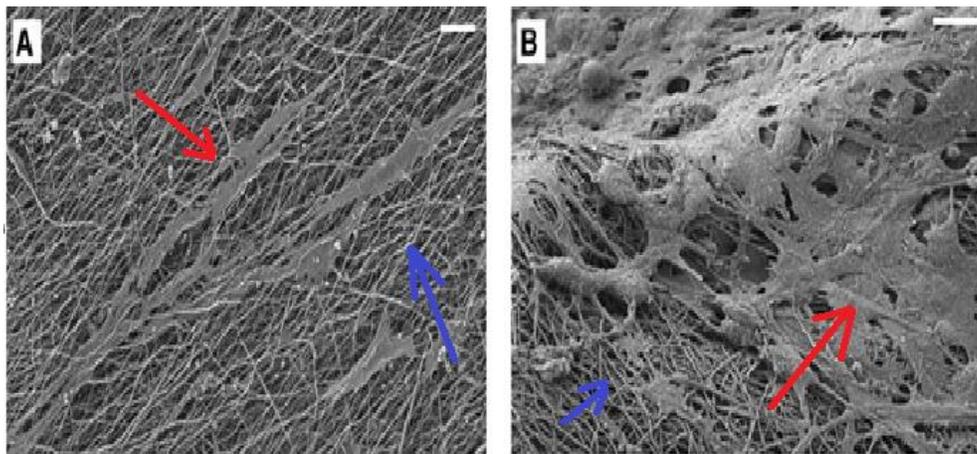


Figura 47. Microscopía electrónica de barrido. En estas imágenes se observa a los precursores neurales y su aparente anclaje en los andamios, con las líneas azules se indican las nanofibras, en tanto que las rojas indican a las células sobre las nanofibras (Mahairaki *et al.*, 2011).

8. DISCUSIÓN

La generación de andamios que tengan la capacidad de soportar un cultivo celular es uno de los objetivos principales de la ingeniería de tejidos y de la medicina regenerativa. Así, el resultado de este trabajo fue la creación de un andamio constituido de nanofibras capaz de soportar un cultivo de células neurales diferenciadas a partir de CTER.

La primera parte del proyecto fue el mantenimiento de la línea celular de las células troncales embrionarias de ratón (E14Tg2a); el mantenimiento de este tipo de células involucra la expansión, crecimiento y mantenimiento de la pluripotencia. El estado pluripotente de la línea celular fue una parte fundamental del proyecto, ya que, sin esta condición, las células pueden entrar en un proceso de diferenciación espontánea (Heo *et al.*, 2005). Conservando la pluripotencia de las células, es posible someterlas a una diferenciación, en este caso, neural.

Para evitar la diferenciación espontánea en las células troncales embrionarias, es indispensable suplementar el medio de cultivo (GMEM, GIBCO) con el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF, por sus siglas en inglés) para así mantener un estado pluripotente (Williams *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988). Actualmente el mantenimiento de las células troncales embrionarias de ratón se sigue basando en la suplementación con LIF, sin embargo, no es el único componente que le es añadido a los medios de cultivo. En el caso del trabajo reportado por Zhang y cols., los medios de cultivo fueron suplementados con elementos muy similares a los usados en este trabajo, como por ejemplo el β -mercaptoetanol, glutamina y aminoácidos no esenciales. Así como se reporta en el trabajo de Zhang y cols., la suplementación de los medios con los elementos antes mencionados, favorecen la expansión celular, tal como se verificó con la cinética de proliferación aplicada a las CTER usadas para este trabajo. Con la literatura revisada y con los resultados obtenidos a través de la prueba de inmunocitoquímica y cinética de proliferación, se logró estandarizar el mantenimiento de las CTER.

La estandarización de las CTER, permitió la siguiente fase del proyecto; dicha fase fue la estandarización en el proceso de diferenciación neural. En 2004, Höpfl y cols.

describieron un método para obtener cuerpos embrioides (los cuales son frecuentemente requeridos para la diferenciación celular). Estos cuerpos embrioides (CE) son importantes ya que recapitulan muchos aspectos de la diferenciación celular durante la embriogénesis temprana de mamíferos, y dan lugar a células maduras de las tres capas germinales (*Doetschman et al.*, 1985; Shen y Leder, 1992). Estos cuerpos embrioides permitieron a varios grupos de trabajo (*Kawasaki et al.*, 2002; *Chen et al.*, 2003; *Levenberg et al.*, 2003; *Hwang et al.*, 2008) reportar sobre la diferenciación y el desarrollo de las células troncales embrionarias.

Sin embargo, en este estudio, la diferenciación neural a partir de la formación de cuerpos embrioides no fue usada; la decisión de no realizar el procedimiento de obtener cuerpos embrioides fue porque éstos, pueden dar origen a otros linajes celulares al requerido. Esta generación de otros tipos celulares no deseados involucraría llevar a cabo una separación para así obtener solamente el linaje deseado. Por ello se buscó una forma alternativa que permitiera la obtención específica de células neurales. El procedimiento que se usó fue el método propuesto por Ying y *cols.* de 2003, el cual involucra la utilización de un medio suplementado con N2 y B27. Esta decisión fue tomada ya que este grupo reportó que las células cultivadas en pozos de plástico (previamente tratados con gelatina), usando un medio libre de suero y suplementado con N2 y B27, los cultivos presentaban alrededor de un 60% de células diferenciadas hacia precursores neuronales en 4 días de cultivo. Este medio suplementado con N2 y B27 también ofreció una alta viabilidad celular (>50%).

Por estas razones, la estandarización de la diferenciación neural a partir de las CTER (E14Tg2a) se llevó a cabo usando el medio NDIFF 227 (Takara, Japón), el cual ya contiene N2 y B27. En el proceso de estandarización, se hicieron cambios, para obtener las células de linaje neural que el proyecto requería. Dentro de esos cambios en el procedimiento ya citado, fue el ajustar el número de células inoculadas, ya que, en primeras pruebas, el número de estas células inoculadas fue muy bajo, favoreciendo la muerte celular. Al aumentar el número de células inoculadas, en este caso al doble, la viabilidad celular aumento, favoreciendo así la diferenciación neural. Tras observar la morfología característica de las células neurales (proyecciones citoplasmáticas), se realizó la prueba de inmunocitoquímica para determinar si efectivamente se trataban de células neuronales. Dichos

resultados mostraron que la expresión de β III-tubulina (marcador neuronal) era evidente. Por tanto, se estandarizó el procedimiento para células de linaje neural en un cultivo en monocapa, sin la necesidad de la formación previa de cuerpos embrioides.

Otra parte fundamental del proyecto fue la construcción del andamio que serviría de soporte para el cultivo en diferenciación de las CTER. La producción del andamio fue realizada a través de la técnica de electrohilado debido a que los andamios obtenidos presentan una alta relación superficie/volumen, porosidad y organización tridimensional (Mele, 2016). Existen otros modelos en 3D que también son usados como andamios celulares, como por ejemplo los hidrogeles (usualmente constituidos de Matrigel) y que a menudo ayudan a estudiar la diseminación de los esferoides tumorales y promueven una morfología migratoria alargada típica de las células *in vivo* (Ananthanarayanan *et al.*, 2011). Sin embargo, los hidrogeles no pueden simular directamente la naturaleza direccional de las prolongaciones nerviosas de las neuronas (Onishi *et al.*, 1998; Fortin *et al.*, 2013). Además, existen varios informes que investigan factores que pueden influir en la diferenciación neural de las células troncales. Por ejemplo, se ha demostrado que la topografía de nanofibras juega un papel importante en la diferenciación neuronal a partir de las células troncales (Xie, 2009).

En 2019, Philip y *co/s.* construyeron andamios de policaprolactona (PCL), los cuales fueron modificados con un péptido bioactivo con el fin de favorecer la adhesión celular; ya que, a pesar de que los polímeros sintéticos como la PCL, son biocompatibles y duraderos, no presentan motivos de señalización específicos que promuevan el anclaje por parte de las células cultivadas. Por ello, en este trabajo se decidió utilizar un polímero natural que estuviera presente en el cerebro de mamíferos, y así presentara las condiciones para favorecer una adhesión celular.

Existen muchos reportes de la obtención de células de linaje neural cultivadas en andamios de nanofibras, sin embargo, la mayoría de ellos son realizados con polímeros sintéticos, lo cual, como ya se mencionó, podría afectar en la adhesión celular. En este sentido, este trabajo propuso la elaboración de un andamio construido con AH, un componente clave de la matriz extracelular del cerebro

(Toole, 2004), que proporcionará resultados similares a los reportados de andamios de PCL modificados.

Con los resultados obtenidos se demostró que es posible electrohilar polímeros orgánicos como el ácido hialurónico, el cual se presenta como una mejor alternativa para la fabricación de andamios para cultivo celular; ya que, por sus propiedades físicas y químicas favorece la adhesión y diferenciación celular.

Cómo perspectivas, se plantea producir nanofibras de ácido hialurónico:gelatina de un menor diámetro, esto con el objetivo de conseguir pruebas de inmunocitoquímica más claras. También se propone elaborar andamios de un mayor grosor (más capas de nanofibras) que permita obtener cultivos con un mayor número de células y que a la vez permita una manipulación más sencilla, pensando en un futuro posible injerto en un modelo animal.

9. CONCLUSIONES

- Fue posible la fabricación de nanofibras constituidas por gelatina y ácido hialurónico a través de la técnica de electrohilado.
- Se logro la diferenciación neural de las células troncales embrionarias de ratón (con una baja eficiencia), cultivadas sobre un andamio constituido de nanofibras de ácido hialurónico y gelatina.
- Mediante microscopia óptica, fue apreciable un cambio parcial en la morfología de las células que fueron sometidas a la diferenciación neural.
- La prueba de inmunocitoquímica para identificar la presencia de β III-tubulina, en la diferenciación realizada en los andamios, fue poco apreciable debido a la autofluorescencia de las nanofibras.
- Mediante imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido fue posible apreciar la aparente morfología de neuronas obtenidas a partir de CTER.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandtlow, C. E. y Zimmermann, D. R. 2000. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* 80, 1267–1290.
- Baron, V. y Schwartz, M. 2000. Cell adhesion regulates ubiquitin-mediated degradation of the platelet-derived growth factor receptor beta. *Journal of Biological Chemistry* 275 39318–39323.
- Barros, C. S., Franco, S. J. y Müller, U. 2011. Extracellular matrix: functions in the nervous system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Bibel, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K. L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M. y Barde, Y.A. 2004. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neural lineage. *Nature Neuroscience*, Vol.7, número 9, 1003-1009.
- Brenner, E.K., Schiffman, J.D., Thompson, L.J., Toth y C.L., Schauer. 2012. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 87, Issue 1, pp. 926-929.
- Buckler, L. 2011. Opportunities in regenerative medicine. *Bioprocess*, 14–18.
- Caswell, P.T., Vadrevu, S., Norman, J.C. 2009. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 843–853.
- Chiquet-Ehrismann, R. y Tucker, R. P. 2011. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Dankers, P.Y., Harmsen, M.C., Brouwer, L.A., Van Luyn, M.J. Y E. W., Meijer. 2005. A modular and supramolecular approach to bioactive scaffolds for tissue engineering. *Nature Mater.* 4, 568.
- Deepa, S.S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., Sugahara, K. y Fawcett, J. W. 2006. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 281, 17789–17800.
- Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Hirvonen, J.K., Beck, T.N.C. 2001. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*; 42:8163–70.
- Dewan, A.K., Gibson, M.A., Elisseeff, J.H. y Trice, M.E. 2014. Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *BioMed Res Int* 2014:272481.

- Doshi, J. y D. H. Reneker. 1995. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostatics*, 35(2-3):151– 60.
- Fang, X. y D.H. Reneker. 2006. DNA fibers by electrospinning. *Journal of Macromolecular Sci-Phys*; B36:169–73.
- Frischknecht, R. y Gundelfinger, E. D. 2012. The brain's extracellular matrix and its role in synaptic plasticity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 153–171.
- Gage, F. H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438.
- Goel, H.L., Breen, M., Zhang, J., Das, I., Aznavoorian-Cheshire, S., Greenberg, N.M., Elgavish, A. y Languino, L.R. 2005. Beta1A integrin expression is required for type 1 insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts. *Cancer Research* 65 6692–6700.
- Howell, M. D. y Gottschall, P. E. 2012. Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience* 217, 6–18.
- Huskisson, E. C. y Donnelly, S. 1999. Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Rheumatology*, 38(7), 602–607.
- Hwang, D.Y. 2011. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Protocols, Springer Protocols Handbooks*.
- Jaklenec, A., Stamp, A., Deweerd, E., Sherwin, A. y Langer, R. 2012. Progress in the tissue engineering and stem cell industry “are we there yet?”. *Tissue Eng. Part. B Rev.* Jun;18(3):155-66.
- Ji, Y., Gosh, K., Shu, X.Z., Li, B., Sokolov, J.C., Prestwich, G.D., Clark, R.A.F. y Rafailovich, M.H. 2006. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*, 27, 3782–3792.
- Kabiri, M., Soleimani, M., Shabani, I., Futrega, K., Ghaemi, N., Ahvaz, H.H., Elahi, E. y Doran, M.R. 2012. Neural differentiation of mouse embryonic on conductive nanofiber scaffolds. *Biotechnol Lett*, 34:1357–1365.

- Kim, H.W., Song, J.H. y H. E. Kim. 2005. Nanofiber Generation of Gelatin–Hydroxyapatite Biomimetics for Guided Tissue Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* 15, 1988.
- Kumar, S. y N.P. Singh. 2006. Stem cells: a new paradigm. *Indian Journal of Human Genetics.* Vol. 12. Issue 1.
- Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S. y Yong, V. W. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nature Rev. Neurosci.* 14, 722–729.
- Lavik. E, y Langer R. 2004. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004; 65: 1–8.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., y McKay, R.D. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature-Biotechnology*, Vol. 18, 675-679.
- Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Weiss, A.S. y P. I. Lelkes. 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 5999.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., Chan, R.J. 2005. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood.*105: 635-7.
- Lim, S.H., Liu, X.Y., Song, H., Yarema, K. J. y Mao, H.Q. 2010. The effect of nanofiber-guided cell alignment on the preferential differentiation of neural stem cells. *Biomaterials* 31, 9031-9039.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. y Werb, Z. 2011. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Mahairaki, V., Lim, S., Christopherson, G., Xu, L., Nasonkin, I., Yu, C., Mao, H.Q. y Koliatsos, V. 2011. Nanofiber Matrices Promote the Neuronal Differentiation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors In Vitro. 0 Part A. 17.

- Mathieu, M.E., Saucourt, C., Mournetas, V., Gauthereau, X., Thézé, N., Praloran, V., Thiébaud, P., Boeuf, H. 2012. LIF-Dependent Signaling: New Pieces in the Lego. *Stem Cell Rev.* 8: 1-15.
- Mathieu, M.E., Faucheux, C., Saucourt, C., Soulet, F., Gauthereau, X., Fédou, S., Trouillas, M., Thézé, N., Thiébaud, P., Boeuf, H. 2013. MRAS GTPase is a novel stemness marker that impacts mouse embryonic stem cell plasticity and *Xenopus* embryonic cell fate. *Development.* 140: 3311-22.
- Mecham, R. P. 2012. Overview of extracellular matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 10, Unit 10.1.
- Naba, A. 2012. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol. Cell. Proteomics.* 11, M111.014647.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., Adachi, K. 2009. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature.* 460: 118-22.
- Pacak, C.A., MacKay, A.A. y Cowan, D.B. 2014. An improved method for the preparation of type I collagen from skin. *J. Vis. Exp.* e51011.
- Papapetrou, E.P., Tomishima, M.J., Chambers, S.M., Mica, Y., Reed, E., Menon, J., Tabar, V., Mo, Q., Studer, L., Sadelain, M. 2009. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 12759-64.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Lim, T. C. y Ma, Z. 2005. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers.* Singapore: World Scientific.
- Rowe, R. G. y Weiss, S. J. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 18, 560–574.
- Ruoslahti, E. 1996. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 6, 489–492.
- Schaefer, L. y Schaefer, R. M. 2010. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 339, 237–246.
- Schwartz, N. B. y Domowicz, M. 2004. Proteoglycans in brain development. *Glycoconj. J.* 21, 329–341.

- Silantjeva, E. A., Nasir, W., Carpenter, J., Manahan, O., Becker, M.L. y Willits, R.K. 2018. Accelerated neural differentiation of mouse embryonic stem cells on aligned GYIGSR-functionalizednanofibers. *Acta Biomaterialia*
- Stemple, D. L. y D.J. Anderson. 1992. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71, 973–985.
- Svenja, H., Shannon, L. L. y Schenke-Layland, K. 2016. ECM and ECM-like materials-biomaterials applications in regenerative medicine and cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 260-269.
- Taylor GI. 1969. Electrically driven jets. *Proc R Soc London, Ser A*;313:453–75.
- Temple, S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature*. Vol. 414.
- Teo, W.E. y S. Ramakrishna. 2006. Review on Electrospinning Design and Nanofiber Assemblies. *Nanotechnology*. 17, R89.
- Tharmalingam, T., Sunley, K., Spearman, M. y Butler, M. 2011. Enhanced production of human recombinant proteins from CHO cells grown to high densities in macroporous microcarriers, *Mol. Biotechnol.* 49 (2011) 263–276.
- Trouillas, M., Saucourt, C., Guillotin, B., Gauthereau, X., Taupin, J.L., Moreau, J.F., Boeuf, H. 2009a. The LIF cytokine: towards adulthood. *Eur Cytokine Netw* 2009; 20: 51-62.
- Trouillas, M., Saucourt, C., Guillotin, B., Gauthereau, X., Ding, L., Buchholz, F., Doss, M.X., Sachinidis, A., Hescheler, J., Hummel, O., Huebner, N., Kolde, R., Vilo, J., Schulz, H., Boeuf, H. 2009b. Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC Genomics*. 10: 73.
- Um, I. C., Fang, D.; Hsiao, B. S., Okamoto, A. y Chu, B. 2004. Electrospinning and Electro-blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules*, 5, 1428–1436.
- Ura, H., Usuda, M., Kinoshita, K., Sun, C., Mori, K., Akagi, T., Matsuda, T., Koide, H., Yokota, T. 2008. STAT3 and Oct-3/4 control histone modification through induction of Eed in embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 283: 9713-23.
- Ura, H., Murakami, K., Akagi, T., Kinoshita, K., Yamaguchi, S., Masui, S., Niwa, H., Koide, H., Yokota, T. 2011. Eed/Sox2 regulatory loop controls ES cell self-renewal through histone methylation and acetylation. *Embo Journal*; 30: 2190-204.

- Wichterle, H. y Peljto, M. 2008. Differentiation of mouse embryonic stem cells to spinal motor neurons. *Current Protocols in Stem Cell Biology* 1H.1.1-1H.1.9
- Wobus, A. M. y K. R. Boheler. 2005. Embryonic Stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85: 635–678.
- Wnek, G.E., Carr, M.E., Simpson, D.G. y G. L. Bowlin. 2003. Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures. *Nano Lett.* 3,213.
- Xie, J., Willerth, S.M., Li, X., Macewan, M.R., Rader, A., Sakiyama-Elbert, S.E. y Younan Xia, Y. 2009. The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. *Biomaterials*, 30, 354–362.
- Yamaguchi, Y. 2000. Leticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 276–289.
- Yeo, G.C., Aghaei-Ghareh-Bolagh, B., Brackenreg, E.P., Hiob, M.A., Lee, P. y Weiss, A.S. 2015 Fabricated elastin, *Adv. Healthcare Mater.*
- Yu, W.H., Woessner, J.F. Jr., McNeish, D. y Stamenkovic, I. 2002. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes and Development* 16, 307–323.
- Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki and S. Ramakrishna. 2003. A review on polymer nanofibers by electro-spinning applications in nanocomposites, *Composites Sci. Tech.*, 63, 2223-2253.