



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Crecimiento volumétrico de células de músculo esquelético y motoneuronas de ratón en fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

Tesis que para obtener el grado en:

Doctora en Ciencias
(Ingeniería Biomédica)

Presenta:

M. en C. Esmeralda Sarai Zuñiga Aguilar

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González _____

Dr. Rafael Godínez Fernández _____

El jurado designado por la Comisión de Posgrado en Ingeniería Biomédica de la Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis que presentó:



M. en C. Esmeralda SaraiZuñiga Aguilar

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

El día 06 de noviembre de 2014

Jurado:

Presidente: Reyna Carmen Fierro Pastrana

Secretario: José Rafael Godínez Fernández

Vocal: María Cristina Velasquillo Martínez

Vocal: Gertrudis Hortensia González Gómez

Vocal: Mario García Lorenzana

Asesores:

Dr. Roberto Olayo González

Dr. Rafael Godínez Fernández

Índice

| | |
|---|-----------|
| Índice de figuras..... | 5 |
| Glosario de abreviaturas..... | 7 |
| Resumen..... | 8 |
| Introducción..... | 10 |
| Justificación..... | 11 |
| Objetivo general..... | 12 |
| Objetivos particulares..... | 12 |
| Antecedentes..... | 13 |
| - El sistema nervioso..... | 13 |
| - Estructura del sistema nervioso central..... | 14 |
| - Clasificación de las neuronas..... | 16 |
| - Estudio de la fibra nerviosa o axón..... | 16 |
| - Transmisión eléctrica celular..... | 18 |
| - Organización celular del músculo esquelético..... | 20 |
| - Estructura del músculo esquelético..... | 21 |
| - Ultraestructura del músculo esquelético..... | 22 |
| - Mecanismos moleculares de contracción..... | 24 |
| - Acoplamiento excitación – contracción..... | 26 |
| - Electrofisiología celular..... | 28 |
| - Técnicas de registro celular..... | 30 |
| - Cultivos celulares bidimensionales (2D)..... | 30 |
| - Cultivos celulares tridimensionales (3D)..... | 32 |
| - Polimerización por plasma..... | 34 |
| METODOLOGÍA..... | 36 |
| - Polimerización por Plasma y FT-IR..... | 36 |
| - Cultivos Celulares Primarios..... | 37 |
| - Células de músculo esquelético de ratón..... | 37 |
| - Obtención de los modelos celulares de motoneuronas..... | 39 |
| - Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a motoneuronas..... | 40 |
| - Obtención de células nerviosa de ratón..... | 40 |
| - Purificación de Motoneuronas..... | 41 |
| - Cocultivos celulares..... | 42 |
| - Técnicas de Inmunofluorescencia celular..... | 43 |
| - Células musculares en cajas de cultivo y cubreobjetos recubiertos con PPy..... | 43 |
| - Células nerviosas y motoneuronas de ratón en Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy..... | 43 |
| - Cocultivo celular..... | 43 |
| - Electrofisiología celular..... | 44 |
| - Células musculares de ratón..... | 44 |
| - Células nerviosas y motoneuronas de ratón..... | 44 |
| - Conductancias celulares (gNa ⁺ , gK ⁺)..... | 45 |
| - Camas de fibras de PLA por electrohilado..... | 45 |
| - Sembrado celular en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| - Sembrado de células musculares de ratón..... | 46 |
| - Sembrado de motoneuronas de la médula espinal de ratón..... | 46 |
| - Inmunofluorescencia celular..... | 47 |
| - Células musculares en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy.... | 47 |
| - Motoneuronas en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy | 47 |
| - Electrofisiología celular..... | 47 |
| Resultados y discusión (Células de músculo esquelético)..... | 49 |
| - Polimerización por plasma y FT-IR..... | 49 |
| - Cultivos celulares primarios de células de músculo esquelético de ratón..... | 50 |
| - Sembrado sobre cajas de cultivo y cubreobjetos recubiertos con PPy | 50 |
| - Crecimiento Alineado de células musculares primarias..... | 52 |
| - Técnicas de inmunofluorescencia celular..... | 53 |
| - Células musculares en cajas de cultivo y cubreobjetos recubiertos con PPy | 53 |
| - Electrofisiología Celular | 54 |
| - Células musculares de ratón | 54 |
| - Sembrado celular en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy | 55 |
| - Sembrado de células musculares de ratón..... | 55 |
| - Inmunofluorescencia celular | 56 |
| - Células musculares en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy ... | 56 |
| Resultados y discusión (Células troncales embrionarias, células nerviosas y motoneuronas)..... | 58 |
| - Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a motoneuronas | 58 |
| - Cultivos celulares nerviosos y de motoneuronas..... | 60 |
| - Obtención de células nerviosa de ratón | 60 |
| - Sembrado sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy. | 61 |
| - Purificación de motoneuronas..... | 62 |
| - Sembrado sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy. | 62 |
| - Técnicas de Inmunofluorescencia celular..... | 64 |
| - Células nerviosas de la médula espinal..... | 64 |
| - Motoneuronas purificadas de la médula espinal de ratón..... | 65 |
| - Viabilidad celular de las células nerviosas sembradas sobre Poli-DL-Ornitina y PPy..... | 66 |
| - Electrofisiología celular..... | 67 |
| - Propiedades pasivas de las células nerviosas de médula espinal..... | 67 |
| - Potenciales de acción de las células nerviosas de la médula espinal..... | 68 |
| - Células nerviosas de médula espinal sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina | 69 |
| - Células nerviosas de médula espinal sobre PPy..... | 71 |
| - Conductancias de Na ⁺ (gNa ⁺) y K ⁺ (gK ⁺)..... | 72 |
| - Motoneuronas sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy | 76 |
| - Sembrado de motoneuronas de la médula espinal de ratón camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy..... | 79 |
| - Inmunofluorescencia celular..... | 79 |
| - Motoneuronas en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy..... | 79 |
| - Electrofisiología celular de motoneuronas en camas electrohiladas de PLA y PLA-PPy..... | 82 |

| | |
|--|----|
| - Cocutivos Celulares | 83 |
| - Inmunofluorescencia de los Cocutivos celulares | 84 |
| Conclusiones y perspectivas..... | 88 |
| Apendice. Diagrama de flujo de la metodologia empleada | 90 |
| Referencias..... | 91 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1 Morfología de una motoneurona..... | 18 |
| Fig. 2 Síntesis del Ach..... | 19 |
| Fig. 3 Proceso de transmisión sináptica..... | 19 |
| Fig. 4 Organización de las fibras musculares esqueléticas en un músculo que está unido al hueso por los tendones..... | 21 |
| Fig. 5 Disposición de los filamentos de una fibra del músculo esquelético que produce el patrón estriado de bandas..... | 23 |
| Fig. 6 Puentes cruzados en los filamentos gruesos se unen a la actina en los filamentos delgados sometándose a un cambio conformacional que impulsa a los filamentos delgados hacia el sarcómero..... | 25 |
| Fig. 7 Retículo sarcoplasmático y Túbulos transversos..... | 27 |
| Fig. 8 Configuración del reactor de plasma..... | 36 |
| Fig. 9 Aplicación de líneas de silicón sobre cajas para cultivo celular..... | 39 |
| Fig.10 Sembrado de las células entre los rieles de silicón..... | 39 |
| Fig. 11 Disección de la médula espinal de embriones de ratón..... | 41 |
| Fig.12 Polimerización por plasma y materiales polimerizados..... | 49 |
| Fig.13 Espectro de transmisión por FT-IR del PPy..... | 49 |
| Fig.14 Disección de tejido muscular de las extremidades superiores e inferiores de ratones neonatos de la cepa CD-1..... | 50 |
| Fig.15 Cultivo primario de músculo esquelético de ratón..... | 51 |
| Fig.16 Mioblastos y miotubos primarios de ratón en Poli-DL-Ornitina/Laminina..... | 51 |
| Fig. 17 Miotubos de ratón en superficies de PPy..... | 52 |
| Fig. 18 Células de músculo esquelético alineadas por rieles de silicón..... | 53 |
| Fig. 19 Células de músculo esquelético de ratón en microscopía de fluorescencia..... | 54 |
| Fig. 20 Potenciales de acción lentos en células musculares..... | 55 |
| Fig. 21 Camas electrohiladas de PLA..... | 55 |
| Fig. 22 Células de músculo esquelético sembradas en fibras de PLA y en PLA-PPy..... | 56 |
| Fig. 23 Microscopía confocal del crecimiento de células de músculo esquelético en fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy..... | 57 |
| Fig. 24 Aglomerados celulares de células troncales embrionarias..... | 58 |
| Fig. 25 Cuerpos embrionarios en suspensión..... | 59 |
| Fig. 26 Motoneuronas con 3 días de diferenciación sobre Matrigel y en PPy..... | 59 |
| Fig. 27 Motoneuronas GFP ⁺ derivadas de células troncales embrionarias en Matrigel y en PPy..... | 60 |
| Fig. 28 Disgregación mecánica y química de la médula espinal de ratón..... | 61 |
| Fig. 29 Células nerviosas obtenidas de la medula espinal de ratón..... | 62 |
| Fig. 30 Motoneuronas purificadas sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina y en PPy..... | 63 |
| Fig. 31 Células nerviosas de la médula espinal de ratón en microscopía de fluorescencia..... | 64 |
| Fig. 32 Motoneuronas purificadas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina y en PPy en microscopía de fluorescencia..... | 65 |
| Fig. 33 Marcaje y cuantificación de la viabilidad celular de células nerviosas..... | 66 |
| Fig. 34 Potenciales de acción de células nerviosas de la médula espinal sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy..... | 69 |

| | |
|---|----|
| Fig. 35 Corrientes iónicas normalizadas de Na ⁺ y K ⁺ de células nerviosas de la médula espinal de ratón en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina..... | 71 |
| Fig. 36 Corrientes iónicas de Na ⁺ y K ⁺ en células nerviosas de la médula espinal de ratón sembradas en PPy..... | 72 |
| Fig. 37 Corrientes de Na ⁺ bloqueadas por TTX..... | 73 |
| Fig. 38 Análisis comparativo de las conductancias de Na ⁺ y K ⁺ a los 3 días de cultivo sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y con PPy..... | 75 |
| Fig. 39 Análisis comparativo de las conductancias de Na ⁺ y K ⁺ a los 8 días de cultivo de células nerviosas de la médula espinal sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y con PPy..... | 75 |
| Fig. 40 Análisis comparativo de las conductancias de Na ⁺ y K ⁺ a los 21 días de cultivo de células nerviosas de la médula espinal sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y con PPy..... | 76 |
| Fig. 41 Conductancias promedio de células nerviosas de la médula espinal de ratón sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy..... | 77 |
| Fig. 42 Corrientes de Na ⁺ y K ⁺ de motoneuronas purificadas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina..... | 77 |
| Fig. 43 Corrientes iónicas de Na ⁺ y K ⁺ de motoneuronas purificadas sembradas en PPy..... | 78 |
| Fig. 44 Potenciales de acción en motoneuronas sembradas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina y en PPy..... | 79 |
| Fig. 45 Motoneuronas sembradas en fibras electrohiladas de PLA y en PLA-PPy..... | 79 |
| Fig. 46 Motoneuronas sembradas en fibras de PLA y en PLA-PPy..... | 81 |
| Fig. 47 Microfotografía del registro celular, trazos de las corrientes iónicas de Na ⁺ y K ⁺ y potenciales de acción de motoneuronas sembradas en PLA..... | 82 |
| Fig. 48 Microfotografía del registro celular, trazos de las corrientes iónicas de Na ⁺ y K ⁺ y potenciales de acción de motoneuronas sembradas en PLA-PPy..... | 83 |
| Fig. 49 Cocultivo celular en Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy..... | 84 |
| Fig. 50 Cocultivos celulares vistos por microscopia de fluorescencia en Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy..... | 85 |
| Fig. 51 Cocultivos con doble marcaje celular en los dos diferentes tipos de superficies de crecimiento..... | 86 |

Glosario de Abreviaturas

Anti-Anti- Antibiótico-Antimicótico
ATP- Adenosín Trifosfato
bFGF- Factor de crecimiento para Fibroblasto
CNTF- Factor Neurotrófico Ciliar
ECM- Matriz extracelular
FITC- Isotiocianato de Fluoresceína
FT-IR- Infrarrojo por Transformada de Fourier
GFP- Proteína Verde Fluorescente
HA- Ácido Hialurónico
HBSS- Solución Salina Balanceada Hans
KBr- Bromuro de Potasio
LIF- Factor Inhibitorio de Leucemia
NBCS- Suero de Becerro Recién Nacido
PBS- Solución de Buffer de Potasio
PCL- Poli- ϵ -caprolactona
PLA- Ácido Poli-Láctico
PLGA- Acido Poli-Glicólico-Láctico
PLLA- Acido Poli-L-Láctico
PPy- Poli-Pirrol por Plasma
RA- Ácido Retinoico
SHH- Sonic Hedgehog
Syn- Sinaptofisina
TTX- Tetrodo toxina
VChat- Transportadores Vesiculares de Acetilcolina

Resumen

El objetivo de este trabajo es el crecimiento volumétrico de células de músculo esquelético y motoneuronas primarias de ratón, sobre camas de fibras electrohiladas recubiertas con Poli-Pirrol por Plasma (PPy). Se realizaron diferentes técnicas para la obtención de células musculares y de motoneuronas de ratón. Las células de músculo esquelético se obtuvieron de las extremidades de neonatos de ratón, éstas fueron sometidas a procesos de purificación de fibroblastos para la obtención exclusiva de mioblastos. Una vez obtenidos los mioblastos, se diferenciaron hacia miotubos. Se realizaron ensayos de alineación y crecimiento de células musculares, utilizando rieles de silicón sobre cajas de cultivo y cubreobjetos tratados con PPy, obteniéndose en ambos casos un crecimiento celular alineado y la formación de miotubos después de la diferenciación celular. Al realizar pruebas electrofisiológicas y morfológicas, se obtuvieron en ambas superficies de cultivo, corrientes iónicas y potenciales de acción. Se observó por inmunofluorescencia la presencia de miosina en los miotubos.

Se realizaron tres protocolos para la obtención de un adecuado modelo de motoneurona. El primero fue la diferenciación de células troncales de ratón hacia motoneuronas utilizando Matrigel y PPy como superficies de cultivo y diferenciación, siendo una técnica larga y complicada, en donde solo se llegó a obtener un 16% de células completamente diferenciadas; en ambas superficies se presentaron las mismas tasas de diferenciación y de supervivencia. El segundo protocolo, fue la obtención de células nerviosas de la médula espinal de ratón, las células fueron sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina y en PPy. En este protocolo se obtuvo un cultivo de diferentes tipos celulares, pero las condiciones de cultivo se realizaron para la supervivencia en específico de motoneuronas. Se realizaron pruebas electrofisiológicas, morfológicas y de viabilidad, presentándose una ventaja muy clara en los cultivos de células nerviosas sembradas en PPy en donde las células se mantuvieron en adecuadas condiciones fisiológicas hasta por 21 días.

El tercer protocolo fue el de purificación de motoneuronas, el cual nos permitió obtener motoneuronas que crecieron sobre cajas tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre cubreobjetos polimerizados sobre PPy. Se obtuvo un adecuado crecimiento celular en ambas superficies, al realizar las pruebas electrofisiológicas y morfológicas se obtuvieron corrientes iónicas y potenciales de acción. Se observó por inmunofluorescencia la presencia de transportadores vesiculares de acetilcolina, proteína exclusiva de motoneuronas. Se realizó el cocultivo celular de miotubos y motoneuronas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy, se observó por inmunofluorescencia la formación de sinapsis neuromuscular al marcar la placa neuromuscular con alfa-bungarotoxina. Por lo que este fue el protocolo utilizado para la realización de los crecimientos volumétricos de motoneuronas, debido a la facilidad de obtención de un cultivo homogéneo de motoneuronas que presentan todas las características fisiológicas reportadas en la literatura

Una vez obtenidos los modelos celulares adecuados, se prosiguió a realizar el crecimiento volumétrico celular. Se utilizaron camas de fibras alineadas de PLA, fabricadas por la

técnica de electrohilado, polimerizadas y sin polimerizar por PPy. Las fibras electrohiladas sirvieron como superficie de crecimiento celular para ambos tipos celulares, permitiendo el crecimiento volumétrico de mioblastos diferenciados a miotubos y de motoneuronas. Las pruebas electrofisiológicas en el crecimiento 3D de motoneuronas, revelaron la presencia de actividad eléctrica en las motoneuronas. Las pruebas morfológicas por inmunofluorescencia en ambos cultivos tridimensionales de músculo y motoneuronas, mostraron el anclaje y crecimiento celular sobre las fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy, así como la presencia de proteínas específicas, como de miosina en células musculares y de transportadores vesiculares de acetilcolina en motoneuronas.

El uso de PPy en el cultivo bidimensional y tridimensional no altera las características propias de las células. Éste permite el crecimiento y diferenciación celular, ayudando a las células a tener un mejor anclaje y por la tanto, en algunos casos promueve el tiempo de vida de las células en cultivo, lo cual no altera sus propiedades eléctricas, morfológicas, de síntesis de proteínas y de neurotransmisores.

Introducción

La importancia en el desarrollo de los andamios y los modelos de cultivo celular en 3D está aumentando cada vez más, siendo el cultivo 3D el punto de enlace para la formación y regeneración de órganos. Un cultivo celular 3D en comparación con el cultivo de células de 2D simula con más precisión la morfología normal de las células, la proliferación, diferenciación y migraciones. Un cambio creciente en la investigación se está produciendo, donde los sistemas de cultivo de células 3D están sustituyendo los sistemas de cultivo de células de 2D y son una alternativa a los ensayos *in vivo* [1, 2].

Las células en los tejidos están en un entorno tridimensional que tiene señales características tanto biofísicas como biomecánicas. Las señales biofísicas incrustadas en la matriz tridimensional, influyen en las funciones de la célula como la migración, adhesión, proliferación y la expresión de genes [3-6]. Además se ha demostrado que ciertos procesos celulares relacionados con la diferenciación y la morfogénesis se producen preferentemente en un cultivo 3D en lugar del común cultivo 2D [7, 8].

El cultivo 3D ofrece muchas ventajas sobre un cultivo 2D, por ejemplo que los sistemas de cultivo 3D se pueden realizar utilizando métodos fáciles para el modelado del microambiente celular. Los modelos de cultivos tridimensionales se pueden agrupar principalmente en el estudio de órganos completos y cultivos de explantes organotípicos (incluyendo embriones), esferoides celulares, cultivos microacarreadores, modelos de estudio en ingeniería de tejidos para la formación o reemplazo de órganos y tejidos, modelos de estudio de enfermedades por modelado celular de los diferentes estados de la enfermedad, así como en el estudio de la dosificación de fármacos [8-14].

Para estos crecimientos volumétricos se utilizan las matrices conocidas como andamios, los cuales fueron introducidos para superar las limitaciones de una superficie bidimensional. Los andamios pueden ser sintetizados para apoyar el crecimiento de células en 3D, utilizando factores de crecimiento o recubrimientos superficiales con proteínas que mejoren el anclaje celular [15-19].

Por lo que en la realización de este proyecto se buscará desarrollar modelos de crecimiento celular tridimensional, en particular de células de músculo esquelético y motoneuronas. Se hará uso de estas técnicas de crecimiento celular tridimensional, utilizando un mismo tipo de andamio, que brinde un adecuado soporte de crecimiento tridimensional para las células, permitiendo conservar sus propiedades morfológicas, electrofisiológicas y de síntesis de proteínas.

Justificación

El cultivo de células en dos dimensiones ha sido una técnica utilizada de forma rutinaria y con diligencia llevada a cabo en miles de laboratorios en todo el mundo durante las últimas cuatro décadas. Sin embargo, el cultivo de células en dos dimensiones es posiblemente una técnica que no reproduce por completo la anatomía o la fisiología de un tejido, pero que ha dado el punto de partida para la realización de múltiples desarrollos científicos en diferentes campos. Al entrar en la tercera dimensión, se deben tener en cuenta diferentes variables, como el diseño de los andamios para el apoyo a la organización de las células o bien, la obtención de los adecuados modelos celulares que representen mejor al tejido que se desea diseñar. Por lo que este trabajo se dedicará al estudio de la obtención de los modelos celulares de músculo esquelético y de motoneuronas adecuados, que puedan ser empleadas en el desarrollo de modelos de crecimiento volumétrico, sobre camas de fibras alineadas de Acido Poli-Láctico (PLA) electrohiladas y modificadas por la técnica de polimerización por plasma con Pirrol (PPy). Estos modelos de estudio pueden dar la pauta para el comienzo de modelos de estudio más complejos, de uso directo en la ingeniería de tejidos, y medicina regenerativa.

Objetivo general

Realizar el crecimiento volumétrico de células de músculo esquelético y de motoneuronas sobre camas electrohiladas de PLA, y PLA recubiertas superficialmente con Poli-Pirrol Plasma (PLA-PPy).

Objetivos particulares

- Obtención de los modelos celulares de músculo esquelético y de motoneuronas.
- Crecimiento bidimensional de las células de músculo esquelético y de motoneuronas sobre cajas de cultivo y en Poli-Pirrol Plasma (PPy)
- Alineación de células de músculo esquelético en cajas de cultivo y en PPy
- Sembrado del cocultivo celular bidimensional
- Pruebas morfológicas, electrofisiológicas y de inmunofluorescencia de cada uno de los cultivos
- Selección de los andamios para el crecimiento volumétrico de células de músculo esquelético y de motoneuronas
- Sembrado de las células musculares en fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy
- Sembrado de motoneuronas en fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy
- Pruebas morfológicas, electrofisiológicas y de inmunofluorescencia de los crecimientos tridimensionales musculares y de motoneuronas

Antecedentes

El sistema nervioso es el encargado de llevar a cabo la mayoría de las funciones de control y coordinación de actividades en los organismos superiores. En su nivel de actuación más simple, está encargado de regular el medio interno, controlando las respuestas autónomas y endocrinas. En un nivel más complejo, es el responsable de realizar la comunicación con el medio externo, a través de las funciones sensoriales y motoras; en el hombre es la base de la conciencia, el pensamiento, la memoria y el resto de funciones superiores o comportamiento cognitivo.

El sistema nervioso se distribuye en distintas subdivisiones, estas parcelas no resultan excluyentes entre sí, sino que su descripción se realiza según distintos criterios:

a) Según la posición en el organismo

Sistema Nervioso Central o Neuroeje. Es el centro estructural y funcional de todo el sistema nervioso. Está formado por el encéfalo y la médula espinal. Desde el punto de vista celular en esta división sólo se incluyen los elementos celulares que están íntegramente situados en estas zonas. El encéfalo está formado por cinco regiones provenientes de las vesículas encefálicas embrionarias: Mielencéfalo (Bulbo raquídeo), Metencéfalo (Protuberancia y cerebelo), Mesencéfalo (Mesencéfalo), Diencefalo (Tálamo e hipotálamo) y Telencéfalo (Ganglios basales y corteza cerebral). La médula espinal es la parte más caudal del sistema nervioso central. Se subdivide en las regiones cervical, torácica, lumbar y sacra.

Sistema Nervioso Periférico. Está formado por grupos de neuronas denominados ganglios y nervios periféricos. Según su punto de origen existen doce pares de nervios craneales, provenientes del encéfalo; y 31 pares de nervios raquídeos, procedentes de la médula espinal. Estos nervios procedentes del sistema nervioso central se extienden como una red por todo el organismo.

b) Según la función

Sistema Nervioso Somático. Realiza el control de las funciones voluntarias, las que permiten al organismo su relación con el medio externo.

Sistema Nervioso Autónomo o Vegetativo. Realiza el control de las funciones involuntarias que permiten la regulación del medio interno, o la adecuación del medio interno frente a estímulos medioambientales.

Desde el punto de vista funcional, el sistema nervioso central presenta una organización jerarquizada donde la médula sería el nivel más inferior o 1er nivel, en ella se desarrollan los procesos más simples de control; en un 2º nivel o nivel intermedio se situaría el tronco, el cerebelo y el diencefalo con tareas más complejas, y el 3er nivel, o nivel superior correspondería al telencéfalo [20, 21].

Estructura del sistema nervioso central

Médula espinal

Alojada en el conducto vertebral se extiende desde el agujero occipital hasta la primera vértebra lumbar. Presenta una estructura segmentada, y lateralmente en cada segmento, se proyectan las raíces dorsales y ventrales. A través de las raíces dorsales se produce la entrada de información de los receptores sensoriales del tronco y extremidades; por las raíces ventrales sale información hacia los órganos efectores. Si se observa una sección transversal en cualquiera de sus segmentos, puede verse una región central en forma de mariposa de sustancia gris y contorneándola una región de sustancia blanca.

La sustancia gris contiene somas de neuronas y la sustancia blanca está formada por haces ascendentes y descendentes de fibras nerviosas, vías de conducción de dos direcciones que conectan el encéfalo con diferentes segmentos medulares.

A nivel medular se inicia el procesamiento de la información sensorial y se establecen circuitos para realizar muchos reflejos que son la base de la postura y del movimiento [20, 21].

Tipos de células en el Sistema Nervioso

Las unidades celulares funcionales del sistema nervioso son las neuronas, las cuales forman la red de comunicación que es la arquitectura básica para el funcionamiento de este sistema. Se estima que en el sistema nervioso de un adulto joven existen unos 100,000 millones de neuronas y esta cantidad tan sólo corresponde al 10 % de las células que lo componen. El 90 % restante, aproximadamente la mitad del volumen, corresponde a las células de la glía o neuroglia (“pegamento entre las neuronas”) que forman la matriz conjuntiva de soporte de las neuronas.

Células de la glía o neuroglia

Son células que sirven como elemento de soporte tanto físico como metabólico para las neuronas. También tienen una gran importancia en el desarrollo y en los procesos de regeneración del sistema nervioso. Aunque originalmente se les adjudicó un papel meramente pasivo de almacén, las funciones de la glía han ido creciendo en importancia a lo largo de los últimos años, descubriéndose así que el correcto funcionamiento de la “parte noble” del sistema nervioso que son las neuronas, reposa en buena medida en esta segunda línea de células.

En general, son células pequeñas de prolongaciones cortas y ramificadas, y existen varios tipos:

Astrocitos. Muy frecuentes en el sistema nervioso central, presentan gran número de prolongaciones ramificadas que envuelven tanto los somas como las dendritas neuronales. Mediante estas ramificaciones forman los pies perivasculares alrededor de los capilares, formando parte de la barrera hemato-encefálica que limita el paso de

sustancias hasta las neuronas; de este modo controlan el medio ambiente de la neurona. Así, por ejemplo, pueden captar K^+ y regular su concentración extracelular.

Oligodendrocitos. Forman la vaina de mielina en el sistema nervioso central y sirven para mantener unidas las fibras nerviosas.

Células de Schwann. Forman la vaina de mielina en el sistema nervioso periférico y son el equivalente de los oligodendrocitos del sistema nervioso central. Cuando se sitúan sobre los somas neuronales se las denomina células satélite.

Microglía. Son células pequeñas y escasas con funciones defensivas, al aparecer ante un daño tisular nervioso se convierten en grandes macrófagos.

Ependimocitos o células ependimarias. Son células, algunas ciliadas, de un epitelio cúbico simple que tapizan las cavidades llenas de líquido cefalorraquídeo del sistema nervioso central.

Funciones de las células de la glía

Son elementos de soporte, que sirven también para separar e incluso aislar grupos de neuronas.

Dos tipos de células gliales sirven para formar la vaina de mielina.

Algunas actúan como basureros, recogiendo restos tras una lesión o muerte celular.

Tamponan y mantienen la concentración de potasio extracelular, algunas captan y retiran neurotransmisores en las sinapsis.

Durante el desarrollo, ciertas células gliales guían la migración de las neuronas y dirigen el crecimiento de los axones.

Ciertos tipos de células gliales participan en la construcción de la barrera hematoencefálica que previene la entrada de tóxicos de la sangre al encéfalo.

Algunas células gliales pueden participar en la nutrición de las neuronas.

Neurona

La mayoría de las neuronas tienen un cuerpo o soma donde se sitúan los principales orgánulos celulares. Los somas de las neuronas se presentan normalmente agrupados formando lo que en el sistema nervioso central se describe como sustancia gris. Estas agrupaciones presentan distintas denominaciones: núcleos, láminas, ganglios, etc. En el sistema nervioso periférico algunos somas se sitúan en ganglios (ganglios sensoriales, autónomos) y otros se encuentran distribuidos en los tejidos como la pared gastrointestinal formando el sistema entérico.

La característica más importante de la neurona es la presencia de las prolongaciones de su cuerpo celular. Existen dos tipos de prolongaciones:

a) Dendritas. Son prolongaciones numerosas, ramificadas y cortas en el sistema nervioso central, ramificadas y largas en el periférico. Constituyen un mecanismo de expansión de membrana extraordinariamente grande, en algunas neuronas representan hasta el 90 % de su superficie celular. Sobre sus membranas se sitúan una gran cantidad de receptores que van a permitir la recepción de información a manera de gran antena.

b) Axón, cilindro-eje o fibra nerviosa. Es una prolongación única que emerge en una región del soma denominada como o colina axónica. Puede presentar ramas colaterales y una arborización terminal. Su longitud es muy variable desde unas pocas micras hasta más del metro. En el sistema nervioso central las agrupaciones de axones conforman la denominada sustancia blanca [20, 21].

Clasificación de las neuronas

a) Según el punto de vista morfológico. Dependiendo del número de prolongaciones que se originan desde el soma:

Neuronas unipolares o pseudounipolares. Una única prolongación que se ramifica, para dar una rama central (se dirige hacia el SNC) y una rama periférica (se aleja del SNC). Estas dos ramas forman en conjunto un axón que conduce impulsos desde las dendritas en la terminación de la rama periférica hacia el SNC.

Neuronas bipolares. Con un axón y una dendrita, son las menos habituales.

Neuronas multipolares. Con un axón y múltiples dendritas, son las más habituales en el sistema nervioso central.

b) Según el punto de vista funcional. Dependiendo de la dirección del tránsito de información a su través:

Neuronas aferentes (sensoriales): llevan la información desde la periferia al sistema nervioso central.

Neuronas eferentes (motoras): llevan la información desde el sistema nervioso central a la periferia (Fig. 1).

Interneuronas: llevan la información de unas neuronas a otras y se sitúan exclusivamente dentro del sistema nervioso central.

Estudio de la fibra nerviosa o axón

Los axones son porciones de la neurona que en algunos casos han de atravesar distancias muy largas para llegar a sus células diana. La mayor parte de las fibras nerviosas se agrupan formando en el sistema nervioso periférico los nervios y en el central los tractos, haces o pedúnculos.

En el sistema nervioso periférico los axones van protegidos por una fina cubierta de tejido conectivo que se denomina endoneuro. Un grupo de fibras forma un haz o fascículo y va a

su vez rodeado de una segunda cubierta conectiva denominada perineuro. Por último, un conjunto de haces se agrupa con vasos sanguíneos formando un paquete vásculo-nervioso que va protegido por una tercera cubierta denominada epineuro, el cual sirve también como elemento de anclaje con los tejidos subyacentes.

Las fibras nerviosas pueden ser de dos tipos: Mielínicas, cuando poseen una cubierta protectora denominada vaina de mielina, que a modo de aislante rodea la fibra separándola del medio extracelular. Dicha cubierta está formada por la superposición de múltiples segmentos de membrana de células de la glía, dando lugar a una barrera lipídica que le aportará propiedades funcionales muy relevantes. La otra modalidad son las amielínicas que carecen de vaina de mielina.

La construcción de la vaina de mielina supone un gasto energético muy grande para el sistema nervioso. Aquellas fibras que bien por ser muy cortas, o por llevar información poco relevante o que no precisa ser procesada muy rápidamente, serán del tipo amielínico.

En el sistema nervioso central existen fibras mielínicas y fibras amielínicas. La célula de la glía responsable de la formación de la vaina es el oligodendrocito, que al disponer de múltiples prolongaciones utiliza cada una de ellas para formar la vaina de mielina alrededor de múltiples fibras (1 oligodendrocito/50 fibras). En las fibras amielínicas el oligodendrocito se sitúa alrededor de la fibra pero sin formar vaina [20, 21].

En el sistema nervioso periférico:

a) Fibras mielínicas. La célula de la glía que forma esta vaina es la célula de Schwann que puede enrollarse hasta cien veces alrededor de la fibra y construir una gruesa capa de mielina. Cada célula de Schwann sólo rodea una fibra y como las fibras pueden tener grandes longitudes, se requiere la sucesión de múltiples células de Schwann para cubrirla. Los espacios que quedan entre las células se denominan nodos de Ranvier y están situados aproximadamente cada 1-2 mm.

b) Fibras amielínicas. En este caso la célula de Schwann rodea una única vez a la fibra nerviosa y sirve para la protección de varios axones.

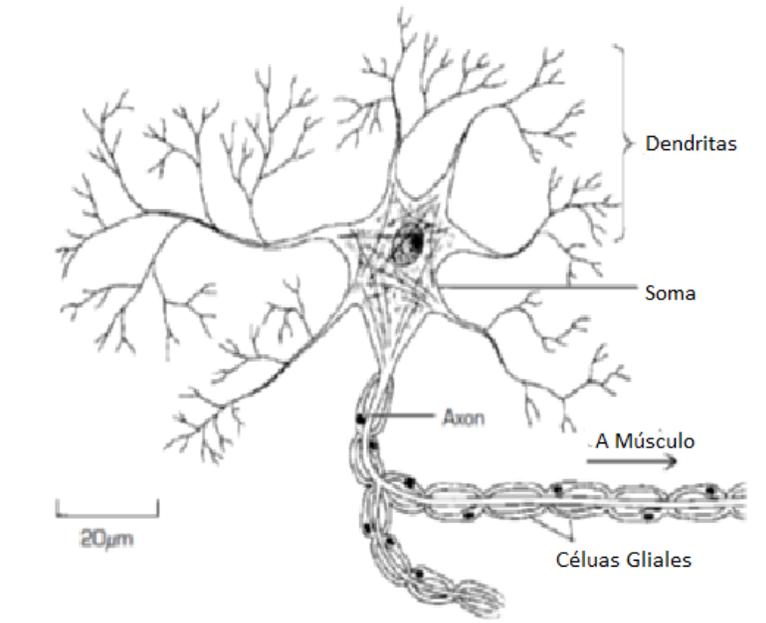


Fig. 1 Morfología de una motoneurona. Imagen tomada de Matthews G. 4th Ed., 2003.

Transmisión eléctrica celular

Para transmitir información de manera rápida a través de largas distancias, las neuronas producen señales eléctricas activas, que viajan a lo largo de los axones que forman las vías de transmisión. Surge la señal eléctrica de los cambios en la diferencia de voltaje eléctrico a través de la membrana celular, que se llama el potencial de acción.

Aunque este voltaje transmembranal es pequeño, típicamente menos de una décima parte de un voltio, es fundamental para el funcionamiento del sistema nervioso. La información es transmitida y procesada por las neuronas por medio de cambios en el potencial de membrana [20].

El punto de contacto donde se transmiten señales de una neurona a otra se llama sinapsis neuronal. En el reflejo patelar, tanto la sinapsis entre las neuronas sensoriales y la neurona motora, y la sinapsis entre la neurona motora y las células musculares son sinapsis químicas, en las que un potencial de acción en la célula de entrada (la célula pre-sináptica) hace que se libere una sustancia química, llamada neurotransmisor. Los impulsos nerviosos son transmitidos de una motoneurona a una célula muscular por medio de un transmisor químico, la acetilcolina, que es también el neurotransmisor de todas las fibras autonómicas pre-ganglionares. La acetilcolina se sintetiza en la mitocondria de la terminal nerviosa, a partir de la acetil coenzima A, y la colina en una reacción catalizada por la enzima colina o acetiltransferasa (colina acetilasa) (Fig. 2). La acetil coenzima A (Acetil CoA) es sintetizada en las mitocondrias y la colina es reciclada de la hendidura sináptica hacia la terminal nerviosa, tras la hidrólisis de la acetilcolina a colina y acetato, haciéndola disponible para la síntesis de nueva acetilcolina



Fig. 2 Síntesis del Ach

Cuando el potencial de acción que viaja por el axón de una neurona motora llega a la terminal presináptica, se produce la apertura de los canales de Ca^{2+} (operados por voltaje) y de esta manera se eleva la concentración de Ca^{2+} en la terminal nerviosa. El Ca^{2+} que entra a la terminal nerviosa se combina con la calmodulina. La calmodulina es una proteína dependiente del Ca^{2+} , esencial para el proceso de la regulación de la exocitosis de acetilcolina en la terminal nerviosa. La calmodulina interactúa con una de las proteínas íntimamente relacionadas con el proceso de exocitosis, la sinapsina I [21], que en estado desfosforilado inmoviliza las vesículas al unirse con ellas. Las sinapsinas son un grupo de proteínas de la vesícula de acetilcolina, que las une al citoplasma y evita su movilización. La fosforilación de la sinapsina I por la proteína CaM-kinasa II (dependiente del Calcio $^{2+}$ y la calmodulina), anula su afinidad por las vesículas sinápticas e induce el desplazamiento y fusión de las vesículas de acetilcolina hacia la membrana de la terminal nerviosa, produciéndose así la exocitosis de la acetilcolina hacia la hendidura sináptica; al ser captada por la célula blanco se producirá un cambio en el potencial de membrana, provocando el disparo de potenciales de acción en la célula postsináptica. Esta secuencia de eventos durante la transmisión sináptica se resume en la Fig. 3 [20, 21].

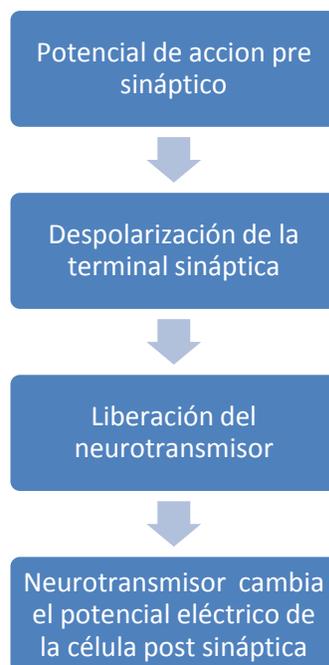


Fig. 3 Proceso de la transmisión sináptica

Anatomía del músculo estriado esquelético

El músculo esquelético está rodeado de varias capas de tejido conjuntivo:

- el endomisio rodea cada fibra muscular;
- el perimisio agrupa las distintas fibras musculares en haces de fibras musculares;
- el epimisio recubre el conjunto del músculo.

Tras haber atravesado el epimisio, los vasos sanguíneos (arteriolas y vénulas) que garantizan la vascularización del músculo, crean una fina red de capilares que llega al perimisio y después al endomisio para vascularizar cada fibra muscular. Las prolongaciones de los nervios llegan también al perimisio, terminan en una arborescencia cuyas ramificaciones acaban en la unión neuromuscular para inervar las diferentes fibras musculares [22].

Organización celular del músculo esquelético

Una sola célula músculo esquelética es conocida como una fibra muscular. Cada fibra muscular es formada durante su desarrollo por la fusión de un número de células mono nucleadas indiferenciadas, conocidas como mioblastos, dentro de una sola célula cilíndrica multi nucleada. La diferenciación del músculo esquelético es completada alrededor del tiempo de nacimiento y estas fibras diferenciadas continúan incrementando en tamaño durante el crecimiento, desde la infancia hasta la estatura adulta. Las fibras musculares esqueléticas adultas tienen un diámetro entre 10 y 100 μm y una longitud que podría extenderse sobre los 20 cm.

El término músculo refiere a un número de fibras musculares empaquetadas una con otra por tejido conectivo (Fig. 4). La relación entre una sola fibra muscular y un músculo, es análoga a la que habría entre un axón y un nervio, el cual está compuesto de los axones de muchas neuronas. Los músculos están usualmente enlazados a los huesos por paquetes de fibras de colágeno conocidos como tendones que se encuentran a cada extremo del músculo.

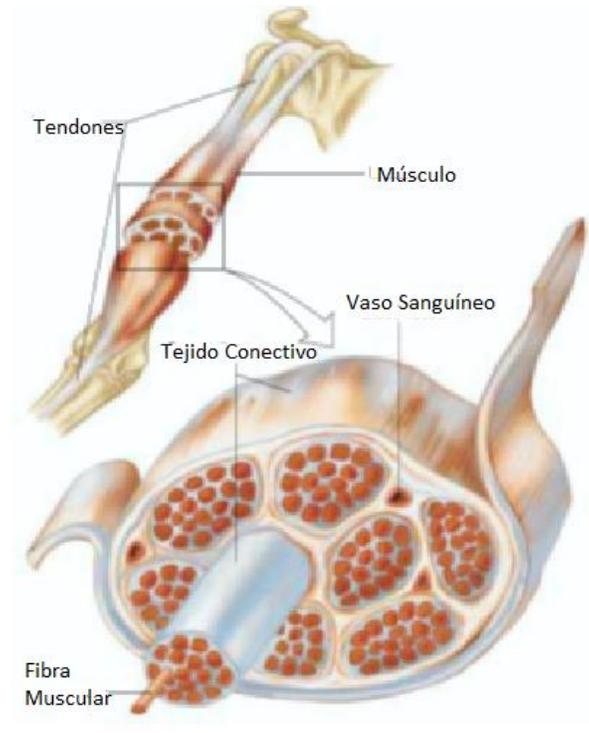


Fig. 4 Organización de las fibras musculares esqueléticas en un músculo que está unido al hueso por los tendones. Imagen tomada de Matthews G. 4th Ed., 2003.

Estructura del músculo esquelético

Sarcolema: El sarcolema es un concepto ya antiguo en el que se engloba:

- Las fibras de reticulina y glicoproteínas de la lámina externa (que forman el endomisio)
- La membrana celular de la fibra muscular
- Citoplasma
- Estriación longitudinal (por las miofibrillas)
- Estriación transversal: de ahí el nombre de músculo estriado
- Banda A (oscuras/anisótropas: si se observa el tejido muscular con luz polarizada, el índice de refracción cambia al cambiar el plano de polarización de la luz), en el centro tienen una banda más clara (banda H) que, a su vez, está centrada por una zona más oscura (línea M), que no se suele ver con el microscopio de luz.
- Banda I (isótropas/claras)
- Línea Z: en el centro de la banda I

La zona comprendida entre dos líneas Z vecinas (abarca una banda A y las dos hemibandas I contiguas a ella) recibe el nombre de sarcómera.

Núcleo

La fibra muscular esquelética contiene varios núcleos alargados (pueden llegar a ser varios cientos según tamaño de la célula) situados en la zona periférica de la célula. La presencia de múltiples núcleos se debe a que una fibra muscular esquelética es un sincicio resultado de la fusión durante el desarrollo embrionario de multitud de células (mioblastos).

Células satélite

Estas células están situadas por fuera de la membrana celular pero por dentro del endomisio o lámina externa (fibras de reticulina y glicoproteínas) y son importantes porque en ocasiones, son capaces de regenerar las fibras musculares estriadas esqueléticas cuando éstas se lesionan. Estas células son similares a los mioblastos que se fusionaron para producir la fibra esquelética y representan a las células madre de otros tejidos [22].

Ultraestructura del músculo esquelético

- Núcleos ovalados-alargados con abundante cromatina
- Aparato de Golgi
- Mitocondrias numerosas: yuxtannucleares, submembranas o interfibrilares
- Gránulos de glucógeno y gotas lipídicas
- Las características ultraestructurales que definen mejor a una fibra muscular estriada son la organización del retículo sarcoplásmico (REL) y de las miofibrillas que ocupan su citoplasma:

El músculo esquelético así como el cardiaco presentan una serie de bandas oscuras y claras perpendiculares al eje longitudinal de la fibra muscular, por lo que también se les conoce como **músculo estriado**. El patrón estriado en las fibras musculares esqueléticas y cardíacas, resulta del arreglo de numerosos filamentos gruesos y finos en el citoplasma en paquetes cilíndricos de aproximadamente 1 a 2 μm de diámetro conocidas como **miofibrillas**. La mayor parte del citoplasma de una fibra está lleno de miofibrillas, cada una de ellas se extiende desde un extremo de la de fibra muscular a la otra y está vinculada a los tendones en los extremos de la fibra muscular.

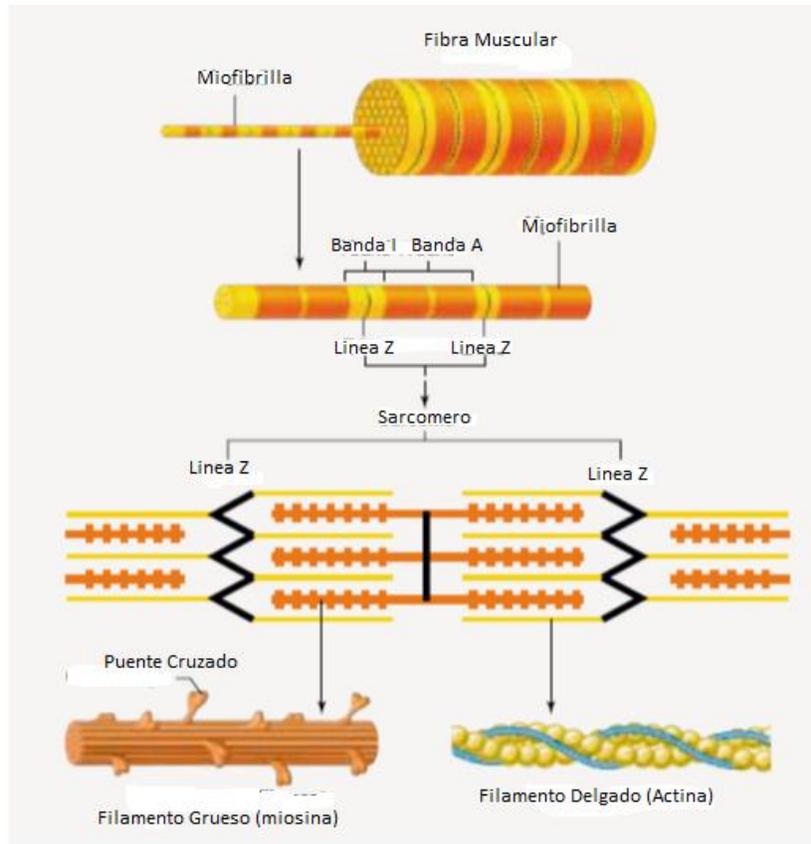


Fig. 5 Disposición de los filamentos de una fibra del músculo esquelético que produce el patrón estriado de bandas. Imagen tomada de Matthews G. 4th Ed., 2003.

Los filamentos gruesos y delgados de cada miofibrilla están colocados en un patrón repetido a todo lo largo de la miofibrilla. Una unidad de este patrón de repetición es conocida como **sarcómero**. Los filamentos gruesos están compuestos en su mayoría por la proteína contráctil **miosina**. Los filamentos delgados (los cuales son cercanos a la mitad del diámetro de los filamentos gruesos) contienen la proteína contráctil **actina**, así como también otras dos proteínas, troponina y tropomiosina, las cuales juegan un papel muy importante en la regulación de la contracción.

Los filamentos gruesos están localizados a la mitad de cada sarcómero, en su disposición en paralelo ordenada produce una banda ancha, oscura conocida como banda A. Cada sarcómero contiene dos conjuntos de filamentos delgados, uno en cada extremo. Un extremo de cada filamento delgado está conectado a una de las proteínas de interconexión llamada disco Z, mientras que el otro extremo se superpone a una porción del filamento grueso. Dos discos Z sucesivos definen los límites de un sarcómero. Los filamentos delgados de dos sarcómeros adyacentes están anclados a los lados de cada disco Z.

La banda I se encuentra en los extremos de las bandas A de dos sarcómeros adyacentes y contiene las partes de los filamentos finos que no se superponen a los filamentos gruesos. Se encuentra dividida en dos por la banda Z (Fig.5).

La zona H es una banda que corresponde al espacio entre los extremos opuestos de los dos conjuntos de filamentos finos en cada sarcómero, por lo que sólo filamentos gruesos, especialmente su parte central, se encuentran en la zona H. Una banda estrecha, oscura en el centro de la zona H se conoce como la línea M y corresponde a las proteínas que se unen a la región central de los filamentos gruesos.

El espacio entre la superposición de los filamentos gruesos y delgados es enlazado por proyecciones conocidas como puentes cruzados. Éstas son porciones de las moléculas de miosina que se extienden desde la superficie de los filamentos gruesos hacia los filamentos delgados (Fig. 5). Durante la contracción muscular los puentes cruzados hacen contacto con los filamentos delgados y ejercen fuerza sobre de éstos. [20, 22].

Mecanismos moleculares de contracción

El termino contracción, como es usado en la fisiología muscular, no necesariamente significa “acortamiento”, sino que se refiere a la activación de los sitios de generación de la fuerza (puentes cruzados), en una fibra muscular. Después de la contracción, los mecanismos que iniciaron la generación de la fuerza, se inactivan, disminuyendo la tensión y regresando al estado de relajación de la fibra muscular.

Mecanismo de deslizamiento de fibras

Durante la generación de la fuerza muscular, se produce un acortamiento de la fibra muscular esquelética debido a un deslizamiento de las fibras gruesas y delgadas, una sobre otra, acortándose el sarcómero, impulsado por el movimiento de los puentes cruzados. Durante el acortamiento de los sarcómeros no existe un cambio en la longitud de los filamentos gruesos o delgados. Esto es conocido como el mecanismo de deslizamiento de filamentos de la contracción muscular.

Durante el acortamiento cada puente cruzado se une a un filamento delgado, moviéndose en un arco tal y como un remo en un bote. Este movimiento giratorio de muchos puentes cruzados fuerza a los filamentos delgados en los extremos de la banda A hacia el centro del sarcómero, provocando el acortamiento del sarcómero (Fig.6).

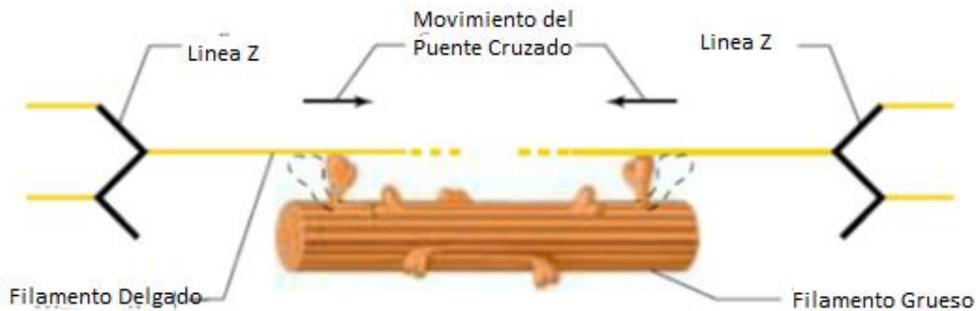


Fig. 6 Puentes cruzados en los filamentos gruesos se unen a la actina en los filamentos delgados sometiéndose a un cambio conformacional que impulsa a los filamentos delgados hacia el sarcómero (solamente 2 de los aproximadamente 200 puentes cruzados en cada filamento son mostrados). Imagen tomada de Matthews G. 4th Ed., 2003.

Un movimiento de un puente cruzado produce sólo un muy pequeño movimiento de un filamento delgado relativo a un filamento grueso. Aunque una fibra muscular permanezca “girada”, los puentes cruzados seguirán repitiendo esos movimientos giratorios muchas veces, resultando en un gran desplazamiento de los filamentos.

La habilidad de una fibra muscular de generar fuerza y movimiento, depende de la interacción de dos proteínas contráctiles llamadas miosina en los filamentos gruesos y actina en los delgados además de energía provista por ATP y Ca^{2+} .

Una molécula de actina es una proteína globular compuesta de un solo polipéptido que se polimeriza con otras actinas, formando dos cadenas helicoidales entrelazadas. Cada actina tiene un sitio de enlace para miosina. La molécula de miosina por otra parte, está compuesta por dos cadenas pesadas de polipéptido y por otras cuatro cadenas más ligeras. Estos polipéptidos se combinan para formar una molécula que consiste en dos cabezas globulares (conteniendo cadenas gruesas y delgadas) y un tallo largo formado por dos cadenas pesadas entrelazadas. El tallo de cada molécula de miosina se encuentra a lo largo del eje del filamento delgado y las dos cabezas globulares se extienden hacia los lados, formando los puentes cruzados. Cada cabeza globular tiene dos sitios de enlace, una para actina y una para ATP.

Las moléculas de miosina en los extremos de cada filamento grueso se orientan en direcciones opuestas, así como los extremos de sus tallos se direccionan hacia el centro del filamento. La fuerza de los puentes cruzados mueven los filamentos delgados en los dos extremos del sarcómero hacia el centro durante el acortamiento.

El rol de troponina, tropomiosina y el Ca^{2+} en la contracción muscular

La troponina es una molécula compuesta por dos polipéptidos entrelazados con una longitud aproximadamente igual a siete moléculas de actina. Las cadenas moleculares de tropomiosina están sujetas a la actina del filamento delgado. Estas moléculas de tropomiosina parcialmente cubren los sitios de enlace de la miosina con cada molécula de

actina, lo que impide que los puentes cruzados entren en contacto con la actina. Cada molécula de tropomiosina mantiene su posición de bloqueo por la troponina. Una molécula de troponina se enlaza a cada molécula de tropomiosina y regula el acceso de los sitios de enlace de la miosina sobre las siete moléculas de actina en contacto con la tropomiosina.

El ciclo de los puentes cruzados que unen actina, ocurre cuando las moléculas de tropomiosina son alejadas de sus sitios de bloqueo de actina. Esto ocurre cuando el Ca^{2+} se enlaza a sitios específicos sobre la troponina. La unión de Ca^{2+} produce un cambio en la forma de la tropomiosina, debido a la vinculación de troponina a la tropomiosina. La tropomiosina permite que la miosina se aleje de los sitios de enlace de cada molécula de actina. Inversamente, al retirar el calcio, la troponina invierte el proceso inactivando la actividad contráctil.

Por lo tanto la concentración de Ca^{2+} citoplasmático determina el número de sitios de troponina ocupados por Ca^{2+} , que a su vez determina el número de sitios de enlace disponibles de actina para la unión de los puentes cruzados.

Acoplamiento excitación – contracción

El acople excitación – contracción, se refiere a la secuencia de eventos por los cuales un potencial de acción en la membrana plasmática de la fibra muscular conduce a los puentes cruzados a realizar los procesos ya mencionados durante la contracción muscular. La membrana plasmática del músculo esquelético es una membrana excitable capaz de generar y propagar potenciales de acción.

En el estado de reposo, la concentración de calcio en el citoplasma alrededor de los filamentos gruesos y delgados, es muy bajo, cerca de 10^{-7} mol/L. A estas concentraciones tan bajas de Ca^{2+} , muy pocos sitios de enlace sobre la troponina están ocupados, por lo que la actividad de los puentes cruzados se encuentra bloqueada por la tropomiosina. Seguido a un potencial de acción, hay un incremento en la concentración del Ca^{2+} citoplasmático, enlazándose el Ca^{2+} a la tropomiosina, inhibiendo el efecto bloqueador de la tropomiosina y permitiendo el ciclo de los puentes cruzados. La fuente para el incremento del Ca^{2+} citoplasmático, es el retículo sarcoplasmático en el interior de la fibra muscular.

Retículo sarcoplasmático El retículo sarcoplasmático en el músculo es homólogo al retículo endoplásmico encontrado en la mayoría de las células y forma una serie de estructuras alrededor de cada miofibrilla (Fig.7), un segmento alrededor de la banda A y otro en la banda I. En el extremo de cada segmento hay dos regiones alargadas, conocidas como cisternas terminales, que están conectados unos con otros por una serie de pequeños elementos tubulares. Las cisternas terminales almacenan Ca^{2+} que es liberado después de la excitación de la membrana celular.

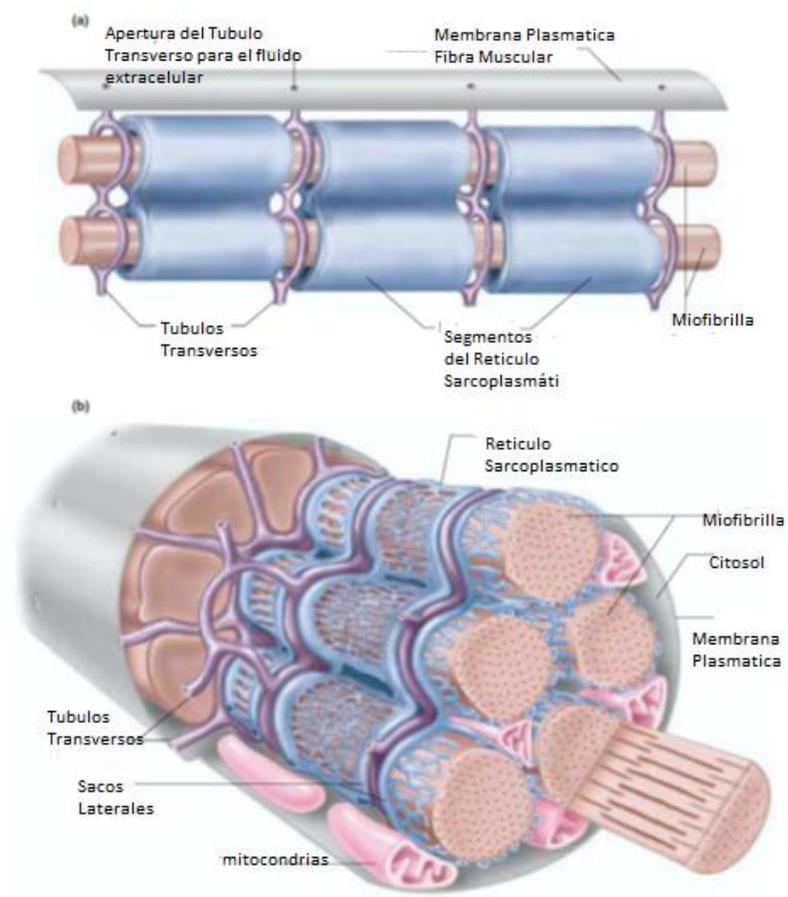


Fig. 7 (a) Diagrama que representa el retículo sarcoplásmico, los túbulos transversos y las miofibrillas. (b) estructura anatómica de los túbulos transversos y el retículo sarcoplásmico en una sola fibra muscular. Imagen tomada de Matthews G. 4th Ed., 2003.

El túbulo transverso (túbulo T) cruza la fibra muscular en el nivel de cada unión A-I, pasando entre cisternas terminales adyacentes y eventualmente uniéndose a la membrana plasmática. El lumen del túbulo T es continuo al líquido extracelular alrededor de la fibra muscular. La membrana de los túbulos T, como la membrana plasmática, es capaz de propagar potenciales de acción. Una vez inicializado en la membrana plasmática, un potencial de acción es rápidamente conducido sobre la superficie de la fibra y hacia dentro de ésta por medio de los túbulos transversos. El potencial de acción en un túbulo T adyacente a una cisterna terminal activa las proteínas de los canales iónicos dependientes de voltaje en la membrana de los túbulos transversos que enlaza física o químicamente a los canales de Ca^{2+} en la membrana de las cisternas terminales. La despolarización del túbulo T por un potencial de acción provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} en las cisternas terminales, permitiendo la difusión de Ca^{2+} desde el lumen de las cisternas terminales hacia el citoplasma. El aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático normalmente es suficiente para activar todos los puentes cruzados de la fibra. La contracción continua hasta que el Ca^{2+} es removido por la tropomiosina y esto se logra por la reducción en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma. La membrana del

retículo sarcoplásmico contiene proteínas transportadoras, Ca-ATPasas, que bombean de regreso iones de Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el lumen del retículo. [20, 22]

Electrofisiología celular

El estudio de las propiedades eléctricas de las células excitables ha sido vital para la comprensión de los mecanismos íntimos por los cuales las células inician y regulan la función celular comandada por la actividad eléctrica.

Ejemplos típicos de células excitables son las musculares, glandulares y nerviosas, en las cuales la actividad eléctrica induce la contracción, la liberación de hormonas y el procesamiento de información, respectivamente. El estudio de las propiedades eléctricas de las células se ha extendido a las células no excitables, en las cuales, a pesar de no presentar patrones eléctricos característicos de las células excitables (potenciales de acción), los cambios en su potencial de membrana juegan un papel relevante en la función celular [23].

Actividad eléctrica de las células excitables

En las membranas de casi todas las células del organismo hay potenciales eléctricos. Algunas células como las nerviosas y musculares son excitables, es decir capaces de generar impulsos eléctricos rápidamente cambiantes en sus membranas. Estos impulsos se pueden utilizar para transmitir señales a lo largo de las membranas nerviosas o musculares.

El Potencial de Reposo

El potencial de reposo es el voltaje a través de la membrana de una célula no estimulada. Las células excitables se caracterizan porque mantienen continuamente un potencial eléctrico diferente entre el interior y el exterior celular. Este potencial de reposo se encuentra en la mayoría de los casos en un intervalo entre los -50 a -90mv, el potencial de reposo de las grandes fibras musculares está cerca de los -90mv, mucho más negativo que el del líquido intersticial en el exterior de la fibra, la membrana en el estado de reposo es más de 50 - 100 veces más permeable a los iones de potasio que a los iones de sodio.

Todas las membranas celulares poseen una bomba de sodio-potasio que impulsa sodio al exterior de la fibra y potasio hacia al interior, de esta forma se mueve más cantidad de cargas positivas al exterior que al interior, produciéndose así una carga negativa al interior de la célula y una positiva al exterior de la misma [23].

El Potencial de Acción

Las señales nerviosas se transmiten mediante potenciales de acción que son cambios rápidos en el potencial de membrana, es una inversión del potencial de membrana con una duración de algunos milisegundos y puede llegar hasta +30mV. Obedece a la regla de todo o nada: un estímulo debe ser lo suficientemente grande como para despolarizar a la neurona por encima del valor umbral, si no se alcanza el umbral no hay disparo, si

rebasa el umbral, el potencial de acción siempre tiene el mismo tamaño. Las neuronas no pueden excitarse durante la despolarización y son difíciles de excitar durante la repolarización.

Estos constituyen los períodos refractarios absolutos y relativos que limitan la velocidad máxima de disparo y restringen la propagación del potencial de acción en una sola dirección.

Partes del potencial de acción:

- 1.- Potencial en reposo (antes de que se dé el estímulo).
- 2.- Período de latencia (tiempo en que tarda en llegar el potencial al registro).
- 3.- Fase de despolarización (se hace positivo el potencial).
- 4.- Sobretiro o meseta (cuando el potencial está invertido).
- 5.- Fase de repolarización (se hace negativo el potencial de nuevo).
- 6.- Fase de hiperpolarización (se hace más negativo que el potencial en reposo).

Los potenciales de acción son producto de la apertura de los canales de Na^+ voltaje dependientes. Las características de los potenciales de acción, como disparo a un voltaje umbral y período refractario, se deben a los diferentes estados que sufre el canal de Na^+ que se enumera en el ciclo siguiente: 1 = reposo, 2 = activo, 3 = inactivo, 4 = reposo.

En el período refractario absoluto no hay respuesta, porque los canales de Na^+ están en estado inactivo. El proceso de repolarización es debido a la apertura tardía de canales de K^+ voltaje dependientes, además de la inactivación de los canales de Na^+ . La hiperpolarización es producto del cierre lento de los canales de K^+ voltaje dependientes [23].

Propagación de los potenciales de acción.

En el punto donde se aplicó el estímulo aparecen cargas de sentido opuesto, lo que genera corrientes iónicas. Esta zona activa comienza a atraer cargas de sentido contrario de las zonas vecinas (las que son llevadas por flujos iónicos); esto hace disminuir el potencial de membrana en el punto vecino y se genera otro potencial de acción. Por eso se dice que es una respuesta auto propagada; es como si el potencial de acción fuera el estímulo para el lugar vecino. La propagación del impulso se puede dar en cualquier sentido, incluso en ambos sentidos, es bidireccional en la fibra nerviosa [23] cuando estimulamos en alguna región del axón, aunque normalmente es unidireccional debido a que el potencial de acción se propaga del soma hacia la terminal nerviosa, la inactivación de los canales de Na^+ garantiza que sea unidireccional la propagación normal del potencial de acción.

Técnicas de Registro Celular

Registro Intracelular

La técnica consiste en la inserción de un microelectrodo con punta muy fina, en el interior celular para la obtención de la señal eléctrica. El microelectrodo se encuentra en continuidad eléctrica con un seguidor de voltaje. Al insertar el microelectrodo en la célula se obtiene un potencial de DC denominado potencial de reposo.

La técnica de registro intracelular permite la medición del potencial de membrana ya sea del reposo o bien durante la producción de potenciales de acción. Además permite inyectar corriente al interior celular para modificar el potencial de membrana [23].

Fijación de Voltaje

La técnica de fijación de voltaje permite controlar el potencial de membrana, manteniendo su magnitud y polaridad en valores seleccionados. El tiempo que el potencial de membrana se mantiene fijo es variable y depende de la rapidez de activación de la población de canales iónicos voltaje dependientes en estudio.

La técnica permite la aplicación de un voltaje de DC, denominado potencial de mantenimiento, para polarizar la célula a un valor deseado, el cual suele ser el valor del potencial de reposo. A partir del potencial de mantenimiento se aplican a la célula pulsos rectangulares de voltaje (pulsos comando) de diferente magnitud para modificar transitoriamente el potencial de membrana, y de esta manera evocar corrientes iónicas transmembranales por la apertura de los canales voltaje-dependientes. El análisis de las corrientes iónicas obtenidas con la técnica de fijación de voltaje brinda información sobre la dependencia del voltaje y del tiempo de los mecanismos de activación de los canales iónicos [23].

Cultivos celulares bidimensionales (2D)

Desde la llegada del cultivo de células eucariotas desde hace más de 40 años, los sustratos más comunes para apoyar el crecimiento celular se han hecho a partir de poliestireno o de vidrio y han tomado la forma de una superficie plana de dos dimensiones [24]. Miles de estudios publicados que van desde la selección de fármacos para el cáncer hasta la biología del desarrollo, se han basado en este formato para el crecimiento de células adherentes. Una de las principales críticas de estos estudios es la suposición de que la fisiología de las células animales puede ser reproducida con exactitud utilizando una mono capa celular.

Los cultivos celulares son un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de células vivas en un medio artificial, que permite reproducir de forma bastante fiable, las condiciones biológicas que las células tienen en su lugar de origen. Las áreas de aplicación potencial de los cultivos celulares se han ido ampliando de forma progresiva, por lo que constituyen ya una técnica habitual en muchos procedimientos de investigación [24, 25].

Los cultivos celulares han ayudado al estudio de las interacciones celulares, estos estudios han permitido tener una comprensión detallada de los mecanismos químicos y eléctricos involucrados en la sinapsis en general, y del control nervioso de las fibras musculares en particular. Asimismo, han permitido comprender los mecanismos involucrados en algunas patologías que afectan a los diferentes tipos celulares, en particular al músculo esquelético y motoneuronas, y la acción de los fármacos empleados en su tratamiento [23, 26].

Potencialmente todas las células son cultivables pero cada una de ellas presenta peculiaridades y requerimientos específicos. Ello hace que existan numerosos modelos diferenciados de cultivo celular. Según su estructura, se pueden diferenciar tres grandes grupos de cultivo celular: cultivo de órgano, cultivo de tejido y cultivo de células aisladas [27].

El cultivo de células aisladas es un sistema biológico que logra la supervivencia fuera del organismo de células independientes, pero capaces de dividirse y mantener sus funciones *in vitro*. Esta última modalidad se denomina también cultivo en mono capa o suspensión y es la más utilizada [28-30].

Dentro de los modelos de estudio utilizando cultivos celulares en mono capa, se utilizan tres tipos de modelos celulares: 1. líneas celulares, 2. células troncales y 3. células obtenidas de cultivos primarios. Las líneas celulares son modelos biológicos que son manipulados genéticamente para detener el mecanismo de control del ciclo celular y así poder multiplicarse de manera infinita.

Las células troncales o “stem cell (SC)”, son células no diferenciadas, es decir células que aún no están totalmente diferenciadas, éstas se encuentran en la masa interna celular de los embriones aún en estado de blástula. Tienen la capacidad única de dividirse en cultivo y mantienen su pluripotencialidad, es decir, el poder diferenciarse dentro de múltiples tipos celulares especializados a partir de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo, endodermo) [31].

Su diferenciación hacia otros tipos celulares específicos se ha logrado *in vitro* a través del cultivo en suspensión de cuerpos embrionarios (EBs) [32, 33], los cuales son agregados de células troncales, su desarrollo es reminiscente a la embriogénesis uterina embrionaria [34]. Estos cuerpos embrionarios son tratados con factores de crecimiento apropiados para diferenciarse en un tipo celular específico, por ejemplo, factores de crecimiento neuronal, una proteína hormonal, pueden inducir en cultivo la diferenciación de células troncales en células nerviosas maduras, neuronas capaces de transmitir señales eléctricas y químicas notablemente similares a las células nerviosas en el cuerpo [35-37].

Los cultivos primarios son muestras de tejido que se extraen de un animal y que son sometidas a diferentes procedimientos químicos y mecánicos de separación, hasta obtener las células que se quieren cultivar, por ejemplo células de músculo esquelético o motoneuronas [38-42]. Han sido hasta la fecha, de los mejores modelos biológicos utilizados en diferentes estudios, sin necesidad de utilizar factores externos para lograr o

mantener la adecuada diferenciación de un tipo específico de célula, como es el caso de los diferentes factores de crecimiento y de diferenciación utilizados en los cultivos de líneas celulares o de células troncales.

Cultivos celulares tridimensionales (3D)

La presentación de una célula eucariota a un sustrato de vidrio o de poliestireno de dos dimensiones no es una representación exacta de la matriz extracelular que se encuentra en el tejido nativo. Como resultado, muchas respuestas biológicas complejas tales como la expresión del receptor, la expresión transcripcional, la migración celular y la apoptosis, difieren de forma significativa del órgano o tejido en el que se producen. Además se ha demostrado que ciertos procesos celulares relacionados con la diferenciación y la morfogénesis se producen preferentemente en cultivo 3D en lugar del 2D [43].

El ciclo de vida de una célula normal, involucra una serie controlada de eventos bien definidos: división, proliferación, migración y apoptosis, los cuales se basan inherentemente, en los principios de organización espacial y temporal. El cultivo de las células en dos dimensiones es posiblemente demasiado simple y pasa por alto muchos parámetros que son importantes para la reproducción precisa de células y la fisiología de los tejidos. Estos incluyen señales mecánicas, la comunicación entre la célula y su matriz y la comunicación entre células adyacentes. En el punto de la comunicación intercelular, muchos experimentos en cultivo de dos dimensiones no toman en cuenta la interacción entre diferentes tipos de células, ya que la gran mayoría de los cultivos en monocapa son de un solo tipo celular. Los co-cultivos 2D logran superar algunas de estas deficiencias, pero están lejos de poder reproducir con precisión la función celular observada dentro de un tejido [43].

Es necesario encontrar un mecanismo que nos permita tener un cultivo en el cual la superficie de crecimiento no se vea limitada a 2D y sea un modelo más cercano a una muestra *in vivo*, por lo que se han empleado los cultivos celulares tridimensionales (3D) que buscan mantener las características o arquitectura del tejido *in vivo*, ya que éste nos brinda una geometría bien definida, la cual hace posible relacionar directamente la estructura con la función [44].

Para estos crecimientos volumétricos se utilizan las matrices para cultivo tridimensional conocidas como andamios, los cuales fueron introducidos para superar las limitaciones de una superficie bidimensional. Estas matrices o andamios, son sustratos porosos que pueden soportar el crecimiento celular, organización y diferenciación dentro o fuera de su estructura. Existe una gran variedad de matrices 3D debido a la diversidad de células que existen; se busca que cada matriz pueda solventar las demandas que cada tipo celular requiera [45] y representen mejor la geometría, química y ambiente natural de señalización de la membrana extracelular, como es el andamio natural que la célula tiene para su crecimiento [45, 46].

Se han desarrollado andamios utilizando diversos biomateriales, específicamente los siguientes: hidrogeles; andamios personalizados, andamios fibrosos, andamios porosos,

micro esferas, andamiaje propio del tejido nativo. Diversas técnicas de fabricación están disponibles para estos andamios, sin embargo, no hay un andamio universal. El tipo de andamio que se utilizará depende de la función propuesta del andamio y de las características deseadas.

Una amplia gama de características que determinan los criterios de diseño para andamios 3D incluyen lo siguiente: biomaterial, biocompatibilidad, biodegradabilidad, porosidad, tamaño de poro, geometría, co-cultivo de células, forma y tamaño, interconectividad orientación, propiedades mecánicas (resistencia a la tracción, módulo de elasticidad) [47], incorporación de señales físicas y la capacidad para atrapar señales solubles, incorporación de variantes de ECM (matriz extracelular).

La característica principal de los andamios fibrosos es su estructura de fibras, ya que proporciona un área de superficie grande para la fijación celular. Estos andamios tienen distancias relativamente elevadas entre las fibras, lo que facilita la nutrición y el intercambio de gases así como la infiltración celular. Polímeros naturales y sintéticos se han explorado para la síntesis de los andamios fibrosos. Estos incluyen el colágeno, ácido hialurónico (HA), seda, quitosano, ácido Poli-Láctico (PLA), ácido Poli-Glicólico/Láctico (PLGA) y Poli-Caprolactona (PCL) [48].

Una de las técnicas más utilizadas para obtener andamios fibrosos es el electrohilado, esta técnica se utiliza para producir fibras continuas de diámetro micrométrico a nanométrico, por pulverización electrostática de los revestimientos de polímeros. Los andamios electrohilados tienen amplias aplicaciones en la ingeniería de tejidos neuronales [49-51]. Se utilizan principalmente para proporcionar orientación estructural para el crecimiento de neuritas y la extensión axonal. El electrohilado es ventajoso para la producción de fibras ultrafinas con orientación especial, alta relación de aspecto, alta área superficial y tamaño de poro controlado.

Como en el caso del crecimiento celular en monocapa, en donde casi todas las células son potencialmente cultivables, en los cultivos tridimensionales, se conserva el mismo principio, por lo que de igual manera, podemos tener diferentes tipos de crecimientos celulares tridimensionales, un ejemplo de ellos son los crecimientos de células musculares y motoneuronas [52-65].

Así pues, una de las aplicaciones de los cultivos tridimensionales musculares, es buscar modelos de estudio que nos permitan comprender mejor la morfogénesis muscular, y a su vez poder buscar sustitutos biológicos con el fin de poder restaurar y mantener intactas las propiedades fisiológicas y estructurales del músculo, que se pueden ver afectadas por la pérdida de tejido debido a cirugías, defectos congénitos, extirpación de tumores o daño funcional debido a una variedad de miopatías [52-58].

Dentro de estos estudios del crecimiento tridimensional de músculo, se han realizado diferentes técnicas de cultivo sobre diferentes tipos de andamios electrohilados de PLA y PCL con fibras organizadas, han sido utilizadas como superficies de crecimiento muscular, ya que para este caso en particular, se debe de mantener la organización

estructural del músculo para tener un adecuado crecimiento *in vitro* que guarde la morfología de una muestra *in vivo*, ya que la estructura de las fibras debe ser ordenada de forma paralela para que las células puedan crecer de forma ordenada y se pueda mantener la biomecánica del músculo [59-65].

Los cultivos volumétricos de células nerviosas de la médula espinal así como de motoneuronas, han sido utilizados como modelos *in vitro*, para desarrollar adecuados métodos de tratamiento y para el entendimiento de los mecanismos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas, patogénesis de enfermedades, daños por trauma cerebral, y ayudar a la regeneración nerviosa en daños a la médula espinal [66-69].

Los biomateriales poliméricos son ampliamente preferidos como andamios para la regeneración del nervio periférico y central, tanto *in vitro* como *in vivo* [70-73]. Hay una amplia variedad de polímeros disponibles con biodegradabilidad programable, de naturaleza no tóxica/no inflamatoria, propiedades mecánicas similares a las del tejido a ser reemplazado, de alta porosidad que promueve la unión celular y el crecimiento, económicos con procesos sencillos de fabricación, junto con un potencial de modificación química que produzca un aumento de la interacción con el tejido normal [74]. Polímeros naturales (quitosano, quitina, colágeno, gelatina, alginato), polímeros no degradables sintéticos (silicona), polímeros sintéticos biodegradables tales como PLGA, poli (ϵ -caprolactona (PCL), ácido poli L-láctico (PLLA), y polímeros conductores (polipirrol, polianilina) se han utilizado en diversos enfoques de la regeneración del nervio [38, 75-77].

Polimerización por plasma

Además de buscar un adecuado soporte de crecimiento, es importante que las superficies de los andamios interactúen de forma adecuada con la célula, es decir, que el andamio además de permitir el crecimiento volumétrico, brinde un adecuado anclaje a las células, ayudando al crecimiento y a la diferenciación celular. Con la finalidad de potencializar el crecimiento y anclaje celular, se han desarrollado diferentes métodos para modificar las superficies de un material, un ejemplo de ello, es el uso del pirrol, que es compuesto químico orgánico aromático y heterocíclico que se puede sintetizar por polimerización por plasma y obtener Poli-Pirrol (PPy), el cual ha sido utilizado para el tratamiento de superficies [78, 79].

La polimerización de pirrol por plasma, es el proceso de formación de materiales poliméricos bajo la influencia de un gas parcialmente ionizado, sin necesidad de utilizar un compuesto químico oxidante. Es un proceso por medio del cual se pueden sintetizar polímeros sobre las superficies expuestas al plasma y es un método efectivo para la preparación de películas delgadas, con estructura densa y entrecruzada, con baja degradación [80].

Estas películas depositadas sobre diferentes tipos de materiales han sido utilizadas como superficies de crecimiento celular [76, 81], así como para pruebas *in vivo* [80, 82]. Al ser un material biocompatible y bioinerte, no altera las propiedades biológicas de las células

permitiendo un adecuado anclaje y crecimiento celular, esto debido a la gran cantidad de grupos amina (-NH₂) y de otros grupos funcionales que se depositan en la superficie durante el proceso de polimerización del pirrol por plasma [83-85].

Metodología

Polimerización por Plasma e Infrarrojo por transformada rápida de Fourier (FT-IR)

Los cubreobjetos, así como las camas electrohiladas de PLA, fueron sintetizados por plasma, por medio de un reactor con descarga de resplandor de baja presión, se utilizó como monómero pirrol (98% Sigma-Aldrich). Esto se realizó en un reactor tubular de vidrio con electrodos de acero inoxidable, con la configuración mostrada en la Fig.8. Los cubreobjetos así como las fibras electrohiladas, fueron colocados en el reactor de plasma, a una frecuencia de oscilación de 30 watts (Dressler Cesar, RF Power Generator) por 10 min. a una presión de vacío de 3×10^{-2} Torr (Edwards Active Gauge Controller). Al obtener el recubrimiento de los materiales, éstos se guardaron y colocaron bajo luz UV para asegurar su esterilidad en experimentos posteriores.

Para conocer los grupos funcionales que componen el PPy se decidió realizar un análisis infrarrojo por transformada de Fourier, se elaboró una pastilla de Bromuro de potasio (KBr), el KBr fue colocado en un dado estándar para FT-IR y se aplicó una presión de 9 Tons/5 min. La pastilla fue colocada dentro del reactor de plasma durante la polimerización de los materiales. Una vez polimerizada se colocó en el lector FT-IR (Perkin Elmer).

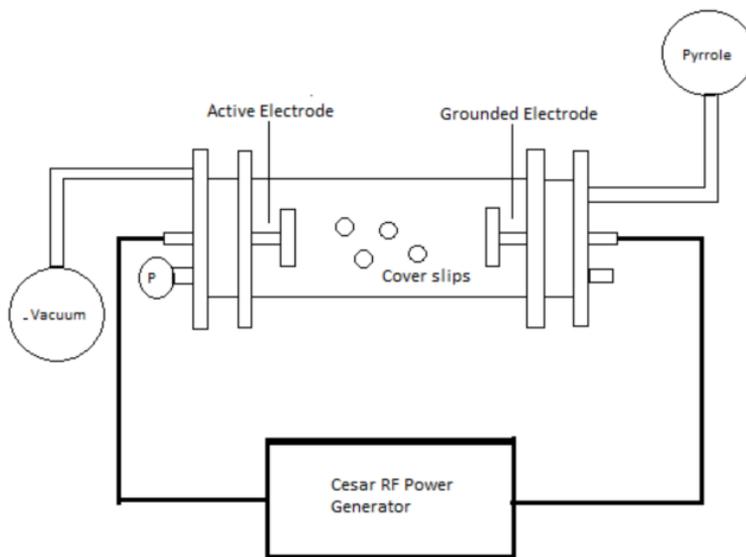


Fig. 8 Configuración del reactor de plasma (Imagen tomada de Zuñiga-Aguilar et. al 2014)

Cultivos Celulares Primarios

Células de músculo esquelético de ratón

Los cultivos primarios derivados de los músculos esqueléticos consisten principalmente de mioblastos y fibroblastos, el siguiente protocolo nos permite la purificación de la célula miogénica de una población mezclada.

Materiales:

70 % etanol

Buffer salino de fosfatos estéril (PBS, GIBCO)

Colagenasa/Dispasa/CaCl₂ en solución (BAYER)

Medio de cultivo de pre-sembrado

Medio de crecimiento de mioblastos primarios (F-10, GIBCO)

Medio de crecimiento de mioblastos primarios (F-10/DMEM, GIBCO)

Medio de Fusión

Ratones neonatos, preferentemente de 1- 3 días de edad (Ratones de la cepa CD-1)

Tijeras quirúrgicas punta curvada

Pinzas para micro disección

Microscopio estereoscópico de bajo poder

Platos de cultivo 35mm

- Aislamiento del Músculo

Se sacrificaron de 1-5 ratones neonatos de 1-3 días por inhalación de isofluorano. Se limpiaron los miembros superiores e inferiores con etanol al 70 % y se removieron con tijeras estériles. Se retiró la piel de los 4 miembros, posteriormente se separó el músculo de los huesos con ayuda de pinzas de microdisección. La disección es más sencilla si se realiza bajo un microscopio estereoscópico. El tejido se mantuvo en un plato de cultivo con PBS sobre hielo.

- Disociación de las células musculares y pre-sembrado

El tejido fue colocado en un plato de 100 mm de cristal, se cubrió completamente el tejido con PBS y se comenzó con la disgregación del tejido utilizando pinzas de microdisección. Una vez que se disgregó el tejido se aplicó una solución enzimática previamente preparada de 2ml de Colagenasa D [1.5 U/ml], 2ml de Dispasa II [2.4 U/ml] y 100 µl CaCl₂ [2.5 mM].

Se colocó el plato dentro de la incubadora por 15 min. y se continuó la disgregación mecánica repitiendo el proceso de incubación y disgregación 5 veces más. Se agregaron 10 ml de medio de pre-siembra suplementado con 90 % de Ham's F-10 (GIBCO), 10 % de Suero de becerro recién nacido (NBCS, GIBCO) y 1 % de Anti-Anti (GIBCO) y se filtró a través de un filtro de 80 µm de diámetro (SIGMA) para remover las piezas grandes de tejido que hayan quedado. La solución filtrada se centrifugó por 5 min. a 1400 rpm.

Se retiró el sobrenadante y se realizó la pre-siembra de las células con medio de pre-siembra por 20 min. dentro de la incubadora. Se eliminaron las células no adherentes

girando suavemente el plato y enjuagando con 1 ml de medio de pre-siembra, y se aspiró la suspensión de células en un tubo cónico de 15 ml.

- **Cultivo y diferenciación de las células musculares**

Las células se centrifugaron por 5 min. a 1400 rpm. Se resuspendió el botón de células en 2-4 ml de medio de crecimiento de mioblastos primarios (F-10) suplementado con: 80 % de Ham's F-10, 20 % NBCS, 50 µL de Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF, GIBCO) y 1 % de antibiótico-antimicótico. Se colocaron en platos de cultivo de 100 mm con 10 ml de medio. Se mantuvieron las células bajo las condiciones de crecimiento de temperatura y atmósfera (5 % CO₂ a 37 °C). El medio de cultivo se cambió cada 2 días, las células se subcultivaron por al menos 30 días para realizar la depuración de los fibroblastos existentes en el cultivo.

Una vez que se eliminó la mayor población de fibroblastos, se cambió el medio de crecimiento de mioblastos por medio enriquecido para mioblastos (F-10/D-MEM) suplementado con 40 % de Ham's F-10, 40 % de D-MEM, 20 % NBCS, 50 µl bFGF y 1 % de Anti-Anti. Cuando se obtuvo una población mayoritaria de mioblastos se procedió a la fusión celular para provocar la formación de miofibrillas en el cultivo. El medio de fusión fue suplementado con 95 % de D-MEM, 5 % Suero de Caballo Inactivado (HS, GIBCO) y 1 % de antibiótico-antimicótico.

- **Sembrado sobre cajas de cultivo y cubreobjetos recubiertos con PPy**

Una vez que se obtuvo la depuración de los fibroblastos se procedió a realizar el sembrado de las células sobre cajas de cultivo de 35 mm y en cubreobjetos recubiertos superficialmente con PPy.

Se sembraron 10x10³ células en 1 ml de medio enriquecido para mioblastos (F-10/D-MEM). Se colocaron dentro de la incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂. Una vez que se llegó a una confluencia celular del 50%, se cambió el medio enriquecido por medio de fusión para provocar la formación de miotubos en el cultivo.

- **Crecimiento Alineado de células musculares primarias**

Se realizó el sembrado de las células en cajas de cultivo de 35 cm y sobre cubreobjetos polimerizados con PPy, en las cuales previamente se hicieron líneas paralelas de silicón para limitar el crecimiento celular a un área determinada y generar un crecimiento alineado de las células, se dejó un espacio de 5 mm entre cada línea de silicón (Fig.9).

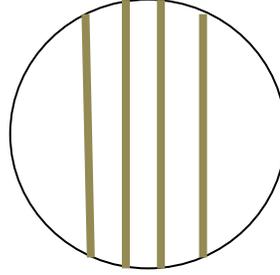


Fig. 9 Aplicación de líneas de silicón sobre cajas para cultivo celular

Las células fueron sembradas entre las líneas dibujadas de silicón colocando 1×10^3 células en 1ml de medio dividido entre las 3 líneas de crecimiento (Fig.10); se mantuvieron con medio de cultivo enriquecido para mioblastos hasta que se adhirieran y llegaron a una proliferación del 40 %, posteriormente se les cambió el medio por medio de fusión, las células se mantuvieron por 15 días.

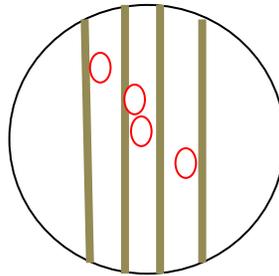


Fig.10 Sembrado de las células entre los rieles de silicón

Obtención de los modelos celulares de motoneuronas

Para poder tener un modelo adecuado de motoneuronas que cumplieran con las características morfológicas y eléctricas, se realizaron diferentes pruebas de obtención, utilizando 3 tipos de técnicas de obtención:

- Diferenciación de las células troncales embrionarias HBG3.
- Cultivo primario de células nerviosas de médula espinal de ratón
- Purificación de motoneuronas por Lectina a partir de células nerviosas de médula espinal de ratón.

Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a motoneuronas

Las motoneuronas derivadas de células troncales embrionarias fueron donadas por el Dr. Iván Velasco del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, las cuales se cultivaron con los protocolos reportados en la literatura [86-88].

Se ocuparon las células troncales de ratón HBG3 que expresan GFP bajo el control del promotor HB9 el cual es útil para identificar las neuronas con un fenotipo de motoneurona. Las células fueron crecidas sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón mitóticamente inactivados con Mitomicyn, cultivados con medio de cultivo DMEM, suplementado con aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol, penicilina y estreptomycin, 15 % de suero fetal de becerro y 1000 U/ml de factor inhibitorio de leucemia (LIF) para mantener su pluripotencialidad (todo obtenido de GIBCO).

Subsecuentemente las células fueron plantadas en platos de cultivo tratados con gelatina de piel de cerdo y crecidas hasta un 80 % de su confluencia, posteriormente fueron tripsinizadas y mantenidas en suspensión sobre placas bacterianas para formar cuerpos embrionarios. Los cuerpos embrionarios fueron cultivados con el medio anteriormente descrito durante 2 días y posteriormente tratados con 2 μ M de ácido retinoico (RA, GIBCO), junto con una variada concentración de recombinante sonic hedgehog human (SHH, R&D) por otros 4 días. Finalmente los cuerpos embrionarios fueron disociados usando una solución de 0.2 % de papaína/1 mM de L-cisteina (SIGMA). La suspensión se sembró en placas multi pozo tratados con 0.1 % de Matrigel y en cubreobjetos recubiertos con PPy; las células fueron mantenidas con medio de diferenciación DFNK consistente del medio de cultivo DMEM-F12K y medio Neurobasal suplementado con una solución de 2-mercaptoetanol (SIGMA), penicilina y estreptomycin (GIBCO).

Obtención de células nerviosa de ratón

- Disección de la médula espinal

Se utilizaron hembras preñadas (E13) que fueron sacrificadas por inhalación de isofluorano líquido. Se retiraron cuidadosamente los embriones y se colocaron en una caja Petri con solución HBSS (Hans Balance Salt Solution) precalentada (21°C).

Se cortaron la cabeza y la cola de cada embrión con pinzas para microdissección. Se colocaron boca abajo (Fig.11a). Se sujetó al embrión con un par de pinzas y con el siguiente par se removió la capa delgada externa de piel. Para abrir la parte central del cordón espinal se deslizaron suavemente las pinzas a lo largo de la línea media. Para obtener la región lumbar, se cortó el cordón espinal a nivel del hígado (segmento L1-L6). Se insertaron las pinzas por ambos lados y con movimientos aserrantes (Fig.11b), se desprendió la médula espinal del embrión.

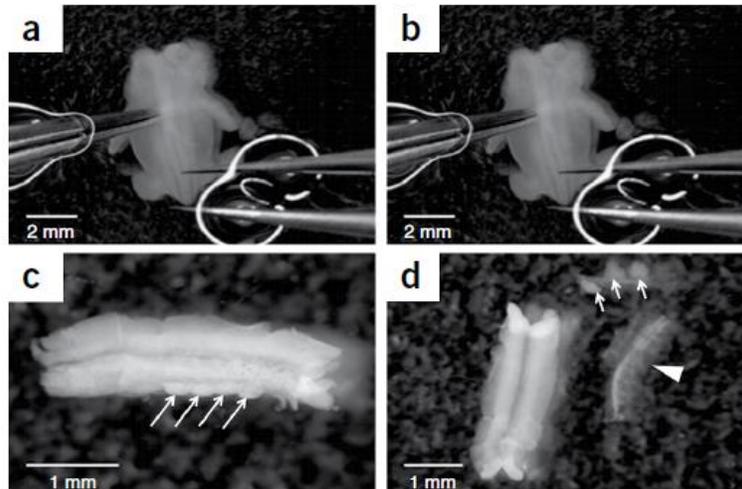


Fig. 11 Disección de la médula espinal de embriones de ratón

Se colocó la parte lumbar del cordón espinal en un nuevo plato con HBSS (Hans Balance Salt Solution), se colocó de tal manera que el canal central abierto quedara hacia abajo (Fig. 11c). Se retiraron los ganglios de la raíz dorsal (Fig. 11c flechas) por desplazamiento de las meninges envolventes (Fig. 11d cabezas de flecha). Se usó el segmento de cordón espinal de L1-L6 para los procedimientos subsecuentes. Un cordón espinal, dependiendo del estado gestacional del embrión, puede contener de 5,000-10,000 motoneuronas.

Cada cordón espinal diseccionado fue almacenado en un microtubo de 1.5 ml con 180 μ l de HBSS y colocado en hielo. Se aplicaron 10 μ l de Tripsina al 0.25 % por 20 min. Se detuvo la reacción aplicando 1ml de medio Neurobasal con 10 % de Suero Bovino Fetal (todo obtenido de GIBCO), se trituró suavemente el tejido 20 veces con ayuda de puntas de pipetas de 1 ml, posteriormente se trituró nuevamente con puntas de 200 μ l por 20 veces más.

Purificación de Motoneuronas

Para la purificación de las motoneuronas del cultivo celular, se cubrió previamente un plato de cultivo de 100 mm con Lectina a una concentración de 10 μ g/ml. La Lectina se preparó en solución TRIS 10 mM (JT. BAKER). Los platos se cubrieron con 10 ml de Lectina y se colocaron por 30 min dentro de la incubadora. Los platos se lavaron 3 veces con HBSS y se dejaron cubiertos con HBSS hasta su uso.

Las células fueron colocadas en el plato cubierto con Lectina y llenado con HBSS, se pipetearon y se homogenizaron suavemente las células moviendo el plato de cultivo. Las células se dejaron reposar en la Lectina por 60 min. a temperatura ambiente, cubriendo el plato para evitar cualquier tipo de contaminación.

Se retiró muy cuidadosamente el medio del plato y se lavó muy suavemente con HBSS precalentado a 23 °C para remover los fragmentos celulares que no se anclaron a la superficie del plato. Inmediatamente después de realizar el último lavado, se aplicaron sobre toda la superficie del plato, 500 μ l de solución de despolarización, la cual se preparó

con 30 Mm de KCl y 0.8 % w/v de NaCl, el plato se colocó en la incubadora por 1 min. Las células se despegaron de la superficie del plato sacudiéndolo suavemente y se sembraron en superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina (SIGMA) y PPy.

- **Sembrado sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy**

Las células fueron colocadas en platos de cultivo cubiertos con una mezcla de Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre cubreobjetos polimerizados con Poli pirrol por plasma (PPy). Se les aplicaron 2 ml de medio de cultivo Neurobasal, suplementado con 10 % de suero de caballo inactivado, 1x de Glutamina (GIBCO), 1x de suplemento B27 (GIBCO) y 10 nM de β -Mercaptoetanol (SIGMA).

Una vez que las células se adhirieron a las superficies de cultivo, el medio se cambió por medio de cultivo Neurobasal, suplementado con 10 % de suero de caballo inactivado, 1x de Glutamina, 1x de suplemento B27, 10 nM de β -Mercaptoetanol y 50 μ l de CNTF (Factor neurotrófico ciliar).

Cocultivos celulares

Una vez que se obtuvo un modelo adecuado de motoneurona, en este caso, motoneuronas primarias de ratón, se realizó por separado el crecimiento y diferenciación celular de células de músculo esquelético de neonato y motoneuronas embrionarias de ratón, se realizó el co-cultivo de células primarias de ratón para formar la unión neuromuscular de mamífero en cultivo.

Las células de músculo esquelético de ratón neonato se dejaron crecer durante 30 días para realizar la purificación de fibroblastos del cultivo y así asegurar solo el crecimiento de mioblastos, las células crecieron en forma alineada; se usaron rieles de silicón sobre cajas de cultivo tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina.

Las células musculares se dejaron crecer hasta que cubrieran el espacio entre los rieles de silicón, las células se mantuvieron con medio de crecimiento y una vez que recubrieran el área de cultivo, el medio de cultivo se cambió por medio de diferenciación celular. Las células se dejaron diferenciar por 7 días. Una vez que se obtuvo la alineación y diferenciación de las células de músculo esquelético, se realizó el sembrado de motoneuronas de la médula espinal de embriones de ratón. El cocultivo celular se mantuvo con medio de crecimiento para motoneuronas. El sembrado de las células se realizó con una proporción del 30 % de células de músculo esquelético y 70 % de motoneuronas. Esto para evitar que una sobre población de células musculares matara a las motoneuronas en el cocultivo.

Técnicas de Inmunofluorescencia celular

Células musculares en cajas de cultivo y cubreobjetos recubiertos con PPy

Las técnicas de inmunofluorescencia y de microscopía confocal ayudaron a localizar las proteínas específicas de células musculares en las diferentes superficies de cultivo utilizadas. Las células fueron observadas con el microscopio confocal LSM 710 AxioObserver, Carl Zeiss. Las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 25 % por 10 min. Se permeabilizaron las membranas celulares con Triton al 0.1 % por 10 min. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS. Se utilizó el anticuerpo anti-miosina dilución 1:500 junto con el fluorocromo FITC 1:400. Además se localizó el ADN celular, marcando los núcleos celulares con Hoechst 1:500.

Células nerviosas y motoneuronas de ratón en Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy

Una vez que las células crecieron sobre las diferentes superficies, se realizó el marcaje de proteínas específicas de células nerviosas y en específico de motoneuronas. Se localizaron en los cultivos la proteína específica Sinaptofisina (Syn) para observar la presencia de sinapsis celulares dentro del cultivo y Transportadores vesiculares de Acetilcolina (VChat) para localizar en específico a las motoneuronas purificadas de los cultivos celulares. Las células fueron observadas con el microscopio confocal LSM 710 AxioObserver, Carl Zeiss. Las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 25 % por 10 min. Se permeabilizaron las membranas celulares con Triton al 0.1 % por 10 min. Se utilizó 1:1000 anti-sinaptofisina con el fluorocromo 1:200 Texas-Red; anti-VChat 1:800 con fluorocromo 1:400 FITC (todo obtenido de GIBCO).

- Viabilidad celular de las células nerviosas sembradas sobre Poli-DL-Ornitina y PPy

Para poder observar la supervivencia celular de nuestros cultivos se decidió medir la viabilidad celular de la motoneuronas, marcando los núcleos celulares con Hoechst [1:500] y se hizo una medición del diámetro nuclear. Las células fueron lavadas con PBS y se aplicó Hoechst por 15 min a 37 °C. Las células se lavaron 5 veces con PBS y se les aplicó Fluorshield. Las células se observaron con el microscopio confocal LSM 710-AxioObserver, Carl Zeiss. Una vez que se observó la tinción de los núcleos celulares, se midió el diámetro de los núcleos, con ayuda del software ImageJ y Zen 2011. Se realizó un análisis estadístico con el software GraphPad Prisma 5, para observar si hubo algún cambio en el diámetro nuclear a lo largo del tiempo de cultivo que fuera un indicativo del deterioro celular, ya que se tiene reportado, que en células dañadas el diámetro nuclear se ve reducido en más del 20 % [89, 90].

Cocultivo celular

Para poder observar en el cocultivo los dos tipos celulares, motoneuronas y músculo esquelético, se utilizó un doble marcaje; además para comprobar la formación de la unión

neuromuscular entre ambas células, se utilizó un marcador específico de la placa neuromuscular.

Las células fueron observadas con el microscopio confocal LSM 710 AxioObserver, Carl Zeiss. Las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 25 % por 10 min. Se permeabilizaron las membranas celulares con Triton al 0.1 % por 10 min. Se utilizó anti-VChat 1:800 con fluorocromo 1:400 FITC para localización de las motoneuronas. Se utilizó el anticuerpo anti-miosina 1:500 junto con el fluorocromo FITC 1:400 para la localización de las células de músculo esquelético. En el caso de la placa neuromuscular se utilizó el conjugado de neurotoxina y fluorocromo (alfabungarotoxina y tetrametilrodamina (1:800)). Se marcó el núcleo celular de los dos tipos celulares con Hoechst 1:500 (todo obtenido de GIBCO). Las muestras fueron montadas en Fluorshield (SIGMA).

Electrofisiología celular

Células musculares de ratón

El registro electrofisiológico de las células de músculo esquelético nos permitió conocer el comportamiento eléctrico de las células en las diferentes superficies de crecimiento. Las células fueron bañadas en solución extracelular de mamífero compuesta de: 4.5 mM KCl, 151.5 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ y 5 mM HEPES con un pH de 7.4 ajustado con NaOH. Se utilizaron micropipetas de boro silicato, estiradas con el estirador horizontal Sutter Instruments, Model P-97), obteniéndose pipetas de 60 MΩ. Las pipetas fueron rellenas con 3M KCl (todo obtenido de JT. BAKER).

Se utilizó la técnica de fijación de corriente para medir la actividad eléctrica de las células musculares, Se utilizó el amplificador DAGAN 8100 (Single Electrode System). Los potenciales de acción fueron registrados utilizando la configuración de fijación de corriente, las células fueron estimuladas con pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante.

Los protocolos de estimulación de corriente, así como la sincronización de las señales de adquisición, se digitalizaron a través de la tarjeta de conversión digital DIGIDATA 1200. Las señales fueron procesadas y analizadas con el programa Clampfit 10.2 y GraphPad Prisma 5.0. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente.

Células nerviosas y motoneuronas de ratón

Se midieron corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺, así como los potenciales de acción presentes en una población de células nerviosas obtenidas de la zona lumbar de la médula espinal sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina y Poli Pirrol. Las células que se registraron fueron aquellas que presentaron un diámetro aproximado a 20 μm.

Se utilizó la técnica patch clamp en su configuración de fijación de corriente y de voltaje. Las células fueron bañadas con solución extracelular de mamífero, compuesta de: 4.5 mM KCl, 151.5 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ y 5 mM HEPES (J.T. Baker, USA), se

utilizaron pipetas de vidrio de boro silicato (World Precision Instruments, FIL glass 4IN 1BBL NO), las pipetas fueron estiradas utilizando un estirador horizontal (Sutter Instruments, Model P-97) obteniéndose pipetas con resistencias 2-4 M Ω , las pipetas fueron rellenas con solución intracelular de mamífero, compuesta de: 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES (J.T. Baker, USA).

Se utilizó el amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments), en su configuración de fijación de voltaje, se fijó a un voltaje de mantenimiento de -70 mV, se aplicaron 10 pulsos de voltaje con incrementos de 10 mv para provocar la apertura de canales voltaje dependientes y medir las corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺. Los potenciales de acción fueron registrados utilizando la configuración de fijación de corriente, las células fueron estimuladas con pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante.

Los protocolos de estimulación de corriente y voltaje, así como la sincronización de las señales de adquisición se digitalizaron a través de la tarjeta de conversión digital DIGIDATA 1200. Las señales fueron procesadas y analizadas con el programa Clampfit 10.2 y GraphPad Prisma 5.0. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente.

Conductancias celulares (gNa⁺, gK⁺)

Se analizaron detalladamente las corrientes de K⁺ de neuronas cultivadas sobre Poli-Pirrol y sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina. Las corrientes de K⁺ obtenidas se normalizaron con respecto a la capacitancia de la membrana. Esto es indispensable debido a que las corrientes iónicas se tienen que normalizar con respecto al área de superficie de la neurona y la capacitancia es directamente proporcional al área de superficie de la membrana celular. El análisis comparativo de las corrientes iónicas de las neuronas en diferentes superficies de cultivo tiene que ser en términos de densidad de corriente. Para la obtención de la capacitancia de la membrana se evaluó el área bajo la curva de las corrientes capacitivas inducidas por un pulso de -10 mV y 10 ms de duración a partir del potencial de mantenimiento. Una vez normalizadas las corrientes se realizaron gráficas para la conductancia de la membrana vs el potencial de membrana; a los puntos se les ajustó la ecuación de Boltzmann obteniendo los parámetros de ajuste que son característicos del tipo de corriente iónica [91]. Un procedimiento similar se realizó para las corrientes de Na⁺; en este caso, se midió la corriente de Na⁺ máxima obtenida con el pulso de fijación del voltaje de 10 ms de duración.

Camas de fibras de PLA por electrohilado

La técnica de electrohilado es actualmente la única técnica que permite la fabricación de fibras continuas con diámetros de hasta unos pocos nanómetros. El método puede ser aplicado a los polímeros sintéticos, naturales y mezclas de polímeros. En este trabajo se utilizó un polímero de PLA por su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Se utilizó el Biopolímero de PLA, INGEO 3251D de NatureWorks TM aprobado por FDA para ser usado en empaques de comida, el lote usado fue el ZC2428B113 proporcionado por PROMAPLAST-México. Las características del INGEO 3251D son: Temperatura de fusión de 188-210 °C, gravedad específica 1.24, Tg de 55-65 °C. Se disolvió 1.2 g del

biopolímero en 9 ml de cloroformo a temperatura ambiente, antes de iniciar el proceso de electrohilado se le agregó 1 ml de etanol. La fuente de alto voltaje utilizada fue marca PHYWE- GERMANY HV-Power Supply de 0-25 kV. La solución del biopolímero se inyectó con un sistema de bombeo de jeringas fabricado y controlado con un servo mecanismo diseñado en en la UAM-Izt. Para generar fibras se utilizó una jeringa de plástico con aguja 20G de punta plana con un diámetro interior de 0.6 mm.

La aguja se conectó a la fuente de alimentación para cargar la solución de polímero. Un tambor giratorio formado por hilos de nylon (22.0 mm de diámetro) conectado a un motor se utilizó como el colector de fibras. Velocidades de rotación de 250 rpm a una distancia lineal de 5.5 cm. Se utilizaron las siguientes condiciones en los experimentos: (a) un voltaje aplicado de 20 kV, (b) una distancia de 5.5 cm entre la punta de la aguja y el colector, (c) tiempo de la recolección: 1 h (a menos que se indique otro tiempo), y (d) una temperatura ambiente constante de 26 °C y una humedad relativa constante de 58 %. Las fibras fueron colocadas en hornos a una temperatura de 50 °C por 1 semana para retirar por completo los restos de cloro que pudieran quedar adheridos en las fibras.

Sembrado celular en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

Sembrado de células musculares de ratón

Las fibras electrohiladas fueron colocadas dentro del horno de secado por 7 días, una vez que se aseguró la evaporación del cloro, las fibras fueron colocadas por 15 días más en esterilización bajo luz UV. Posteriormente, antes de realizar el sembrado celular, las camas electrohiladas fueron colocadas en cajas Petri con medio de cultivo D-MEM sin suplementar, para quitar el exceso de ácido que pudiera liberar al estar en un medio acuoso. Se midió diariamente el pH del medio de cultivo en donde se encontraban inmersas las fibras y después de 7 días el pH se mantuvo en 7.2 que es el adecuado para el crecimiento celular.

Una vez terminado este proceso en las fibras, las células se mantuvieron bidimensionalmente como mioblastos, las células se despegaron de las cajas de cultivo mecánicamente y con PBS, se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. Se resuspendieron con medio de cultivo enriquecido para mioblastos, se contaron en una cámara de Neubauer y se colocaron 1×10^6 células en 2 ml de medio en cada cama de fibras de PLA y PLA-PPy con una área de 1 cm².

Después de 15 días de cultivo con medio enriquecido para mioblastos, el medio fue cambiado por medio de diferenciación hacia miotubos, la diferenciación se llevó por 25 días, cambiando el medio a diario.

Sembrado de motoneuronas de la médula espinal de ratón

Al igual que en el crecimiento de mioblastos, a las camas de fibras electrohiladas se les dio el mismo tratamiento para que fueran adecuadas para el cultivo celular. Una vez que se obtuvieron las células de la médula espinal, las células fueron tratadas con Lectina y se realizó la despolarización para obtener únicamente motoneuronas en el cultivo; éstas

fueron colocadas en un tubo de 15 ml y se procedió a hacer el conteo en la cámara de Neubauer. Se sembraron 100×10^3 células en 1 ml de medio de anclaje en una cama de fibras de PLA y PLA-PPy con un área de 1 cm^2 , una vez que las células se anclaron a las fibras, se cambió el medio de anclaje por medio enriquecido para el adecuado crecimiento de motoneuronas.

Inmunofluorescencia celular

Células musculares en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

Las técnicas de inmunofluorescencia y de microscopia confocal, ayudaron a localizar las proteínas específicas de células musculares distribuidas en el interior de las camas de fibras electrohiladas. Las células fueron observadas con el microscopio confocal LSM 710 AxioObserver, Carl Zeiss. Las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 25 % por 10 min. Se permeabilizaron las membranas celulares con Triton al 0.1 % por 10 min. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS. Se utilizó el anticuerpo anti-miosina 1:500 junto con el fluorocromo FITC 1:400. Además se localizó el ADN celular, marcando los núcleos celulares con Hoechst 1:500. Las muestras fueron mantenidas en platos de cultivo y se aplicó Fluorshield (Sigma) para mantener la fluorescencia de las muestras.

Motoneuronas en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

Una vez que las células se adhirieron a las fibras, se realizó el marcaje de proteínas específicas a células nerviosas y en específico a motoneuronas. Se localizaron en los cultivos las proteínas específicas hacia Transportadores vesiculares de Acetilcolina (VChat). Las células fueron observadas con el microscopio confocal LSM 710 AxioObserver, Carl Zeiss. Las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 25 % por 10 min. Se permeabilizaron las membranas celulares con Triton al 0.1 % por 10 min, se lavaron las muestras 5 veces con PBS. Se utilizó anti-V-Chat 1:800 con fluorocromo FITC 1:400. Se marcó además el núcleo de las células con Hoechst 1:500. Las células fueron montadas en Fluorshield.

Electrofisiología celular

La electrofisiología celular sólo se realizó en los cultivos de motoneuronas sobre camas de PLA y PLA-PPy, debido a que las células musculares se adhirieron planarmente a la superficie de la fibra de PLA, provocando que al ser registradas intracelularmente, las puntas de las pipetas perforaran por completo las células. En el caso de "patch clamp", las puntas obtenidas se tragaban las células y no se podía realizar el rompimiento de la membrana.

Para el caso de motoneuronas, se midieron corrientes iónicas de Na^+ y K^+ , así como los potenciales de acción presentes en una población de células nerviosas obtenidas de la zona lumbar de la médula espinal sembradas sobre camas de fibras de PLA y PLA-PPY. Las células que se registraron fueron aquellas que presentaron un diámetro aproximado a $20 \mu\text{m}$.

Se utilizó la técnica patch clamp en su configuración de fijación de corriente y de voltaje. Las células fueron bañadas con solución extracelular de mamífero compuesta de: 4.5 mM KCl, 151.5 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ y 5 mM HEPES (J.T. Baker, USA), se utilizaron pipetas de vidrio de boro silicato (World Precision Instruments, FIL glass 4IN 1BBL NO), las pipetas fueron estiradas utilizando un estirador horizontal (Sutter Instruments, Model P-97) obteniéndose pipetas con resistencias 2-4 MΩ, las pipetas fueron rellenas con solución intracelular de mamífero compuesta de: 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES (J.T. Baker, USA).

Se utilizó el amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments), en su configuración de fijación de voltaje se fijó a un voltaje de mantenimiento de -70 mV, se aplicaron 10 pulsos de voltaje con incrementos de 10 mV para provocar la apertura de canales voltaje dependientes y medir las corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺. Los potenciales de acción fueron registrados utilizando la configuración de fijación de corriente, las células fueron estimuladas con pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante.

Los protocolos de estimulación de corriente y voltaje, así como la sincronización de las señales de adquisición se digitalizaron a través de la tarjeta de conversión digital DIGIDATA 1200. Las señales fueron procesadas y analizadas con el programa Clampfit 10.2 y GraphPad Prisma 5.0. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente y sin perfusión.

Resultados y discusión (Células de músculo esquelético)

Polimerización por plasma y FT-IR

En la Fig. 12 se muestran las imágenes de los cubreobjetos y de las fibras electrohiladas de PLA. En la polimerización por plasma se obtuvo el recubrimiento superficial de los cubreobjetos y de las fibras de PLA; se observa una delgada capa de PPy depositada sobre la superficie de los mismos, los cuales sirvieron como superficies de crecimiento de células primarias de músculo esquelético, motoneuronas derivadas de células troncales de ratón, células nerviosas y motoneuronas.



Fig.12 Polimerización por plasma y materiales polymerizados. Reactor de plasma polymerizando los materiales (Izq.). Cubreobjetos (Centro) y fibras electrohiladas de PLA (Der.) polymerizados con Pirrol.

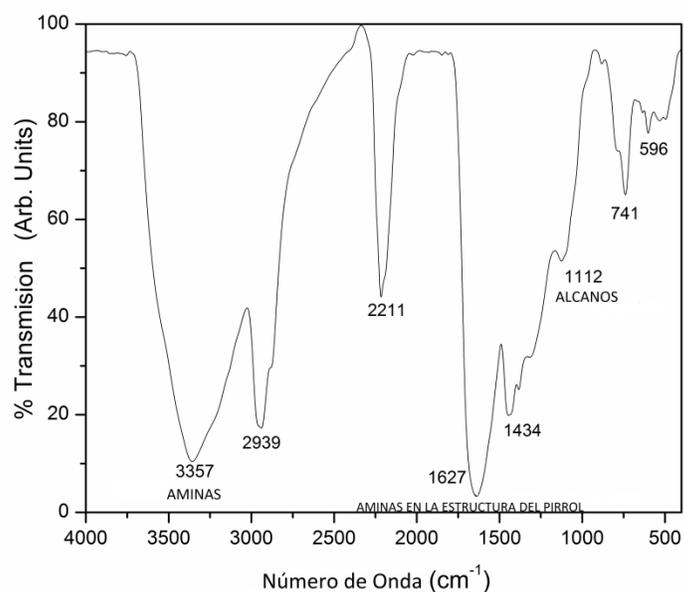


Fig. 13 Espectro de transmisión por FT-IR del PPy.

La Fig. 13 muestra el análisis de transmisión por FT-IR. Todos los picos característicos del PPy se pueden observar [77, 83]. Los picos en 3357 cm⁻¹ y 1627 cm⁻¹ corresponden a

los grupos aminos en la estructura del PPy. El pico ancho en el rango de 500-1000 cm^{-1} contiene muchas absorciones correspondiente a alcanos de la ruptura de los anillos de pirrol durante la polimerización. La anchura de los picos indica la compleja absorción en el polímero debido al entrecruzamiento, enlazamiento e interacciones entre los grupos del pirrol.

Cultivos celulares primarios de células de músculo esquelético de ratón

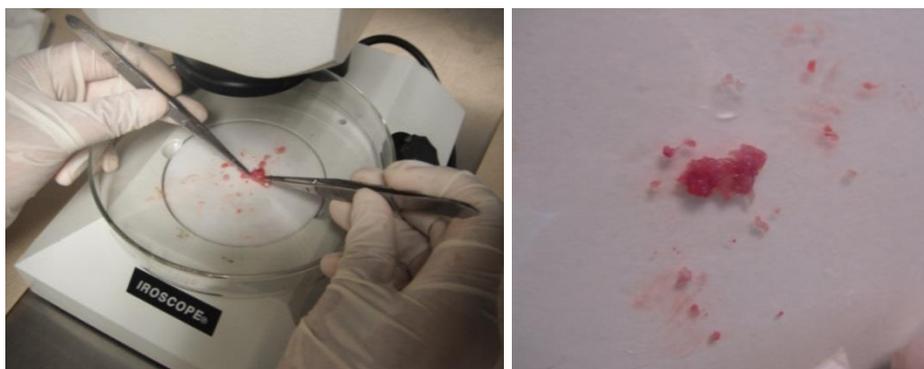


Fig. 14 Disección de tejido muscular de las extremidades superiores e inferiores de ratones neonatos de la cepa CD-1

Se realizó la disección de músculo esquelético de las 4 extremidades de 5 ratones neonatos de la cepa CD-1. El músculo retirado de las 4 extremidades fue mantenido en hielo hasta obtener todo el tejido, el cual fue disgregado de forma mecánica y química (Fig. 14). Después de los procesos de disgregación, se realizó el conteo celular por cámara de Neubauer, se obtuvieron 2.5×10^6 células en 1ml de medio. Las células obtenidas se colocaron en platos de cultivo de 100 mm y se incubaron a 37 °C y 5% CO_2 .

Sembrado sobre cajas de cultivo y cubreobjetos recubiertos con PPy

Después de colocar las células en condiciones adecuadas de crecimiento, la aparición de mioblastos y fibroblastos se pudo ver a partir del 5^o día de cultivo, la obtención de mioblastos se hizo por depuración de fibroblastos por 30 días de subcultivación constante. En la Fig.15 a) se pueden ver células musculares después de 5 días de cultivo, se observa una alta densidad celular al crecimiento en conjunto de fibroblastos y células musculares. En Fig.15 b) se observan células musculares con 15 días de cultivo, en donde hay una menor densidad celular debido a la muerte de fibroblastos provocada por la falta de nutrientes específicos para su desarrollo. Se continuó con la depuración de fibroblastos por subcultivación, para obtener un cultivo en su mayoría de células de músculo esquelético.

Una vez obtenida la depuración, se llevaron a cajas de cultivo celular de 35 mm, al obtener el crecimiento de mioblastos, se comenzó con el proceso de diferenciación (fusión) celular hacia miotubos. El proceso de diferenciación celular para obtener la fusión de los mioblastos nos llevó a la obtención de miotubos como los mostrados en la Fig. 16 (flechas). Se observaron células musculares fusionadas en miotubos de larga longitud y

de morfología muy similar a lo ya reportado en la literatura. En Fig. 16 a) se observan mioblastos depurados por 30 días y la eliminación de fibroblastos. En Fig. 16 b) ya se observa la fusión de los mioblastos para formar un miotubo después de 7 días de diferenciación celular.

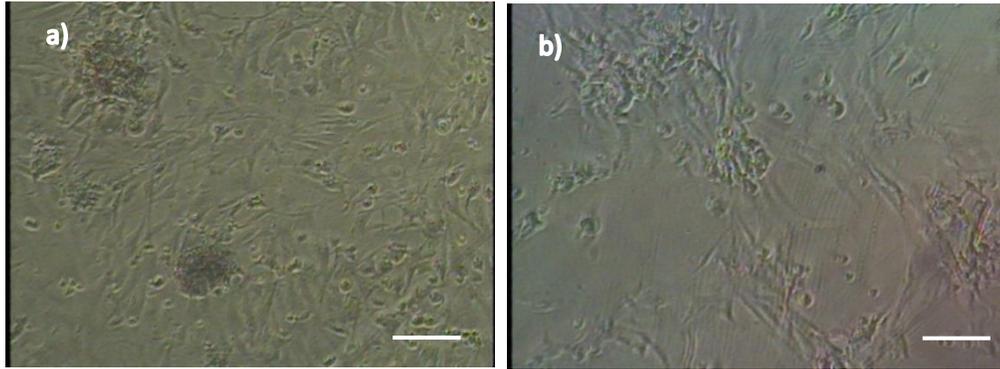


Fig. 15 Cultivo primario de músculo esquelético de ratón a los 5 (a) y 15 (b) días de cultivo (Contraste de Fases, Barra 50 micras, ampliación original x 100)

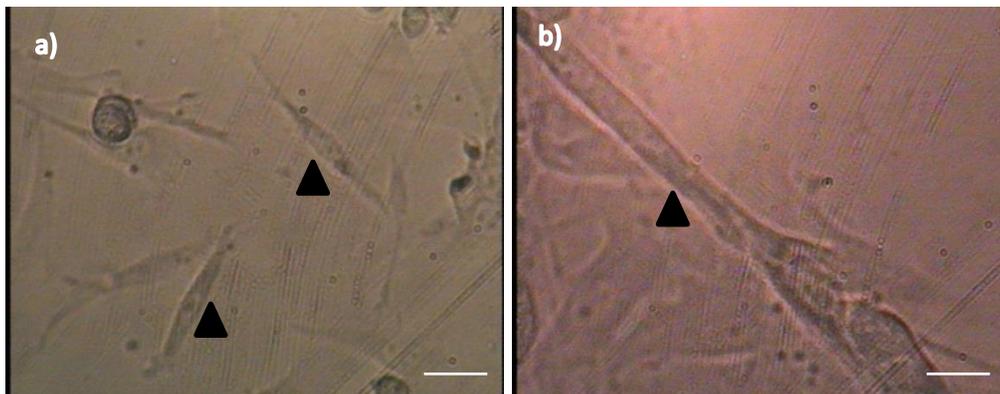


Fig. 16 Mioblastos y miotubos primarios de ratón. (a) Mioblastos primarios de ratón obtenidos por la técnica de depuración de fibroblastos (Contraste de fases, Barra= 50 micras, ampliación original x100). (b) Miotubos obtenidos por diferenciación de mioblastos primarios (Contraste de fases, Barra=50 micras, Ampliación original x400)

Una vez obtenida la depuración y diferenciación celular, se realizó el sembrado de mioblastos en superficies recubiertas de PPy. En la Fig.17 en a) y b) se observa una célula muscular diferenciada sobre cubreobjetos cubiertos con PPy, se observa la formación del miotubo sobre la superficie polimerizada (flechas), presentando una morfología alargada muy parecida al miotubo mostrado en la Fig. 16b por lo que la morfología de los miotubos se conservó en ambas superficies de cultivo, lográndose después de 30 días de cultivo y 7 días de diferenciación. Se puede observar que la técnica usada para depuración nos permitió obtener un cultivo sin o con muy baja contaminación por fibroblastos y una vez obtenidos se logró realizar la diferenciación de

mioblastos a miotubos, en ambas superficies de cultivo celular, mostrando buenas características de crecimiento y diferenciación.

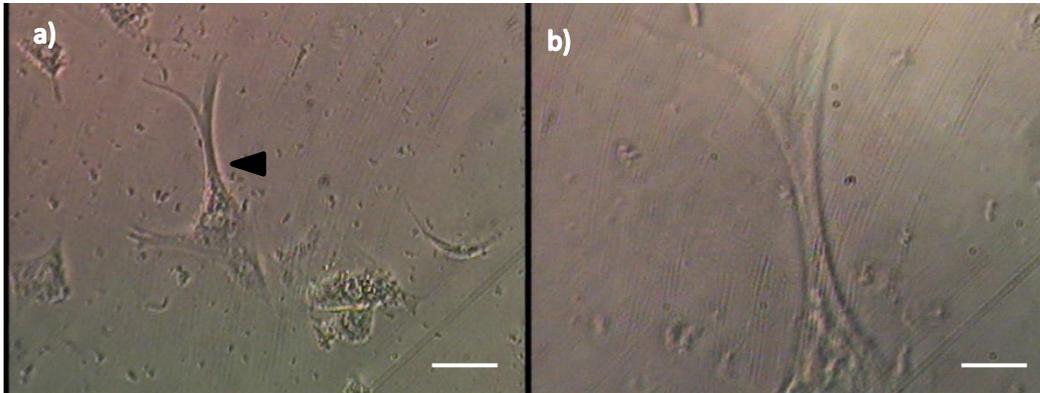


Fig. 17 Miotubos de ratón en superficies de PPy. (a) Miotubos primarios de ratón obtenidos por la técnica de depuración de fibroblastos (Contraste de fases, Barra= 50 micras, ampliación original x100). b) Miotubos obtenidos por diferenciación de mioblastos primarios (Contraste de fases, Barra=50 micras, Ampliación original x400)

Crecimiento alineado de células musculares primarias

Para lograr la alineación de nuestras células musculares semejante a la del tejido muscular, se realizó la formación de rieles de silicón sobre cajas de cultivo y sobre los materiales polimerizados.

En la Fig. 18 a) y b) se puede ver la alineación de miotubos primarios en rieles de silicón colocados en cajas de cultivo y en la Fig. 18 c) y d) se puede ver la alineación de miotubos en rieles de silicón en los cubreobjetos polimerizados con PPy. Se observa en todas las imágenes mostradas una alineación de los miotubos, lograda al insertar una guía de crecimiento con un área reducida para la células, que provocó que las células crecieran en su mayoría de forma ordenada y paralelas a los rieles de silicón. Se observa un comportamiento similar de alineación de las células en cada superficie de cultivo utilizada, permitiéndonos obtener miotubos con una orientación paralela entre ellos, lo cual permitió que el tejido muscular creciera de manera alineada y ordenada.

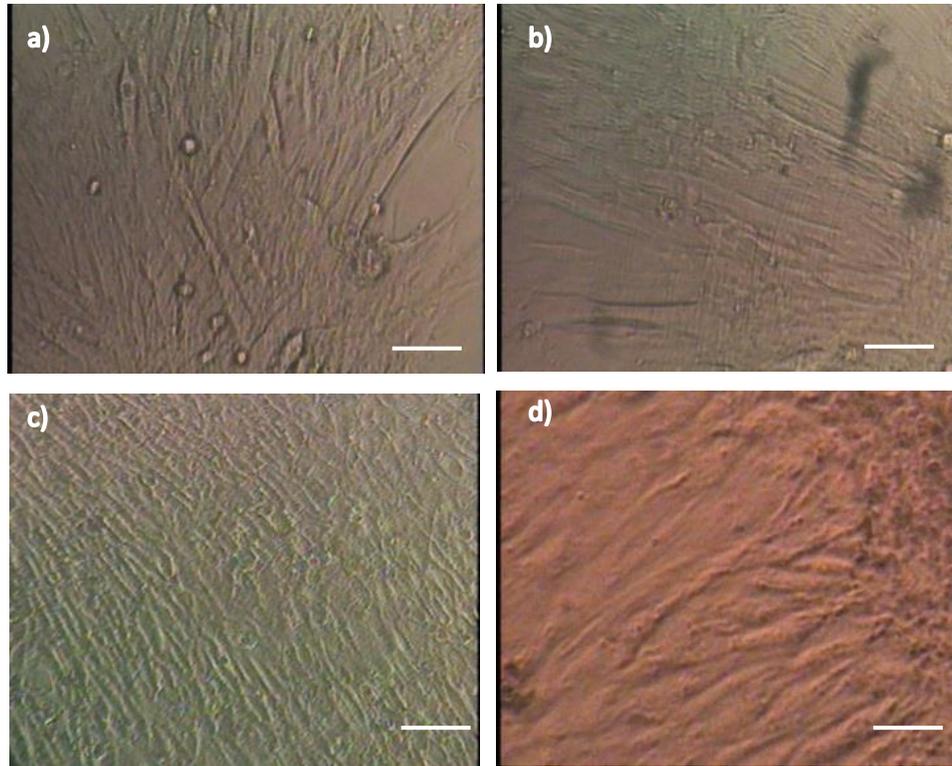


Fig. 18 Células de músculo esquelético alineadas por rieles de silicón. a) y b) alineación con rieles de silicón en cajas de cultivo. c) y d) alineación por rieles de silicón en superficies recubiertas con PPy (Contraste de fases, Barra=50 micras. Ampliación original x400)

Técnicas de inmunofluorescencia celular

Células musculares en cajas de cultivo y cubreobjetos recubiertos con PPy

El uso de Anti-Miosina en conjunto con el fluorocromo FITC, nos permitieron visualizar la proteína miosina localizada en las células músculo esqueléticas en ambas superficies de cultivo; la miosina es una proteína fibrosa cuyos filamentos tienen una longitud de 1,5 micrómetros y un diámetro de 15 nanómetros y está implicada en la contracción muscular por interacción con la actina. La miosina es la proteína más abundante del músculo esquelético, representa entre el 60 % y 70 % de las proteínas totales y es el mayor constituyente de los filamentos gruesos.

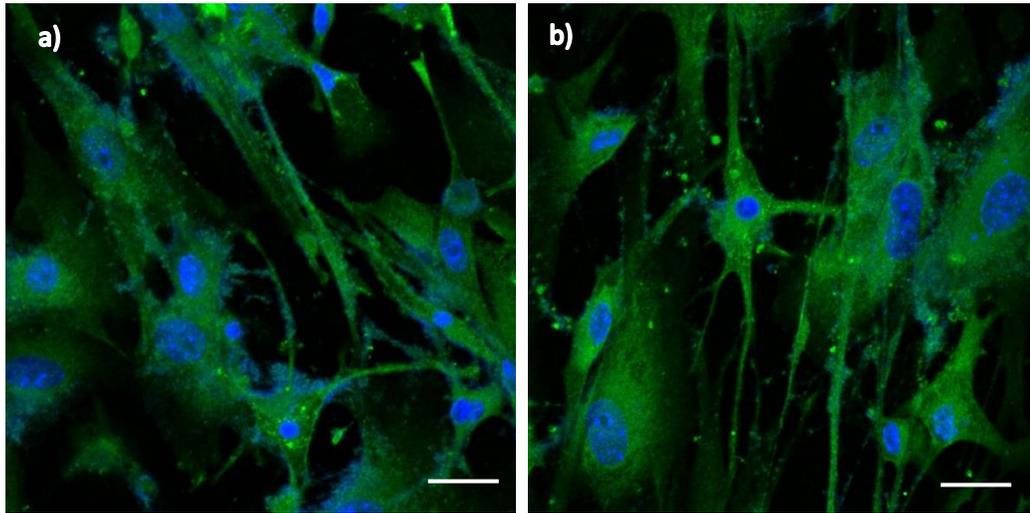


Fig. 19 Células de músculo esquelético de ratón por microscopía de fluorescencia. a) células de músculo esquelético en Poli-DL-Ornitina/Laminina. b) células musculares en PPy (Anti-Miosina-FITC, Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x100)

En la Fig. 19 a) se puede ver el marcaje de la proteína miosina localizada por el anticuerpo anti miosina y el fluorocromo FITC (verde) en células de músculo esquelético de ratón con 15 días de diferenciación, además se observa el marcaje del ADN celular por Hoechst contenido en el núcleo de las células musculares sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina. En la Fig. 19 b) se puede observar el marcaje de miosina utilizando el mismo anticuerpo y fluorocromo, se marca la proteína de contracción contenida en células musculares con 15 días de diferenciación, además del marcaje del núcleo celular con Hoechst en superficies polimerizadas con PPy. En ambas imágenes se observa la presencia de la proteína contráctil miosina y el marcaje de los núcleos celulares; no se observa la clara formación de miotubos en el cultivo de células, esto debido a que se tomaron las fotos a la mitad de su proceso de diferenciación, pero es importante resaltar que las células musculares aun sin estar fusionadas, es decir, presentándose en forma de mioblastos, presentan proteínas contráctiles. Por lo que el PPy no altera las propiedades de síntesis de proteínas contráctiles en las células musculares en forma de mioblastos o de miotubos.

Electrofisiología Celular

Células musculares de ratón

Los registros electrofisiológicos por fijación de corriente nos permitieron observar los cambios en el potencial de membrana al aplicar pulsos de corriente. Podemos observar en la Fig. 20 cambios hiperpolarizantes y despolarizantes por la inyección de corriente negativa y positiva respectivamente. Las características eléctricas de las células cultivadas sobre cajas de cultivo (Fig. 20a) o superficies con PPy (Fig. 20b) fueron

similares; en ambos casos, únicamente se obtuvieron potenciales de acción lentos de baja magnitud, lo que indica la ausencia o pobre activación de los canales de Na^+ que dan origen a la corriente rápida de Na^+ , una baja densidad de canales iónicos de Na^+ o un pobre desarrollo del sistema tubular T. Los registros se realizaron en células musculares con 10 días de diferenciación.

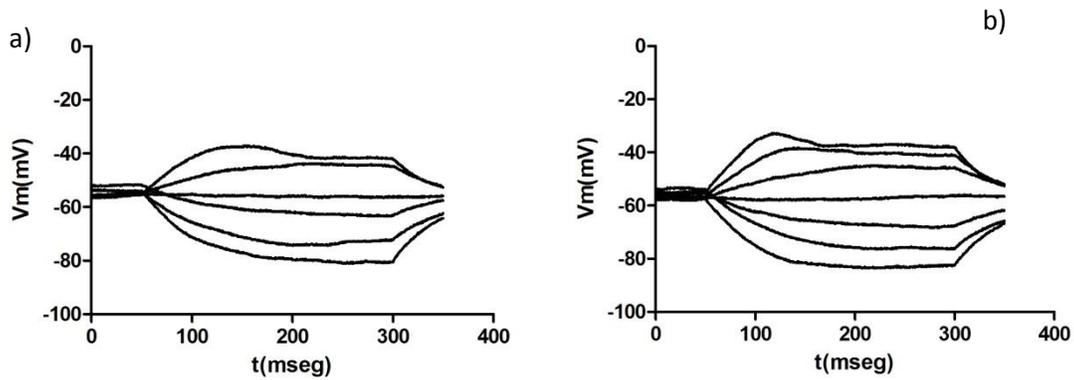


Fig. 20 Potenciales de acción lentos en células musculares. Sembradas en a) Poli-DL-Ornitina/Laminina y b) PPy.

Sembrado celular en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

Sembrado de células musculares de ratón

En la Fig. 21 se muestran las camas electrohiladas de PLA y de camas electrohiladas de PLA/PPy. Se puede observar una tela formada por fibras de PLA fabricadas por la técnica de electrohilado que nos permitieron obtener fibras en el orden de los micrones, las cuales sirvieron como andamio de crecimiento para células musculares, y las telas de fibras cubiertas con PPy que permitieron brindarle un mejor anclaje a las células sobre las superficies polimerizadas.

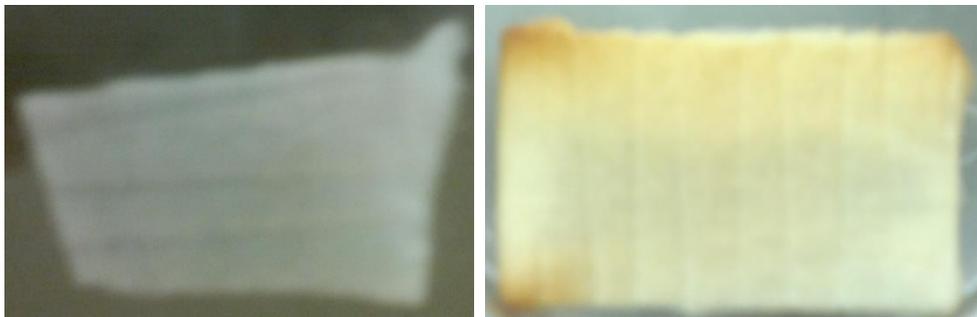


Fig. 21 Camas electrohiladas de PLA (Izq.) y recubiertas superficialmente con PPy (Der.)

Una vez que se retiró el contenido de cloro en las fibras de PLA se prosiguió a realizar el sembrado de las células musculares de ratón neonato. Al obtener las células musculares, se sembraron 1×10^6 células. Las camas de fibras electrohiladas sirvieron como andamios de soporte para el crecimiento tridimensional y alineado de las células de músculo esquelético de ratón.

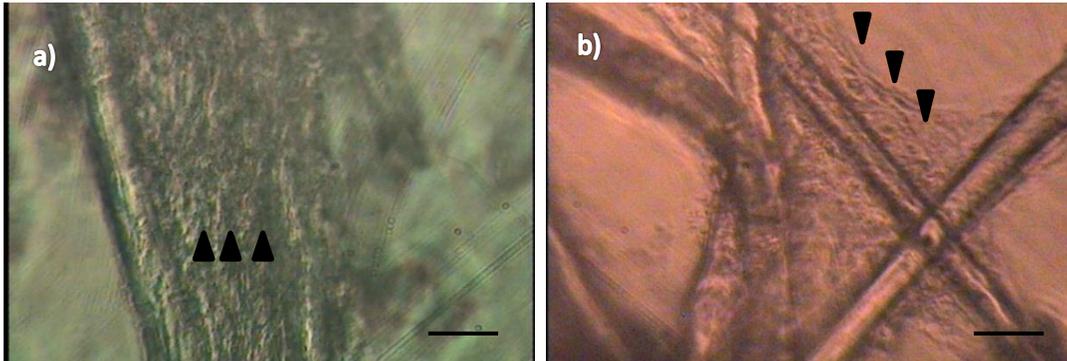


Fig. 22 Células de músculo esquelético sembradas en fibras de PLA (a) y en PLA-PPy (b) (cabezas de flecha indican a las células musculares) (contraste de fases, Barra=50 micras, Amplificación original x400)

En las Fig. 22 a) se observa el crecimiento de células de músculo esquelético de ratón sembradas en camas de PLA con 21 días de diferenciación. Se observa un crecimiento celular paralelo a las fibras electrohiladas de PLA, se puede ver además que las células crecen de manera alineada y en forma volumétrica, ya que el anclaje se da en cada fibra de PLA provocando un crecimiento celular en cada fibra de la cama, se observa la formación de miotubos a lo largo de la fibra de PLA. En el caso de la Fig. 22 b) podemos observar el crecimiento de células musculares diferenciadas a miotubos, en fibras electrohiladas de PLA-PPy con 21 días de cultivo; aquí podemos observar un crecimiento de células ancladas y creciendo sobre diferentes fibras de PLA. Podemos ver que las células al igual que el caso de PLA, siguen un crecimiento ordenado y paralelo a las fibras, se puede ver también la formación de miotubos. Las fibras de PLA y PLA-PPy proporcionan un adecuado andamio de crecimiento para el cultivo alineado y en volumen de fibras musculares.

Inmunofluorescencia celular

Células musculares en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

Para poder observar el crecimiento de las células sobre las camas de fibras de PLA, las células fueron marcadas con Anti-miosina y FITC (verde), ya que como se dijo, es una proteína contráctil localizada en células de músculo esquelético; se marcó el núcleo celular con Hoechst (azul). En la Fig. 23 a) y b) se pueden ver células musculares con 21 días de cultivo en fibras electrohiladas de PLA; las células se anclan a la superficie de la

fibra y crecen paralelamente, y también se observó el crecimiento de racimos celulares sobre la superficie de las fibras de PLA.

En la Fig. 23 c) y d) se observó el crecimiento de células musculares en fibras electrohiladas de PLA-PPy, las células al igual que en a) y b) fueron marcadas con Anti-miosina y FITC (verde) para localizar las células en un campo tridimensional. Se marcaron los núcleos con Hoechst (azul). Se observó el anclaje de las células sobre las superficies de las fibras, permitiendo que éstas crecieran de forma paralela a la fibra, también se observó el crecimiento en forma de racimos sobre la superficie de las fibras. Se puede ver que las fibras de PLA y PLA-PPy brindan un adecuado anclaje a las células, permitiendo que las células crezcan de forma alineada y se puedan diferenciar a miotubos, además de que permite la síntesis de la proteína miosina, necesaria en los mecanismos de contracción muscular.

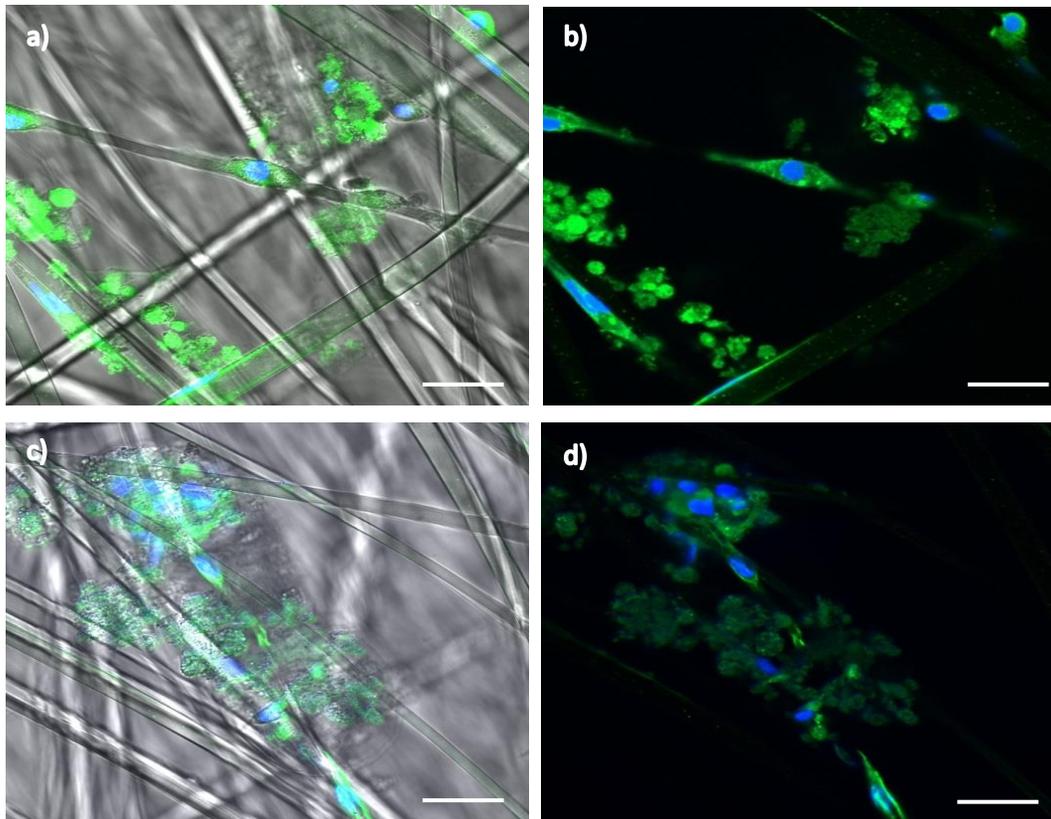


Fig. 23 Microscopía confocal del crecimiento de células de músculo esquelético en fibras electrohiladas de PLA (a, b) y PLA-PPy (c,d) (Anti-Miosina-FITC, Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x400)

Resultados y discusión (Células troncales embrionarias, células nerviosas y motoneuronas)

Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a motoneuronas

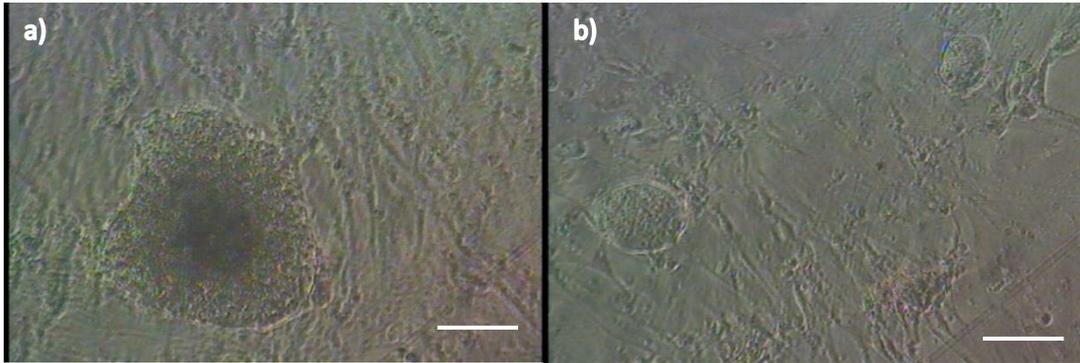


Fig. 24 Aglomerados celulares de células troncales embrionarias (Contraste de fases, Barra=50 micras, Amplificación original x250, x100)

En la Fig. 24 a) y b) se observó el crecimiento de agregados celulares de células troncales embrionarias de ratón HBG3, creciendo sobre fibroblastos mitóticamente inactivados. Este tipo de agregados celulares indican la reproducción de células troncales en el cultivo. Los agregados posteriormente fueron cultivados en suspensión para formar cuerpos embrionarios y comenzar con los procesos de diferenciación celular hacia motoneuronas como se ve en la Fig. 25. En a) y b) podemos ver el crecimiento y formación de cuerpos embrionarios en suspensión. En a) se observa la formación del cuerpo embrionario visto por microscopía convencional de campo claro. En b) es clara la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP⁺), la cual es un indicativo del adecuado proceso de diferenciación llevado a cabo por la adición de Sonic Hedgehog (SHH) y Ácido retinoico (RA).

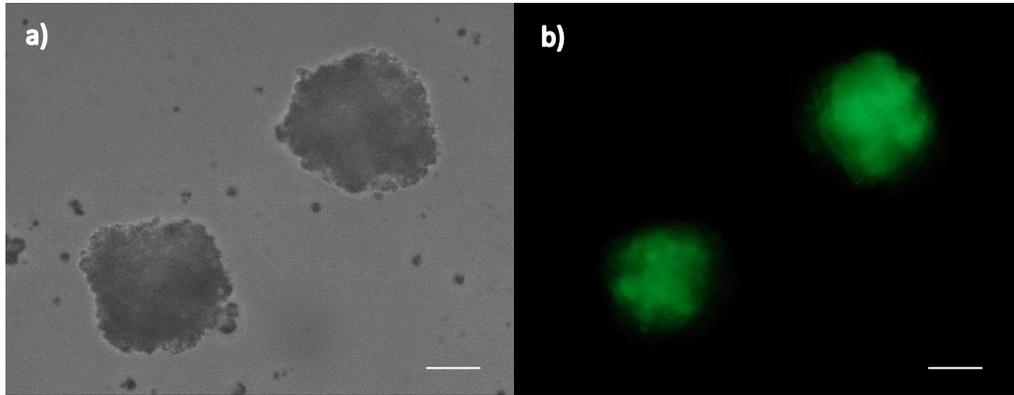


Fig. 25 Cuerpos embrionarios en suspensión vistos en campo claro (a), y en fluorescencia expresando GFP⁺ (b) (GFP⁺, Barra=50 micras, Amplificación original x250)

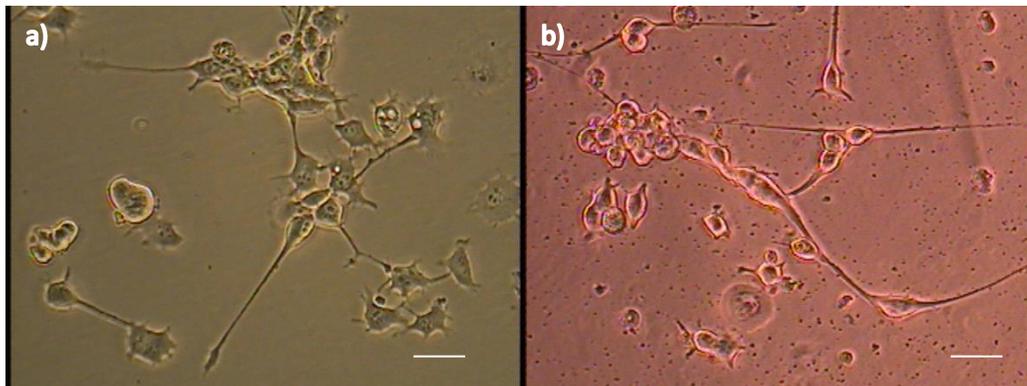


Fig. 26 Motoneuronas con 3 días de diferenciación sobre Matrigel (a) y en PPy (b)

En la Fig. 26 podemos observar la disgregación de los cuerpos embrionarios para poder ser cultivados sobre cajas cubiertas en matrigel y en cubreobjetos con PPy, esto con el fin de que las células puedan tomar la morfología de motoneuronas. Se observa en a) y en b) el desarrollo morfológico de la células, se observan la presencia de un cuerpo somático y en ambos casos la aparición de ramificaciones dendríticas, la cual es una morfología muy similar a la morfología reportada en la literatura [88], la supervivencia celular en ambas superficies de cultivo fue de 5 días, por lo que el PPy es una superficie de crecimiento que soporta la diferenciación de células troncales hacia motoneuronas.

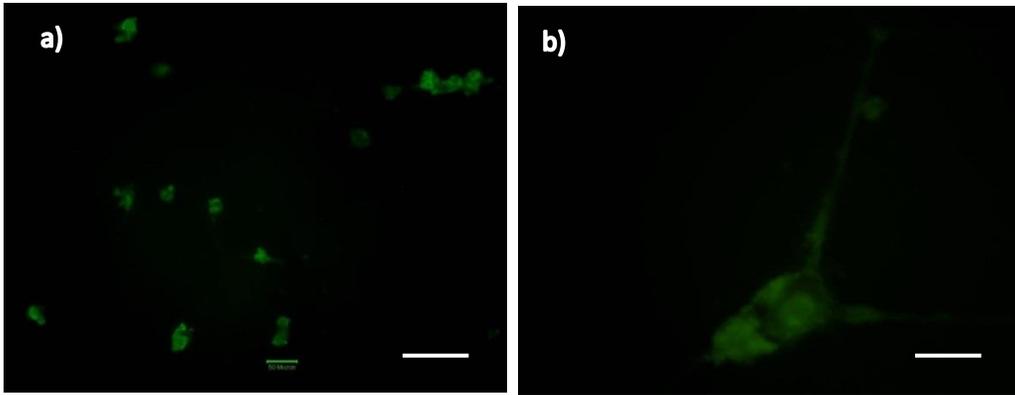


Fig. 27 Motoneuronas GFP+ derivadas de células troncales embrionarias en Matrigel (a) y en PPy (b) (GFP⁺, Barra=50 micras, Amplificación original x100, x250)

En la Fig. 27 a) y b) se observa el crecimiento de motoneuronas sobre matrigel y PPy expresando la proteína verde fluorescente. Al realizar un conteo por citometria de flujo, se obtuvo que de un conteo inicial de 300×10^3 células cultivadas en ambas superficies de cultivo Matrigel y PPy, 190×10^3 células se anclaron a la superficie del plato con Matrigel, obteniéndose un 63.3 % de supervivencia celular; se obtuvieron 31 000 células diferenciadas hacia motoneuronas (GFP positivas), por lo que obtuvimos una diferenciación del 16.3 %. En el caso de las células sembradas en cubreobjetos con PPy se obtuvieron 180×10^3 células ancladas, obteniéndose un 61 % de supervivencia celular de las cuales 29 000 células se diferenciaron hacia motoneuronas (GFP⁺) obteniéndose una tasa de diferenciación del 16.1 %, lo cual en ambos casos se encuentra dentro de los parámetros reportados en la literatura [86, 88].

Cultivos de células nerviosas y de motoneuronas

Obtención de células nerviosa de ratón

Una vez lograda la disección de la médula espinal y el proceso de disgregación química mecánica para la obtención de células de la médula espinal como se muestra en la Fig. 28, se realizó el conteo celular por cámara de Neubauer, obteniéndose 850×10^3 células.



Fig. 28 Disgregación mecánica y química de la médula espinal de ratón. Izq. Médula espinal de ratón. Der. Sección lumbar de la médula espinal de ratón.

Sembrado sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy

Las células nerviosas obtenidas fueron sembradas en superficies cubiertas por Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy. Los resultados del crecimiento de células nerviosas se pueden ver en la Fig. 29. En la Fig. 29 a), b) y c), se muestra el desarrollo morfológico de células nerviosas a 3, 5 y 8 días de cultivo sembradas en superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina, en las células se puede ver el desarrollo de prolongaciones nerviosas a partir de los 3 días de cultivo. Después de 5 días, las células continuaban con su desarrollo morfológico hasta los 8 días de cultivo en donde llegaron a su completo desarrollo y comenzó el deterioro y muerte celular.

En la Fig. 29 d), e) y f) se presenta el desarrollo morfológico de células nerviosas sembradas en PPy, se pueden ver células nerviosas con 3, 8 y 21 días de cultivo. El desarrollo celular fue más lento, ya que a los 3 días se observan prolongaciones nerviosas de poca longitud. A los 8 días de cultivo se observa que las células nerviosas, comienzan a tener un mayor desarrollo de sus prolongaciones nerviosas, presentando una morfología celular más parecida a lo reportado en la literatura para células de este tipo. A los 21 días de cultivo sobre PPy se observa que las prolongaciones han llegado a su mayor longitud, y que por lo tanto se tiene ya un completo desarrollo de las células. Cabe destacar que hasta los 21 días de cultivo se presentó la aparición de restos celulares en el cultivo pero no afectaron a las células nerviosas. El cultivo se mantuvo por 28 días debido a que ya se observaba una mayor cantidad de restos celulares y de muerte celular.

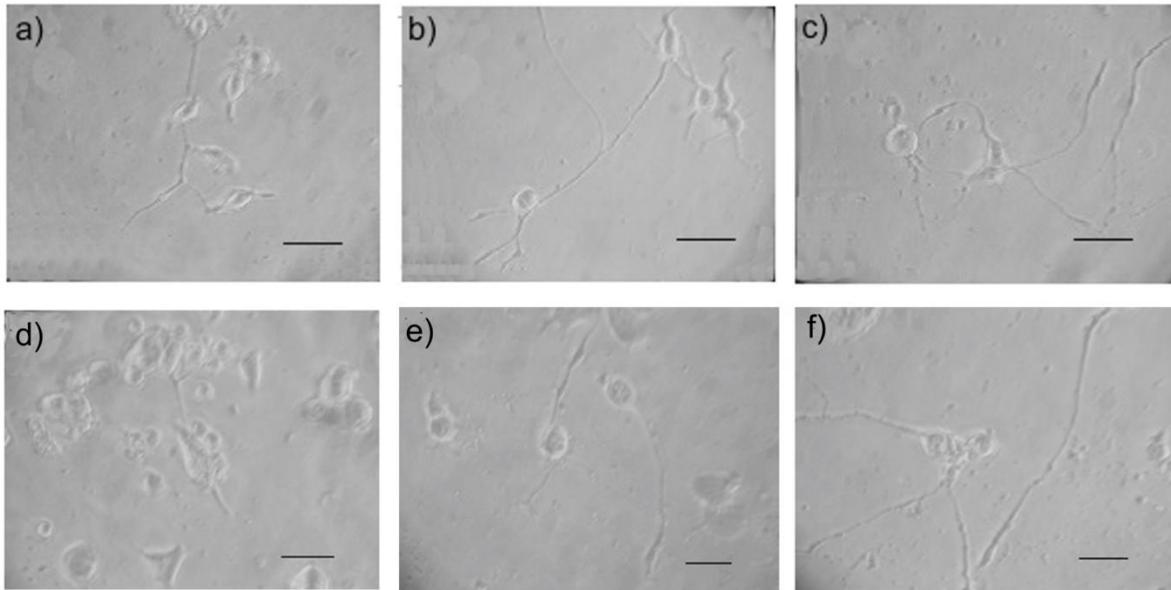


Fig. 29 Células nerviosas obtenidas de la médula espinal de ratón. a), b) y c) células nerviosas de la médula espinal de ratón en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina con 3, 5 y 8 días respectivamente. d), e) y f) células nerviosas de la médula espinal de ratón en superficies de PPy con 3, 8 y 21 días respectivamente (Contraste de fases, Barra=50 micras, Amplificación original x100).

Purificación de motoneuronas

Sembrado sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy

Al observar que había un adecuado crecimiento y adhesión en ambas superficies de crecimiento, se prosiguió a la purificación por despolarización para la obtención de una población de motoneuronas en los cultivos celulares. Al realizar un conteo por cámara de Neubauer se obtuvieron 300×10^3 motoneuronas. Las células fueron sembradas en superficies recubiertas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy (Fig. 30).

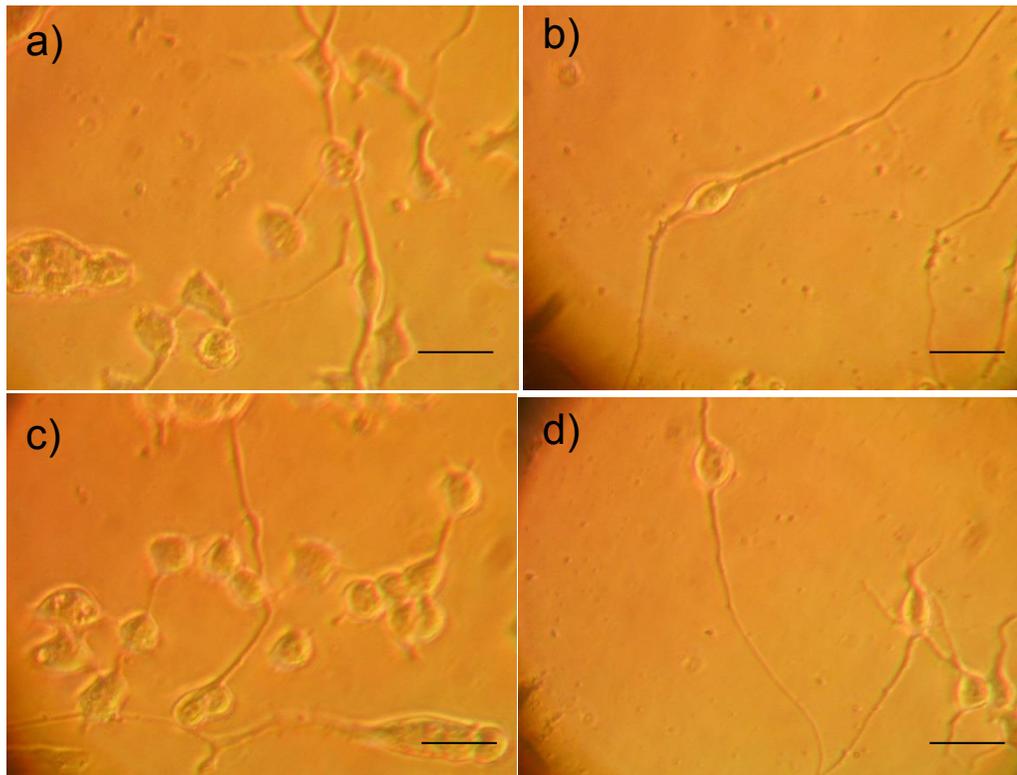


Fig. 30 Motoneuronas purificadas sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina a) y b) 3 y 7 días de cultivo respectivamente. Motoneuronas purificadas sembradas en PPy c) y d) con 3 y 7 días de cultivo respectivamente (Contraste de Fases, Barra=50 micras, Amplificación original x100)

En la Fig. 30 a) se pueden ver motoneuronas obtenidas de la médula espinal sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina, se muestran motoneuronas con 3 días de cultivo; se puede observar células con un diámetro del soma celular de 20-30 μm , lo cual es un diámetro reportado en la literatura para motoneuronas, a los primeros días de cultivo se observa la aparición de prolongaciones nerviosas. En b) se observa una motoneurona bipolar con 7 días de cultivo, con una morfología característica reportada en la literatura, se observan dos prolongaciones nerviosas de gran longitud saliendo del soma. En c) se observan motoneuronas con 3 días de cultivo sembradas sobre superficies de PPy, se observa un desarrollo morfológico similar a las células sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina, se observa el comienzo de la aparición de prolongaciones nerviosas. En d) se observan motoneuronas con 7 días de cultivo, se puede ver el completo desarrollo celular, como lo ya reportado en la literatura; se observan células con largas prolongaciones nerviosas. Las motoneuronas se desarrollan adecuadamente en ambas superficies de cultivo sin que se vea alterado su desarrollo morfológico.

Técnicas de Inmunofluorescencia celular.

Células nerviosas de la médula espinal

Para el caso de las células nerviosas de ratón el anticuerpo hacia sinaptofisina en conjunto con fluorocromo Texas Red nos permitió localizar dicha proteína en los cultivos celulares, ya que la sinaptofisina al ser una glicoproteína relacionada ampliamente con la exocitosis y la sinapsis celular, nos permitirá saber los puntos de contacto sináptico celular.

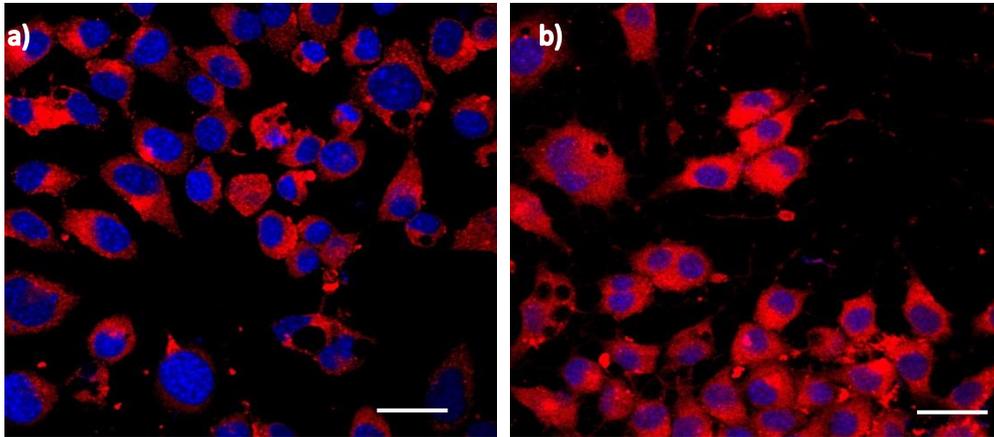


Fig. 31 Células nerviosas de la médula espinal de ratón en microscopía de fluorescencia en Poli-DL-Ornitina/Laminina (a) y en PPy (b) (Sinaptofisina-Texas Red, Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x100)

En la Fig. 31 a), se puede ver el contacto sináptico entre células nerviosas obtenidas de la médula espinal, se observan las zonas marcadas en rojo por Texas Red, que evidencia la presencia de la proteína sinaptofisina en cultivos de células nerviosas con 5 días de cultivo en superficies con Poli-DL-Ornitina/Laminina. En la Fig. 31 b). se pueden observar las células nerviosas en contacto sináptico, el uso de anti-sinaptofisina y del fluorocromo Texas red nos permitieron observar las zonas de contacto sináptico entre células nerviosas con 5 días de cultivo sobre PPy. En ambos cultivos se marcó el ADN nuclear por Hoechst para observar la viabilidad de nuestras células en ambas superficies de crecimiento, presentando núcleos redondos y bien definidos. La presencia de sinaptofisina y el marcaje de núcleos, evidencian una adecuada viabilidad que puede verse en ambas superficies de cultivo, por lo que se puede decir que el PPy es una superficie que no altera la síntesis de proteínas específicas, ni la supervivencia de las células.

Motoneuronas purificadas de la médula espinal de ratón

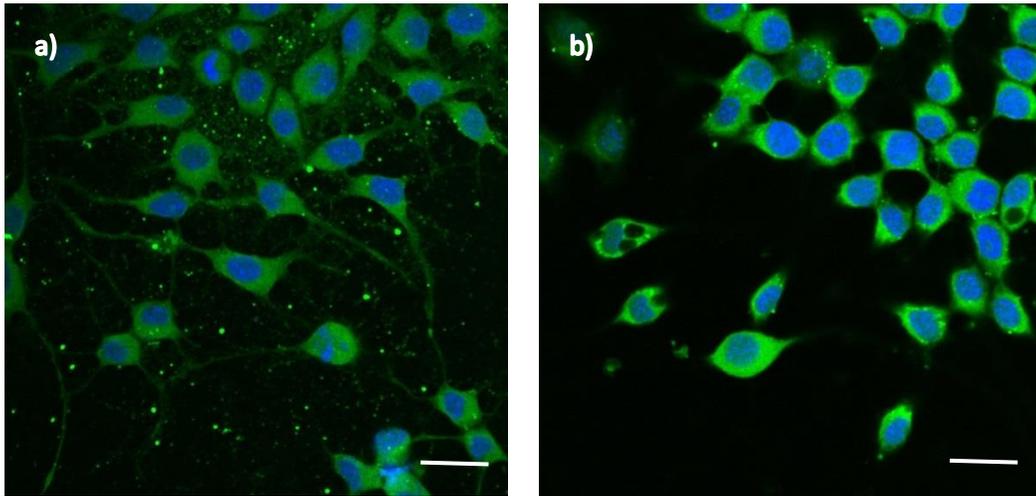


Fig. 32 Motoneuronas purificadas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina (a) y PPy (b) en microscopía de fluorescencia (Anti-VChat-FITC, Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x100)

Una vez que se observó la supervivencia de las células nerviosas en ambas superficies de cultivo y que sus propiedades de síntesis de proteínas específicas no se vieron afectadas por la presencia del PPy, se prosiguió a realizar la localización específica de las motoneuronas de cultivos purificados; en este caso se utilizó un anticuerpo hacia VChat, el cual nos permitió localizar los transportadores vesiculares de acetilcolina en las terminales nerviosas de células colinérgicas, y en específico, de motoneuronas.

En la Fig. 32 a) se observa el marcaje hacia los transportadores vesiculares de acetilcolina, localizados mediante el anticuerpo anti-VChat y el fluorocromo FITC. Se muestran motoneuronas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina con 5 días de cultivo, se observa la presencia de vesículas con Acetilcolina (verde). En b) se puede observar el marcaje por Anti-VChat y FITC (verde) de motoneuronas con 5 días de cultivo sobre PPy. En ambas imágenes se observa la presencia de transportadores vesiculares de Acetilcolina, lo cual indica que hay una adecuada producción del neurotransmisor en las motoneuronas y que no se ve afectada por la presencia del PPy. Las células son modelos claros de motoneuronas que pueden ser usadas en conjunto con células musculares esqueléticas, y poder llegar a formar uniones neuromusculares.

Viabilidad celular de las células nerviosas sembradas sobre Poli-DL-Ornitina y PPy

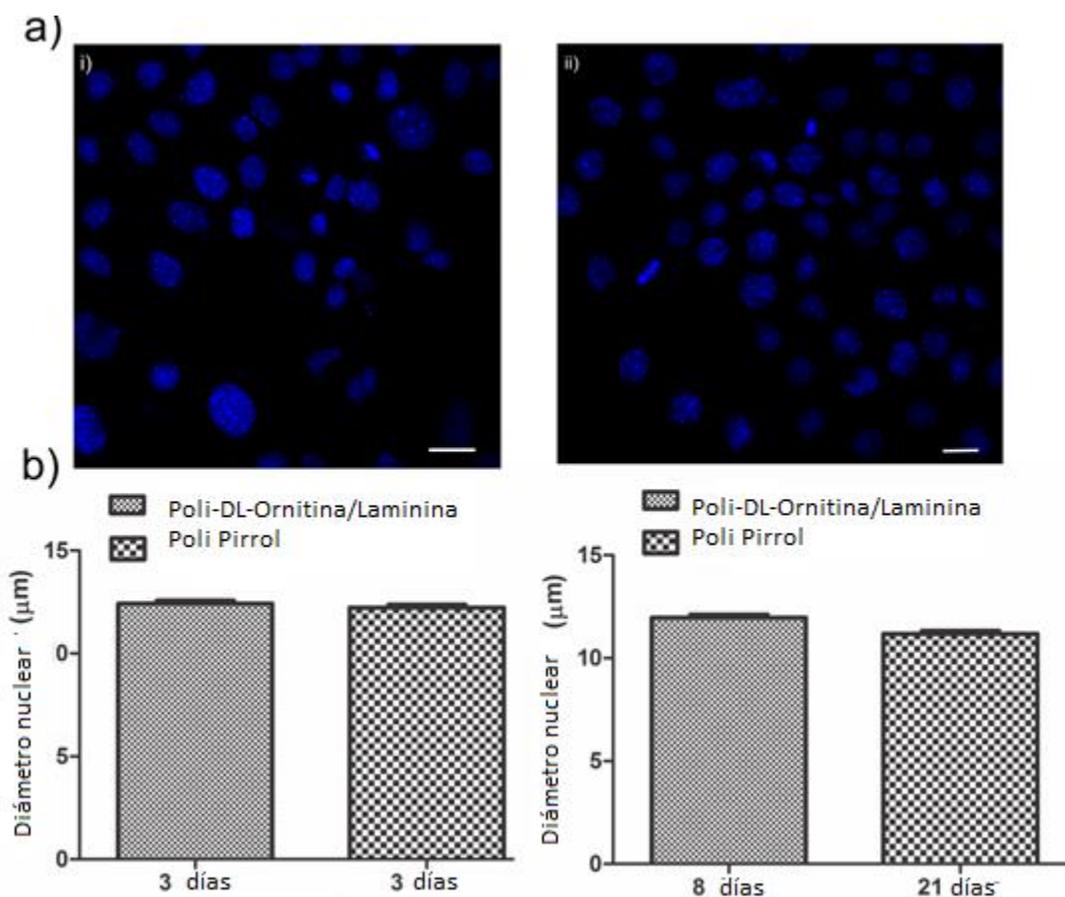


Fig. 33 Marcaje y cuantificación de la viabilidad celular de células nerviosas con diámetro celular mayor en comparación con otros tipos celulares localizados en el cultivo en Poli-DL-Ornitina/Laminina (ai) y PPy (aii)

La técnica de Hoechst es una técnica ampliamente usada para marcar el deterioro de los núcleos celulares y combinada con técnicas de medición de núcleos, nos puede indicar el deterioro celular a lo largo del tiempo [89, 90]. Se realizaron mediciones ($n=15$) de los núcleos tomados al azar de las imágenes marcadas positivamente con Hoechst. Se realizaron mediciones en células sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina (Fig. 33ai) y en células sembradas sobre PPy (Figura 33aii) con 3 días de cultivo), se obtuvo un promedio del diámetro nuclear de $12.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$ para células sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina y de $12.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ para células en PPy. Al hacer una *t* de Student por datos pareados ($p < 0.05$) no se obtuvo una diferencia significativa entre las medias de los datos. Para comparar los diámetros nucleares al final del tiempo de cultivo en cada superficie, se midieron los núcleos a los 8 y 21 días de cultivo sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy respectivamente. El promedio del diámetro nuclear (Fig. 10b) a los 8 días de cultivo sobre sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina fue de $12.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ($n=15$), y en neuronas con 21 días de cultivo sobre PPy fue de $11.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ($n=15$). Al realizar un análisis de *t* de Student por datos pareados ($p < 0.05$) se observa una diferencia significativa entre los datos analizados, con una caída porcentual del diámetro nuclear del

6.7 %, sin embargo, a pesar de estas diferencias, el promedio del diámetro nuclear a los 21 días de cultivo aún está en el rango de valores reportados para neuronas de la médula espinal por lo cual pueden considerarse en buen estado las células nerviosas.

En el caso de las motoneuronas no se hizo un análisis estadístico para evaluar la viabilidad celular, debido a que los experimentos realizados solo se llevaron a cabo por un máximo de 7 días, esto porque la supervivencia máxima reportada en la literatura [41, 90] demuestra que éste es el tiempo máximo de vida de motoneuronas purificadas por la técnica de despolarización, y que fue la supervivencia máxima que nosotros también obtuvimos en el cultivo de motoneuronas sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy.

Electrofisiología celular

Propiedades pasivas de las células nerviosas de médula espinal

Las neuronas presentan propiedades eléctricas pasivas o lineales y no lineales. Estas propiedades determinan el grado de excitabilidad de las neuronas. Por lo anterior, es común estudiar estas propiedades eléctricas que son características de cada tipo neuronal. Con fines comparativos, se analizaron las propiedades eléctricas de las neuronas cultivadas sobre superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy. Se registraron neuronas de mayor diámetro en el soma las cuales se consideran motoneuronas [41, 42]. Se evaluó el potencial de reposo (V_r), la resistencia de entrada (R_{in}) y la morfología de los potenciales de acción. Estos datos son indispensables para confirmar la existencia de neuronas funcionalmente maduras en los cultivos celulares sobre las diferentes superficies; además, son datos importantes de viabilidad celular, ya que las propiedades eléctricas son la primeras que se deterioran cuando existe algún daño celular.

En la Tabla 1 se muestran la resistencia de membrana (R_m) promedio y el potencial de reposo (V_r) promedio por día de cultivo para las células nerviosas de médula espinal cultivadas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina y en PPy. *No se muestran más datos debido a la presencia de corrientes de fuga en los registros.

| | Poli-DL-Ornitina/Laminina | | | PPy | | |
|---|---------------------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | 3 días | 5 días | 8 días | 3 días | 8 días | 21 días |
| R_{in} (MΩ) | 56.89±14.5 | 55.53±19.01 | 15.87* | 53.55±23.2 | 51.27±22.75 | 31.11±17.18 |
| V_r (mV) | -55.0±4.2 | -43.5±7.77 | -14.5±2.12 | -35.0±4.24 | -47.5±3.53 | -52.0±5.65 |

Tabla 1. Resistencia de entrada y potencial de reposo promedio por día de células nerviosas de la médula espinal sobre superficies cubiertas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy a diferentes días de cultivo (n=3 por días de cultivo).

Se observa que en células nerviosas de médula espinal cultivadas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina disminuye el potencial de reposo con respecto al tiempo en cultivo (Tabla 1). En el caso de células cultivadas sobre Poli-Pirrol, el potencial de reposo V_r fue menor a los 3 días de cultivo pero mejoró notablemente a los 8 y 21 días. El V_r aumentó un 48% después de 21 días de cultivo. La resistencia de la membrana disminuyó menos

drásticamente en el tiempo. No se observó fragilidad en la membrana celular al registrar con la pipeta como en el caso de cultivos sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina. La disminución de V_r y R_{in} en las neuronas normalmente se asocia a un deterioro de las membranas celulares, las cuales ya no controlan de manera apropiada el paso de iones, generando corrientes iónicas de fuga. Por lo anterior, la disminución de R_{in} y V_r en las neuronas cultivadas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina durante 8 días, indicó el inicio de daño celular. Por el contrario, en las neuronas cultivadas sobre PPy no se observó una disminución en R_{in} y V_m , incluso a los 21 días de cultivo. En resumen, las neuronas cultivadas sobre Poli-Pirrol hasta 21 días mejoraron y preservaron sus propiedades eléctricas pasivas.

Potenciales de acción de las células nerviosas de la médula espinal

En la Fig. 34 se muestran los cambios en V_m y los potenciales de acción al aplicar pulsos de corriente hiper y despolarizantes, se observa en a) la aparición del potencial de acción de una célula nerviosa de médula espinal cultivada sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina con 3 días de cultivo. En b) se observa el potencial de acción de una célula nerviosa de médula espinal con 5 días de cultivo sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina. En c) se observa un potencial de acción lento y disminuido en una célula nerviosa de la médula espinal con 8 días de cultivo sembrada en Poli-DL-Ornitina/Laminina. Estos resultados son representativos de una $n=3$ por día de cultivo. En d) se aprecia el potencial de acción de una célula nerviosa de la médula espinal con 3 días de cultivo sembrada sobre Poli-Pirrol. En e) el potencial de acción de una célula nerviosa de médula espinal con 8 días de cultivo sembradas en Poli-Pirrol y en f) el potencial de acción de una célula nerviosa de la médula espinal con 21 días de cultivo. Estos resultados son representativos de una $n=3$ por día de cultivo. De manera semejante a lo observado en las propiedades eléctricas pasivas, las propiedades no lineales de las células cultivadas en Poli-DL-Ornitina/Laminina en los primeros días de cultivo (3 y 5) son apropiadas con generación de potenciales de acción rápidos y buena amplitud; sin embargo, se deterioran rápidamente y a los 8 días de cultivo los potenciales de acción prácticamente desaparecen. Por el contrario, las células cultivadas sobre Poli-Pirrol inician con adecuadas propiedades no lineales las cuales se mantienen y mejoran hasta los 21 días de cultivo presentando potenciales de acción rápidos y buena amplitud. En resumen, las propiedades eléctricas pasivas y no lineales se preservan en neuronas cultivadas sobre Poli-Pirrol por varias semanas; por el contrario, en neuronas cultivadas Poli-DL-Ornitina/Laminina el deterioro de las propiedades eléctricas es rápido (una semana).

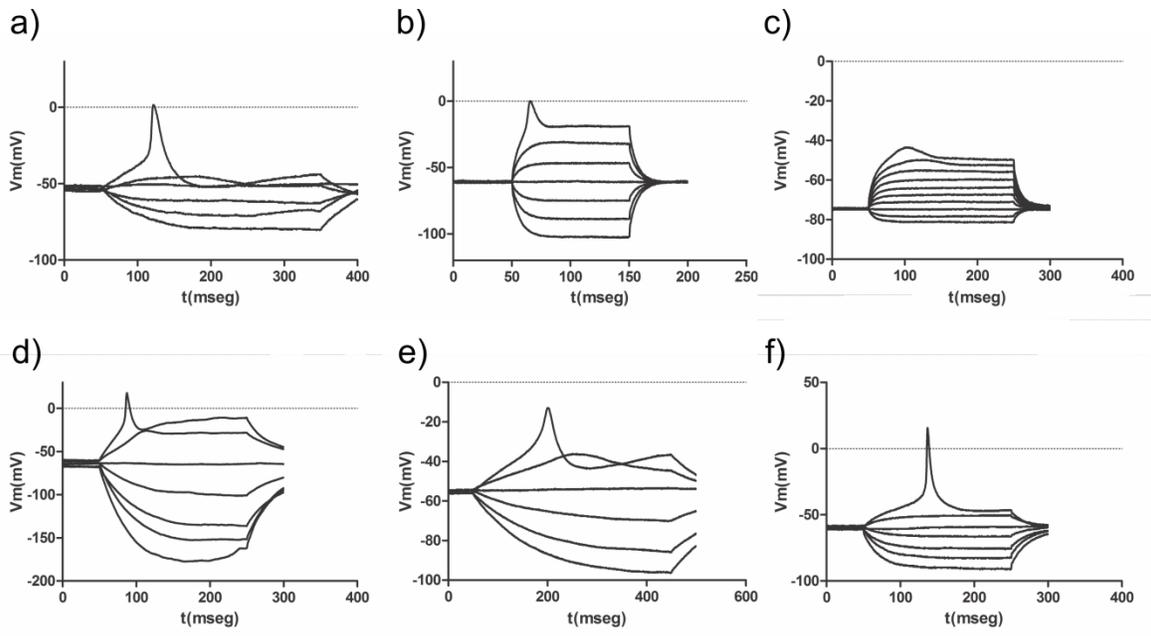


Fig. 34 Potenciales de acción de células nerviosas de la médula espinal sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina a los 3, 5 y 8 días (a), b), c)) y sobre PPy a los 3, 8 y 21 días de cultivo (a), b), c)).

Células nerviosas de médula espinal sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina

Un estudio más detallado de las propiedades eléctricas de las neuronas requiere el análisis de las corrientes iónicas mediadas por canales iónicos voltaje dependientes localizados en la membrana celular. Dos tipos de canales iónicos son fundamentales para el disparo de potenciales de acción, los canales de Na^+ y K^+ voltaje dependientes [91-93]. Se esperaría que una superficie apropiada para el cultivo de células nerviosas no afecte los canales de Na^+ y K^+ de tal manera que no se produzcan potenciales de acción, o bien, que éstos sean lentos y de baja amplitud. Los canales iónicos se estudian analizando las corrientes iónicas a las que dan origen; por lo anterior, se analizaron las corrientes de Na^+ y K^+ . Las corrientes de Na^+ y K^+ fueron provocadas por pulsos rectangulares de voltaje despolarizantes aplicados a la neurona. Con estos datos es posible obtener las conductancias al Na^+ (g_{Na^+}) y K^+ (g_{K^+}) con respecto al potencial de membrana V_m . La ventaja de expresar los resultados en términos de conductancia es que hay una relación directa entre la conductancia y la fracción de canales iónicos que se abren por el cambio en el potencial de membrana V_m [92]. Si las superficies de cultivo afectan los canales iónicos se observarán cambios en las conductancias g_{Na^+} y g_{K^+} [91, 93].

En la Fig. 35 se observan los registros de corrientes iónicas voltaje dependientes de células nerviosas de la médula espinal sembradas en cubreobjetos tratados con Poli-DL-Ornitina/Laminina. Los registros son representativos de una $n=3$ por día de cultivo. En a) se observan las corrientes iónicas de las células a 3 días de cultivo. En i) se observan las corrientes de Na^+ provocadas por pulsos despolarizantes breves. Se observan corrientes de Na^+ que activan rápidamente alcanzando un pico máximo para posteriormente inactivar. En ii) se pueden observar las corrientes de K^+ provocadas por pulsos

despolarizantes de mayor duración. Las corrientes de K^+ se observan posteriores a la activación de las corrientes de Na^+ . Además de activarse más lentamente, las corrientes de K^+ no inactivan alcanzando un valor máximo estacionario al final de los pulsos despolarizantes. En la Fig. 35 b) se observan en i) y ii) a los 5 días de cultivo, las corrientes iónicas de Na^+ y K^+ , respectivamente; las corrientes fueron similares en su cinética a las mostradas en a). Resultados similares se obtuvieron a los 8 días de cultivo como se muestra en la Fig. 35 c). A pesar de la persistencia de las corrientes de Na^+ y K^+ durante los diferentes días de cultivo, las magnitudes de las corrientes de Na^+ y K^+ tendían a disminuir en el tiempo (Fig. 35 c). Se observa un decaimiento del 70 % entre las corrientes de Na^+ máximas registradas en células con 3 y 8 días de cultivo. En las corrientes máximas de K^+ , se observa que las corrientes se mantienen constantes entre los registros de células al día 3 y 8 de cultivo.

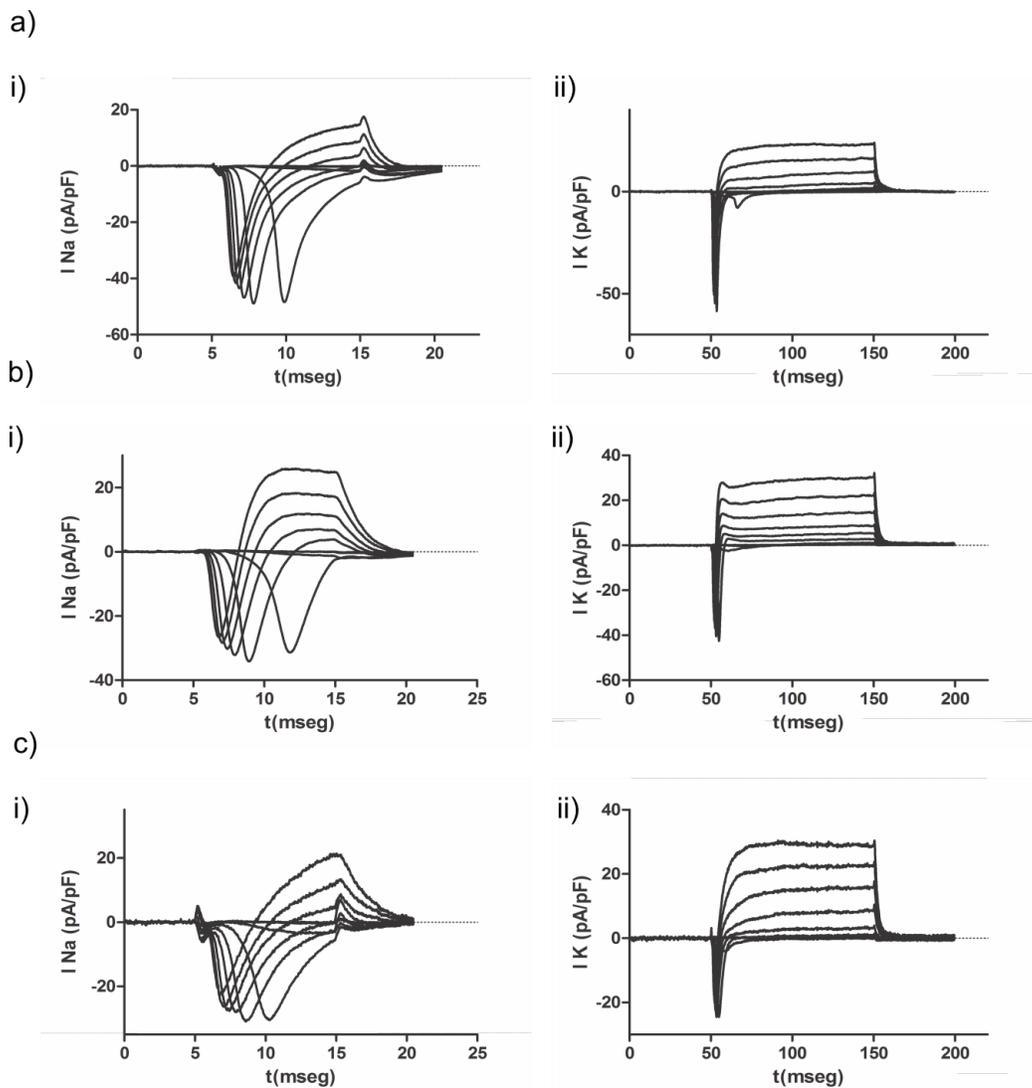


Fig. 35 Corrientes iónicas normalizadas de Na^+ y K^+ de células nerviosas de la médula espinal de ratón en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina a los 3, 5 y 8 días de cultivo (a), b), c))

Células nerviosas de médula espinal sobre PPy

La Fig. 36 muestra las corrientes de Na^+ y K^+ a diferentes días de cultivo sobre cubreobjetos tratados superficialmente con Poli-Pirrol por polimerización por plasma. Los registros son representativos de una $n=3$ por día de cultivo. Se realizaron los registros a los 3, 8 y 21 días de cultivo. En a) se muestran las corrientes iónicas a los 3 días de cultivo y en b) a los 8 días de cultivo. Las corrientes de Na^+ y K^+ fueron fundamentalmente similares a las mostradas en la Fig. 35 en cuanto a su cinética; sin embargo, en presencia de Poli-Pirrol, las corrientes de Na^+ y K^+ incrementaron a partir de los 8 días en cultivo (bi, bii), obteniéndose un incremento en la corriente máxima de Na^+ del 63 % y en la corriente máxima de K^+ del 73 %. Incluso para tiempos prolongados (21 días) de cultivo sobre Poli-Pirrol, las corrientes de Na^+ y K^+ persistieron con incremento de la corriente de Na^+ , como se puede apreciar en ci); la corriente de Na^+ incrementó 131 % con respecto a los registros de células con 3 días de cultivo; sin embargo, la corriente de K^+ disminuyó con un decaimiento del 39 % con respecto a células registradas con 3 días de cultivo (cii)). Se mostró que los potenciales de acción en neuronas cultivadas sobre PPy durante 21 días, presentaban potenciales de acción rápidos y de buena amplitud como sería de esperarse de una neurona típica, este resultado sería por el incremento importante en la corriente de Na^+ (131 %); además, aunque la corriente de K^+ disminuyó a los 21 días de cultivo, no parece afectar la morfología del potencial de acción dada la rapidez de la fase de repolarización mediada por la corriente de K^+ . En resumen, los datos de las mediciones de las corrientes iónicas indican que los potenciales de acción rápidos observados a los 21 días de cultivo son producto del incremento en la corriente de Na^+ .

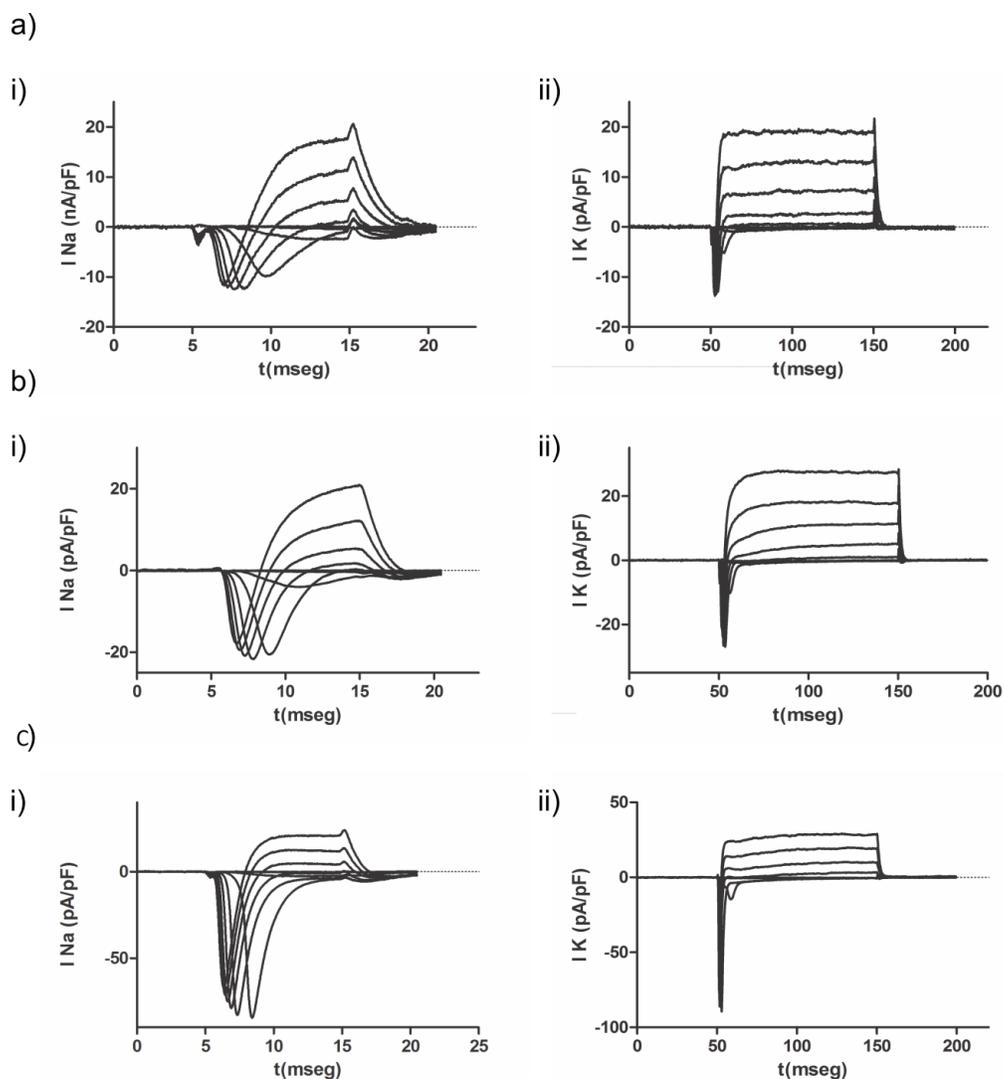


Fig. 36 Corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺ en células nerviosas de la médula espinal de ratón sembradas en PPy a los 3, 8 y 21 días de cultivo (a), b), c))

Conductancias de Na⁺ (gNa⁺) y K⁺ (gK⁺)

Aunque el análisis de las corrientes iónicas da información valiosa acerca del comportamiento de los canales iónicos, es mejor realizar el análisis en términos de las conductancias, ya que como se comentó, la conductancia es directamente proporcional a la fracción de canales iónicos abiertos por los cambios de voltaje de membrana. Las conductancias para el Na⁺ y K⁺ se obtuvieron de la medición de las corrientes máximas de Na⁺ y K⁺. Para descartar una medición errónea en la corriente al pico de la corriente de Na⁺ por contaminación de la corriente de K⁺, se analizó la fracción de activación de la corriente de K⁺ cuando se aplican pulsos despolarizantes de 10 mseg. En la Fig. 37 a) se observan las corrientes típicas con pulsos despolarizantes breves y en la Fig. 37 b) el bloqueo de la corriente rápida de Na⁺ con 6 nM de Tetrodotoxina (TTX) (Sigma-Aldrich, EUA) en la solución extracelular (n=6). Al comparar ambas figuras, se observa que la

corriente al pico de la corriente de Na^+ se alcanza antes que la corriente de K^+ active de manera apreciable. Notemos que cuando aparece el pico más lento de la corriente de Na^+ ($V_m = -40 \text{ mV}$) la corriente de K^+ aún no activa; además, las corrientes de K^+ sólo son apreciables en los últimos tres pulsos despolarizantes, justo cuando las corrientes de Na^+ son más rápidas.

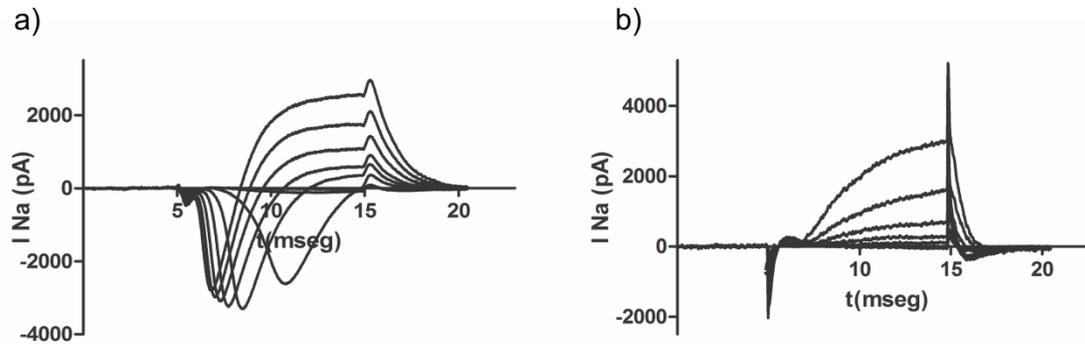


Fig. 37 Corrientes de Na^+ bloqueadas por TTX. a) Corrientes de Na^+ y K^+ provocadas por la aplicación de pulsos de voltaje despolarizantes. b) Corrientes de Na^+ bloqueadas al aplicar el TTX.

Estos resultados nos ayudaron a corroborar que los valores de la corriente al pico de las corrientes de Na^+ no estuvieran contaminadas por corrientes de K^+ y su magnitud pudiera ser utilizada para el cálculo de la conductancia al Na^+ .

Para realizar un análisis comparativo más detallado entre los cultivos con Poli-Pirrol y Poli-DL-Ornitina/Laminina, se compararon las conductancias al Na^+ y al K^+ . Se obtuvieron gráficas de las conductancias dependientes del voltaje para Na^+ y K^+ . A los puntos experimentales se les ajustó la función de Boltzmann obteniendo los siguientes parámetros de ajuste: conductancia máxima, la pendiente de la curva sigmoidea y el potencial de membrana V_{50} al cual se obtiene la mitad de la conductancia máxima. Estos tres parámetros son característicos para cada corriente iónica y se emplean para describir una corriente iónica en particular [91]. Estos tres parámetros se emplearon para comparar el comportamiento de los canales de Na^+ y K^+ durante los días de cultivo y entre las superficies de cultivo. Esperaríamos que las superficies de cultivo no afectaran a los canales iónicos dependientes del voltaje de las membranas celulares, si este fuera el caso, las curvas de conductancia Vs V_m serían similares y los parámetros obtenidos al ajustar la función de Boltzmann a las curvas serían parecidos.

Se realizó un análisis comparativo de las conductancias al Na^+ y K^+ en cada una de las superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy a los 3 y 8 días de cultivo (Fig. 38, 39). A los 3 días de cultivo se observa una similitud entre los parámetros analizados (Fig. 38). Los resultados no muestran una diferencia significativa al hacer un análisis de datos pareados ($p < 0.05$). Se realizó un segundo análisis a los parámetros de las conductancias de Na^+ y K^+ en células con 8 días de cultivo (Fig. 39). Aunque se observan diferencias en los parámetros de las conductancias al Na^+ , éstas no fueron significativas. En el caso de las conductancias al K^+ se observaron diferencias mayores entre los parámetros de ajuste, sin embargo, no fueron significativas. A pesar de los cambios en la conductancia,

al realizar el análisis estadístico por datos pareados, no se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$). En resumen las conductancias dependientes de Na^+ y K^+ no mostraron diferencias significativas entre ambas superficies de cultivo.

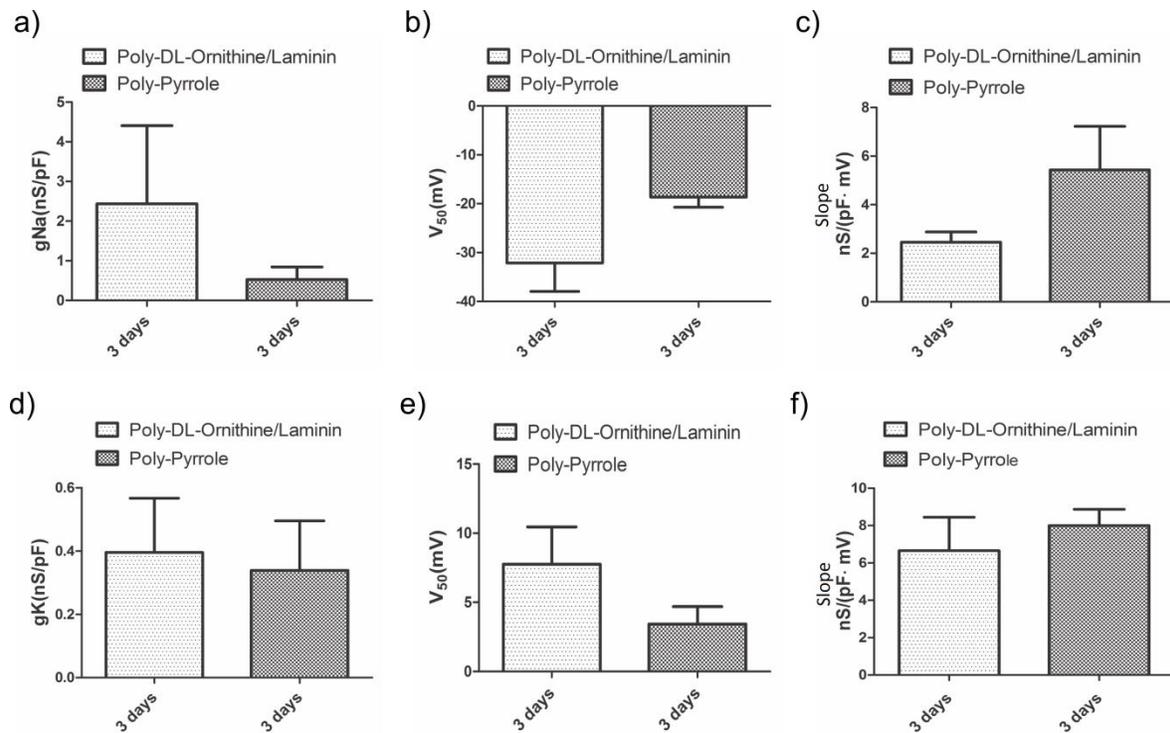


Fig. 38 Análisis comparativo de las conductancias de Na^+ y K^+ a los 3 días de cultivo sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y con PPy. a), d) conductancia máxima; b), e) V_{50} ; c), d) Pendiente. Estos datos son representativos de $n=3$ por día de cultivo.

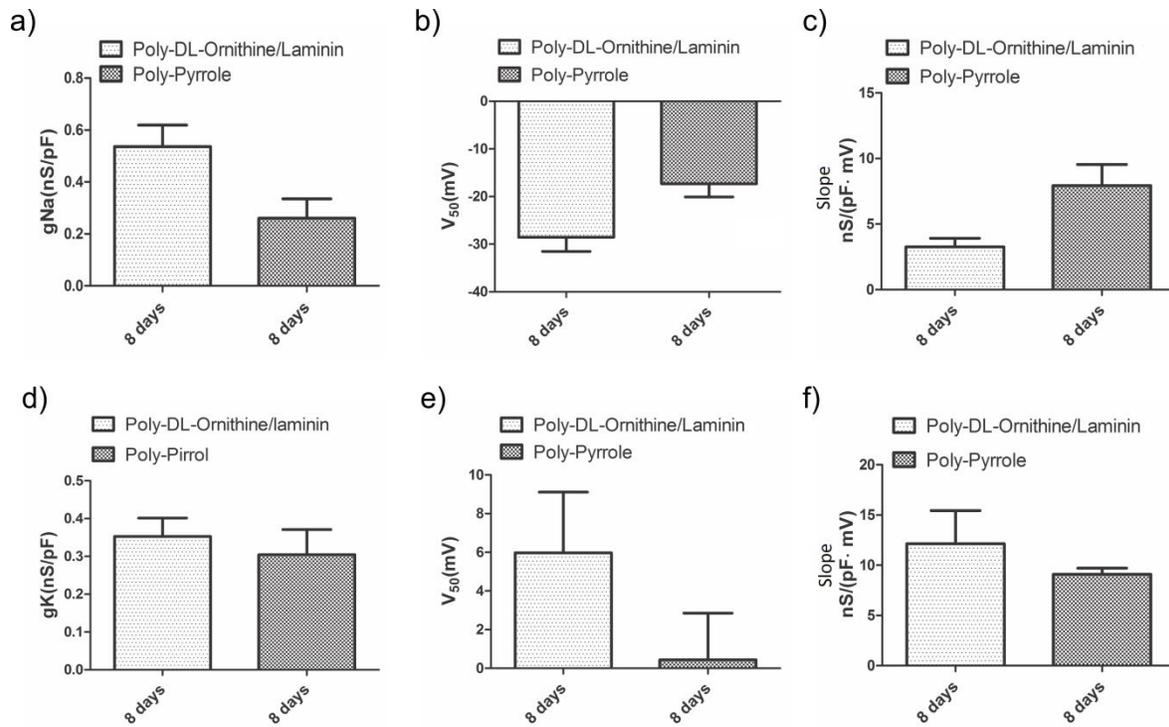


Fig. 39 Análisis comparativo de las conductancias de Na⁺ y K⁺ a los 8 días de cultivo de células nerviosas de la médula espinal sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y con PPy. a), d) conductancia máxima; b), e) V₅₀; c), d) Pendiente. Estos datos son representativos de n=3 por día de cultivo.

En la Fig. 40 se muestran las gráficas comparativas de las conductancias normalizadas para Na⁺ y K⁺ de células con 21 días de cultivo. En el caso de células sobre superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina no se muestran datos debido al completo deterioro y muerte celular que se obtuvo en el cultivo después de 10 días. Los datos presentados solo corresponden a las células cultivadas sobre superficies de Poli-Pirrol. No se realizó ningún análisis estadístico debido a la falta de datos comparativos.

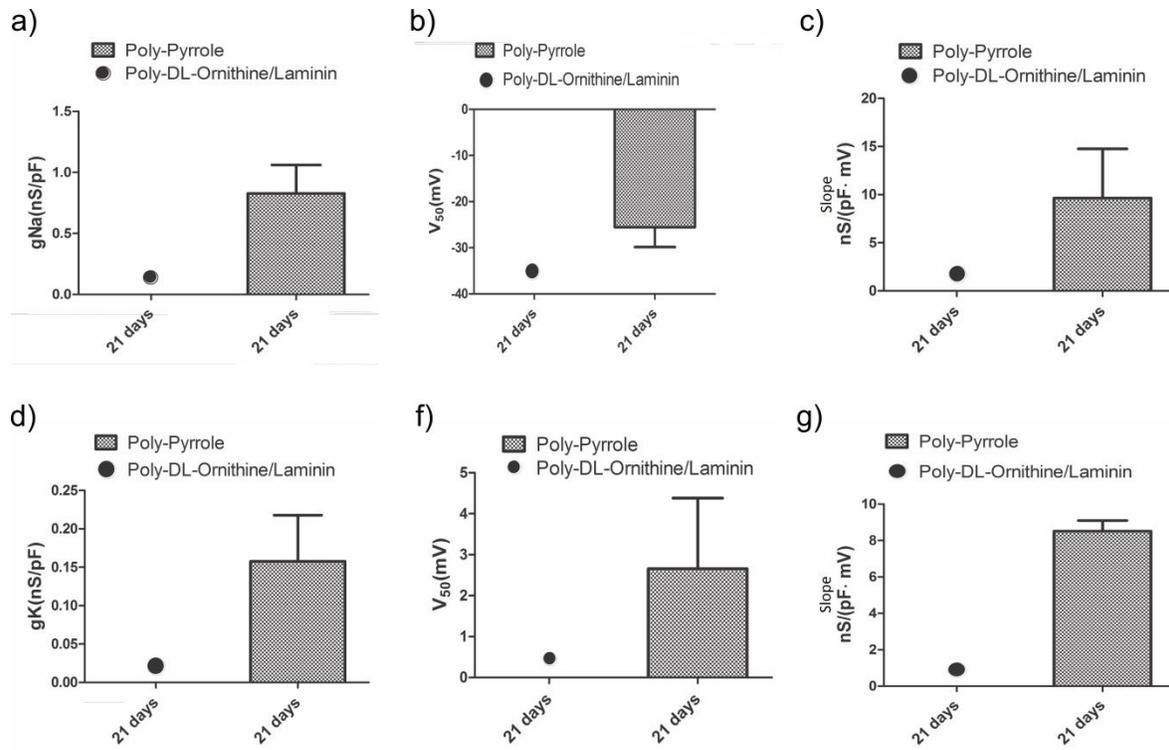


Fig. 40 Análisis comparativo de las conductancias de Na^+ y K^+ a los 21 días de cultivo de células nerviosas de la médula espinal sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y con PPy a), d) conductancia máxima; b), e) V_{50} ; c), d) Pendiente. Estos datos son representativos de $n=3$ por día de cultivo.

En la Fig. 41 se resumen de manera gráfica los resultados mostrados en las figuras 38, 39 y 40. Se observa que en los cultivos sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina, la conductancia al K^+ (g_{K^+}) no sufre cambios durante los 8 días de cultivo que permanecen viables las neuronas; sin embargo, la conductancia al Na^+ (g_{Na^+}) indispensable para la generación de potenciales de acción, se deteriora rápidamente a los 5 días de cultivo. Por el contrario, en los cultivos celulares sobre superficies de Poli-Pirrol, la g_{Na^+} mejora en el tiempo incluso hasta los 21 días de cultivo; en cuanto a la g_{K^+} , permanece estable durante los 8 días de cultivo y disminuye a los 21 días de cultivo. La disminución en g_{K^+} no afecta el potencial de reposo como se muestra en la Tabla 1, y no parece afectar negativamente a los potenciales de acción como se muestra en la Fig. 34), más bien los y mejora al hacerlos más rápidos y de mayor amplitud.

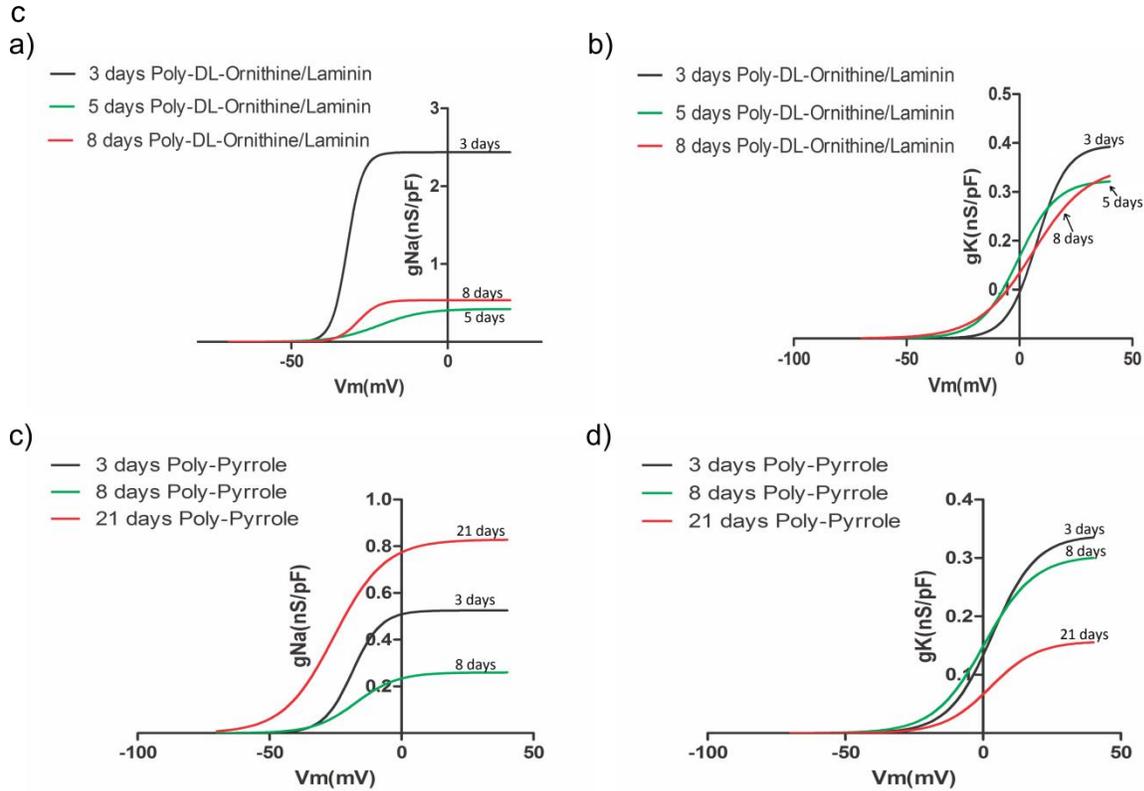


Fig. 41 Conductancias promedio de células nerviosas de la médula espinal de ratón sobre superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy. Estos resultados son representativos para $n=3$ por día.

Motoneuronas sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy

Una vez que se observó la respuesta eléctrica en células nerviosas de la médula espinal y que éstas no se vieron afectadas por la presencia del polímero, se prosiguió a realizar el registro de motoneuronas purificadas. En este caso se debe tomar mayor atención a las motoneuronas debido a que éstas fueron sometidas a procesos de despolarización con alto K^+ extracelular, que puede dañar a las células por el ingreso masivo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes.

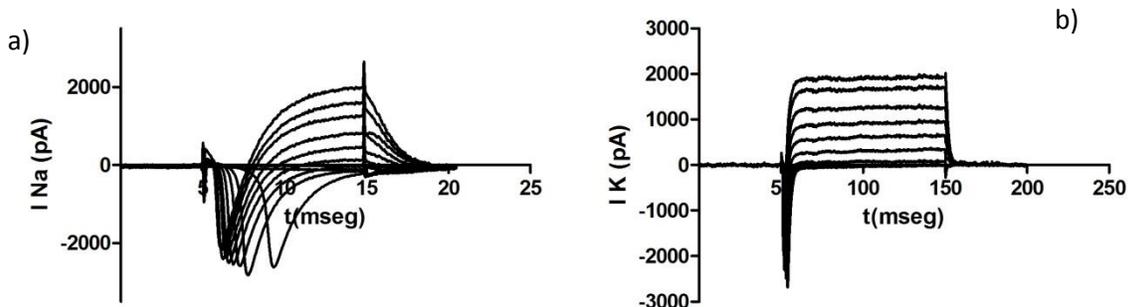


Fig. 42 Corrientes de Na^+ (a) y K^+ (b) de motoneuronas purificadas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina

En la Fig. 42 a) se observan los trazos característicos para corrientes iónicas del canal rápido de Na^+ , se pueden observar las corrientes rápidas de Na^+ de células sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina con 5 días de cultivo, se observa la activación de los canales voltaje dependientes, provocada por la aplicación de pulsos cortos despolarizantes de voltaje (10 ms). Una vez que las corrientes de Na^+ llegan a un punto máximo, éstas tienden a disminuir debido a la inactivación de los canales de Na^+ . En b) se puede observar la activación de los canales del rectificador tardío de K^+ ; se observan los trazos característicos de las curvas de las corrientes de K^+ en cultivos de motoneuronas sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina con 5 días de cultivo, que son ocasionadas por la apertura de los canales voltaje dependientes, que son activados por pulsos de voltaje despolarizantes de larga duración (100 ms). Es importante la activación de los canales de Na^+ y K^+ ya que éstos serán indicadores de la aparición de potenciales de acción en las células.

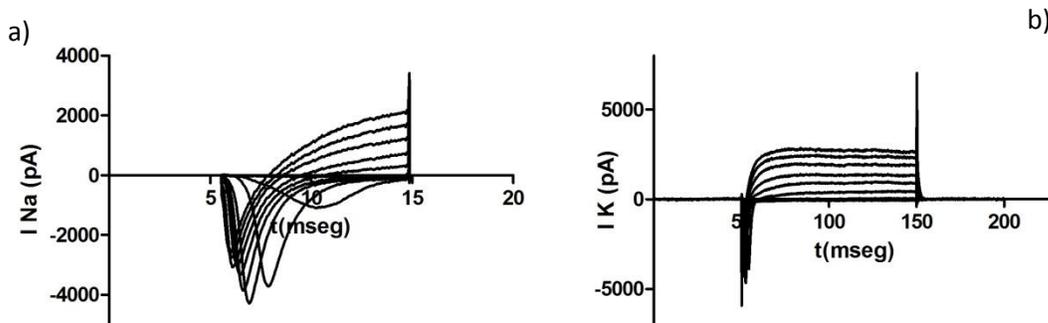


Fig. 43 Corrientes iónicas de Na^+ (a) y K^+ (b) de motoneuronas purificadas sembradas en PPy

En la Fig. 43 se observa un comportamiento similar a los registros eléctricos de las corrientes iónicas de Na^+ y K^+ mostrados en la Fig. 42. En a) se pueden ver los trazos de corrientes de Na^+ en motoneuronas con 5 días de cultivo en superficies tratadas con PPy. Se puede observar la activación de los canales voltaje dependientes por pulsos despolarizantes de voltaje de corta duración. Hay una corriente máxima de Na^+ que posteriormente tiende a disminuir debido a la inactivación de los canales de Na^+ . En b) se observan las corrientes de K^+ en motoneuronas con 5 días de cultivo, las corrientes fueron provocadas con pulsos despolarizantes de voltaje de larga duración (100 ms) que abrieron los canales y por lo tanto, permitieron el paso de iones a través de éstos. La activación de los canales y la generación de corrientes provocará la presencia de potenciales de acción en las motoneuronas. Debido a esto, el PPy es una superficie de cultivo que no altera las propiedades eléctricas, específicamente, la activación de canales de Na^+ y K^+ .

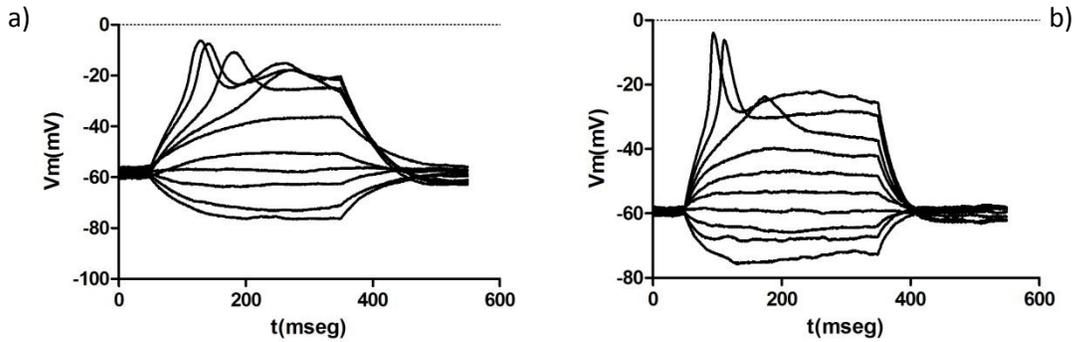


Fig. 44 Potenciales de acción en motoneuronas sembradas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina (a) y en PPy (b).

En la Fig. 44 se presentan los trazos característicos de potenciales de acción de motoneuronas. En a) se observan los potenciales de acción en motoneuronas sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina con 5 días de cultivo, se ve que al aplicar pulsos de corriente despolarizantes el potencial de membrana cambia hasta provocar la aparición de potenciales de acción. En b) se observa un comportamiento similar, se muestran los potenciales de acción al despolarizar la membrana con pulsos de corriente de motoneuronas sembradas sobre PPy con 5 días de cultivo. Por lo que se observa un comportamiento similar, obteniéndose amplitudes muy parecidas en los potenciales de acción en ambas superficies de cultivo, además, éstos no se ven afectados por la presencia de PPy. En todos los trazos mostrados se observa un comportamiento muy parecido al de las Fig. 34, 35 y 36 en células nerviosas de la médula espinal en donde se omitió la purificación de las células, lo que indica que desde los primeros cultivos obtenidos, ya se tenía la presencia de motoneuronas.

Sembrado de motoneuronas de la médula espinal de ratón en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

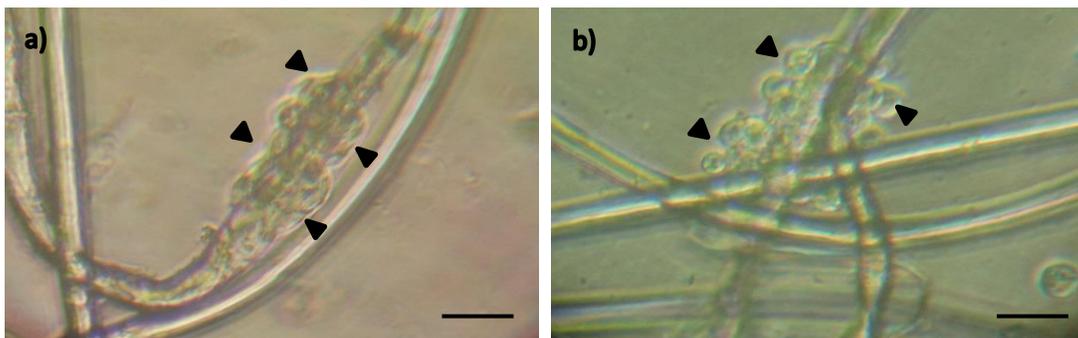


Fig. 45 Motoneuronas sembradas en fibras electrohiladas de PLA (a) y en PLA-PPy (b) (las cabezas de flecha indican la localización de las motoneuronas). (Contraste de fases, Barra=50 micras, Amplificación original x400)

En la Fig. 45 a) se puede ver el crecimiento de motoneuronas con 5 días de cultivo, en camas de fibras electrohiladas de PLA. Se observa el anclaje de las motoneuronas sobre una de las fibras de PLA, las células una vez ancladas crecieron en forma de racimos, presentando una forma esférica. No se observan las ramificaciones nerviosas de las células, ya que para su desarrollo morfológico, se necesita que estas tengan una superficie de anclaje. Las células al anclarse en un punto de contacto, sólo permitirá que la parte somática se desarrolle de manera adecuada, pero los procesos dendríticos y axonal, se verán limitados en su crecimiento, aunque suponemos que el desarrollo del axón y dendritas pueda estar sobre la misma fibra de PLA. En b) observamos el crecimiento de motoneuronas con 5 días de cultivo en fibras electrohiladas de PLA-PPy, se observa el anclaje celular sobre la superficie de las fibras en forma de racimos. Al igual que en el caso de motoneuronas sobre PLA, se observa una morfología esférica sin desarrollo de ramificaciones, por lo que se supone que su desarrollo se vea sobre la superficie de las fibras. Se concluye que las fibras de PLA y PLA-PPy son andamios que permiten el anclaje de las células pero que limitan el desarrollo de las motoneuronas al no brindar una superficie de anclaje para las dendritas y los axones.

Inmunofluorescencia celular

Motoneuronas en camas de fibras electrohiladas de PLA y PLA-PPy

En la Fig. 46 a) y b) se muestran motoneuronas con 5 días de cultivo sembradas en fibras de PLA. Las células fueron marcadas con VChat y FITC (verde) para poder ser localizadas dentro de las fibras, se tiñó el núcleo celular con Hoechst (azul). Al observar el anclaje de las células, se puede ver que las células conservan una morfología esférica en la parte del soma, se piensa que el poco desarrollo axónico y dendrítico, se debió a la poca área de contacto generada entre las células y las fibras, también se puede ver que las células se anclaron a lo largo de la superficie de la fibra.

En la Fig. 46 c) y d) se observa el crecimiento de motoneuronas con 5 días de cultivo en fibra electrohiladas de PLA-PPy. La tinción con VChat y FITC (verde) nos ayudó a la localización de las motoneuronas sobre las fibras de PLA-PPy, se marcaron los núcleos con Hoechst (azul). Se observa el mismo patrón de anclaje de las células que con las fibras de PLA, las células crecieron sobre la superficie de las fibras de PLA-PPy, se conserva una morfología esférica en el soma y un bajo desarrollo de ramificaciones. Por lo que el crecimiento de motoneuronas sobre fibras de PLA y PLA-PPy nos brindará un adecuado anclaje celular, pero debido a la limitada área de contacto, no se tendrá un completo desarrollo morfológico de las motoneuronas.

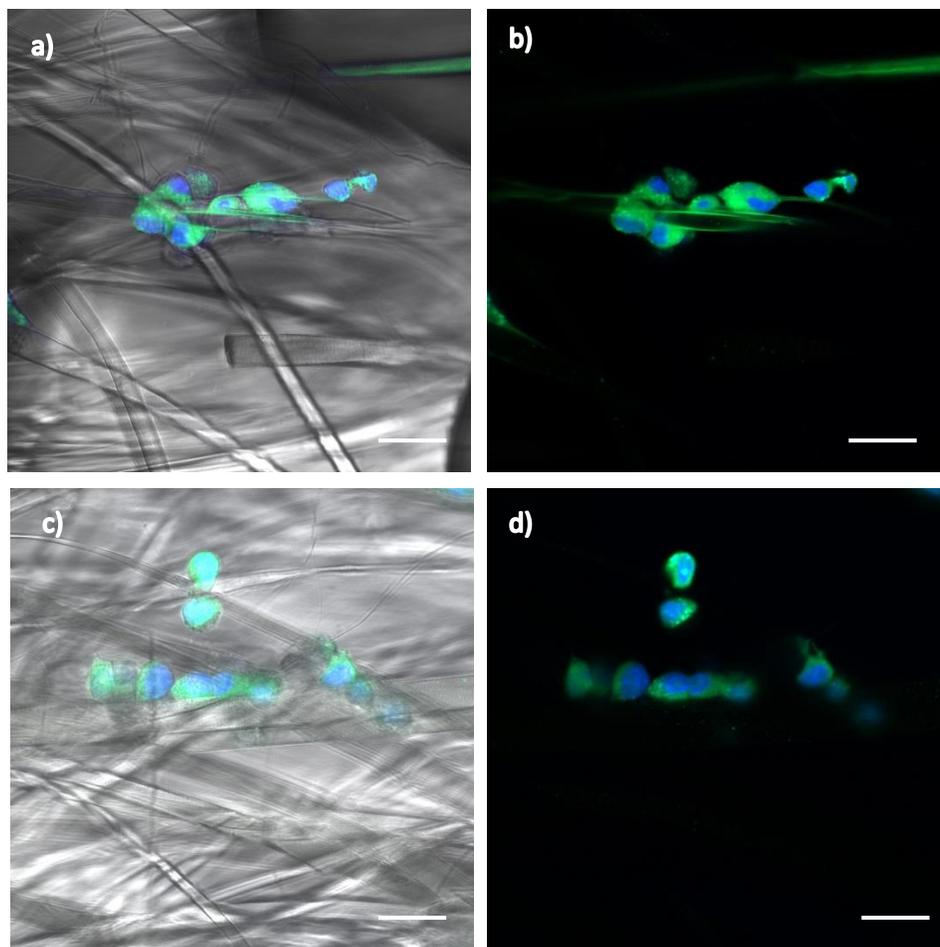


Fig. 46 Motoneuronas sembradas en fibras de PLA (a, b) y en PLA-PPy (c, d) (Anti-VChat-FITC, Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x400)

Electrofisiología celular de motoneuronas en capas electrohiladas de PLA y PLA-PPy

Se realizó el registro eléctrico de motoneuronas creciendo sobre capas de fibras de PLA y PLA-PPy para poder conocer las condiciones eléctricas de las células. Se realizó el registro de las corrientes iónicas de Na^+ y K^+ , así como de los potenciales de acción presentes en las células.

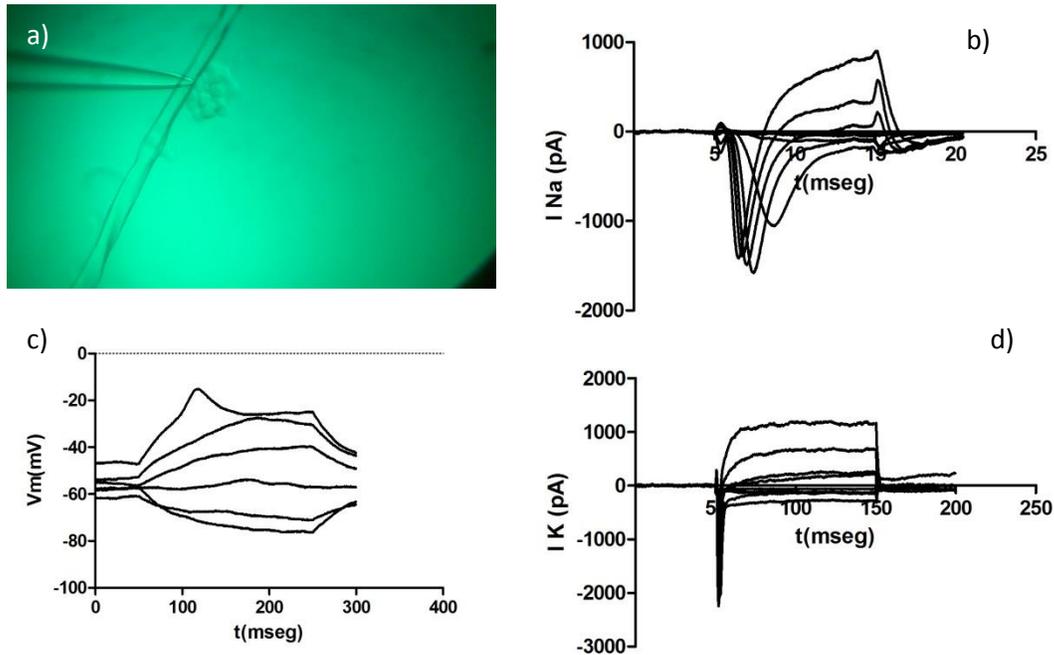


Fig. 47 Microfotografía del registro celular (a), trazos de las corrientes iónicas de Na^+ y K^+ (b, d) y potenciales de acción (c) de motoneuronas sembradas en PLA.

En la Fig. 47 a) se observa el registro celular por “patch-clamp” de una motoneurona anclada a una fibra de PLA con 5 días de cultivo, se observa a su vez la punta de la micropipeta con la cual se realizó el registro electrofisiológico. En b) y d) se muestran los trazos de corriente adquiridos al estimular las células con pulsos de voltaje despolarizante, se ven las corrientes iónicas de Na^+ por la activación de los canales voltaje dependientes y la aparición de los trazos de corriente correspondiente a K^+ , respectivamente. En c) se presenta un potencial de acción lento, provocado por la aplicación de pulsos de corriente despolarizante. Este tipo de potenciales podrían explicarse por la pobre activación de los canales de Na^+ por su baja expresión a los pocos días de cultivo.

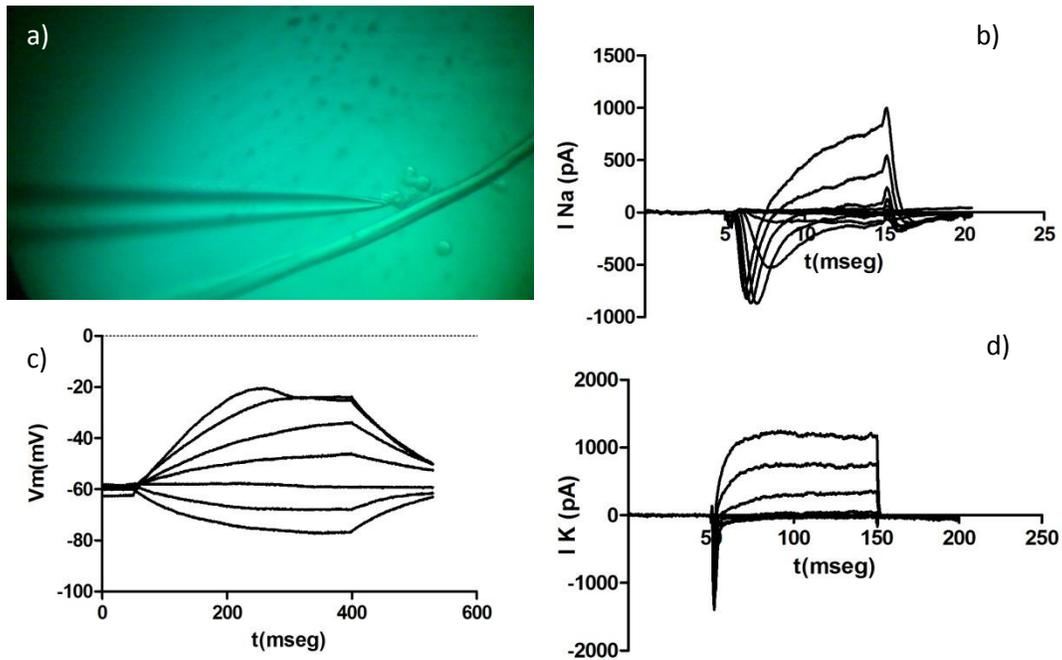


Fig. 48 Microfotografía del registro celular (a), trazos de las corrientes iónicas de Na⁺ y K⁺ (b, d) y potenciales de acción (c) de motoneuronas sembradas en PLA-PPy.

En la Fig. 48 a) se muestra el registro electrofisiológico de una motoneurona anclada a una fibra de PLA-PPy con 5 días de cultivo. En b) y d) se observan los trazos de corriente de Na⁺ y K⁺ al estimular eléctricamente las células con pulsos de voltaje despolarizante. Se puede ver que las corrientes de Na⁺ son la primeras en aparecer y llegando a un máximo, éstas tienden a desaparecer, presentándose posteriormente las corrientes del rectificador tardío de K⁺. En c) se observa un potencial de acción lento y con baja amplitud que aparece después de la aplicación de pulsos de corriente despolarizante. Se observa que las corrientes iónicas en ambas superficies son similares. Los potenciales de acción en ambas superficies presentan la misma característica de tener una baja amplitud de no más de -20 mv. Ambas superficies de crecimiento, formadas por fibras de PLA y PLA-PPy, brindan un adecuado anclaje sobre un área de crecimiento específica; sin embargo, el desarrollo morfológico es limitado con baja expresión de canales de Na⁺, que se refleja en la actividad eléctrica de las motoneuronas, las cuales presentan potenciales de acción lentos y de baja amplitud.

Cocultivos Celulares

Se seleccionó el modelo de motoneuronas purificadas con Lectina y alto K^+ en lugar de las motoneuronas derivadas de células troncales embrionarias, por su rápida obtención. Debido a que se observó un adecuado anclaje, crecimiento y desarrollo celular, se prosiguió a observar el crecimiento en conjunto de las células musculares y motoneuronas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina y en PPy.

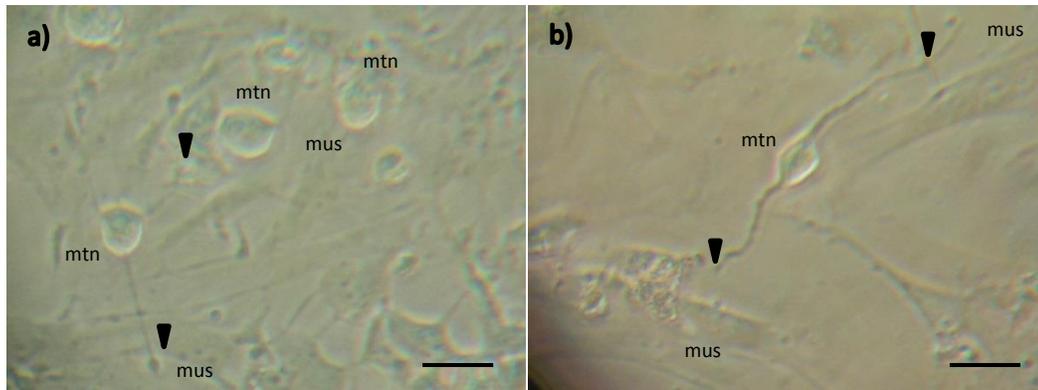


Fig. 49 Cocultivo celular en Poli-DL-Ornitina/Laminina (a) y PPy (b) (Contraste de fases, Barra=50 micras, Amplificación original x250)

En la Fig. 49 se observa el crecimiento de células musculares y de motoneuronas en el mismo ambiente de cultivo. En a) se observan células musculares (mus) diferenciadas en miotubos con 5 días de diferenciación, se observan además varias motoneuronas (mtn) con 3 días de cultivo en superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina. Se observan los puntos de contacto neuromuscular (flecha) entre la motoneurona y las células musculares. En b) se observan células de músculo esquelético con 5 días de diferenciación y una motoneurona bipolar con 3 días de cultivo, ambos tipos celulares se encuentran sembrados en superficies de PPy. Se puede observar la formación de uniones neuromusculares por la extensión de las terminales nerviosas hacia el músculo. En ambas superficies de crecimiento se observa un desarrollo normal de las células, así como la formación de uniones neuromusculares.

Inmunofluorescencia de los cocultivos celulares

Las técnicas de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos específicos, toxinas y fluorocromos, nos permitió la localización de cada tipo celular encontrado dentro del cocultivo, así como visualizar de forma específica el sitio de contacto sináptico neuromuscular; todos los marcajes se realizaron en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy.

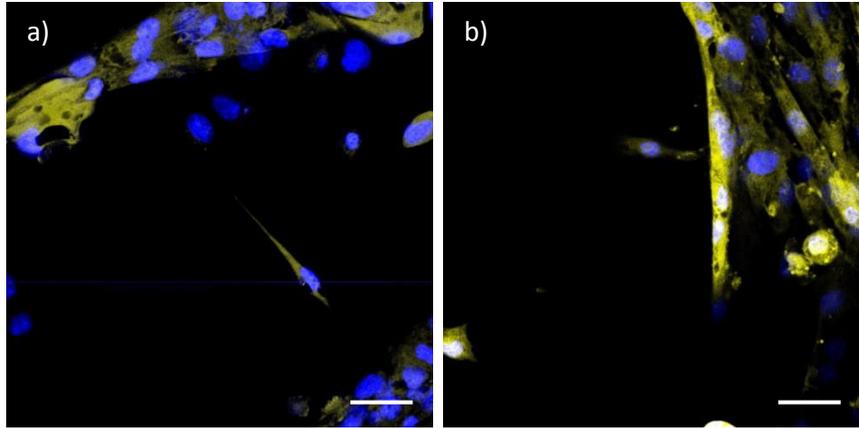


Fig. 50 Cocultivos celulares vistos por microscopia de fluorescencia en Poli-DL-Ornitina/Laminina (a) y PPy (b) (Alfa bungarotoina-Tetrametilrodamina, Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x100)

En la Fig. 50 a) se puede observar el marcaje superficial de la placa neuromuscular en un cocultivo celular de músculo esquelético y motoneuronas sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina y en b) del cocultivo celular en PPy; se observa el marcaje con el conjugado de alfa bungarotoxina y tetrametilrodamina el cual nos permitió localizar exclusivamente el sitio de contacto sináptico (amarillo), ya que la alfa bungarotoxina se ancla a los receptores de acetilcolina que se encuentran distribuidos en la placa neuromuscular. De igual manera se pueden observar los núcleos celulares (azul) teñidos por Hoechst de las fibras musculares multinucleadas. En Poli-DL-Ornitina/Laminina se observa la formación de uniones neuromusculares en ambas superficies de cultivo, observándose en amarillo la zona de contacto sináptico. En superficies de PPy se observan miofibrillas con múltiples núcleos marcados en azul, se observa también la presencia de contacto sináptico, en donde una terminal de la motoneurona ha hecho contacto con el músculo esquelético.

En la Fig. 51 se observan las imágenes de inmunofluorescencia de motoneuronas y células de músculo esquelético sembradas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy. En a) se puede ver el marcaje superficial de células de músculo esquelético en cocultivo con motoneuronas con 7 días de cultivo, sembradas en superficies de Poli-DL-Ornitina/Laminina. Se marcaron con anti-miosina para localizar la proteína específica miosina, la cual es una proteína de contracción muscular, resaltadas con el fluorocromo FITC (verde). En a) sólo se muestra el marcaje de músculo y de la placa neuromuscular debido a que se utilizó el mismo fluorocromo para el marcaje de anti-miosina y de VChat. En a) se puede ver en rojo el marcaje de la placa neuromuscular por la aplicación del conjugado alfa-bungarotoxina y tetrametilrodamina, se tiñó a su vez el núcleo celular con Hoechst.

Se puede observar el marcaje del músculo en donde es evidente un mayor número de células de músculo esquelético, se observan pocos puntos de contacto sináptico posiblemente debido a la sobrepoblación de células musculares, no hubo suficientes motoneuronas que hicieran contacto sináptico. En b) se observa el marcaje superficial de VChat y FITC (verde) de motoneuronas en cocultivo con células musculares. Se muestra

el marcaje de los transportadores vesiculares de acetilcolina localizados en las terminales y cuerpo de las motoneuronas. Se realizó el marcaje a células en cocultivo sembradas en Poli-DL-Ornitina/Laminina, al igual que en a) se realizó el marcaje de los receptores de acetilcolina con alfa-bungarotoxina y tetrametilrodamina (rojo), localizados exclusivamente en la placa neuromuscular; se marcaron los núcleos con Hoechst (azul). En este caso al igual que en a) no se obtuvieron puntos claros de contacto sináptico, aunque se observan zonas marcadas en rojo que evidencian la placa neuromuscular.

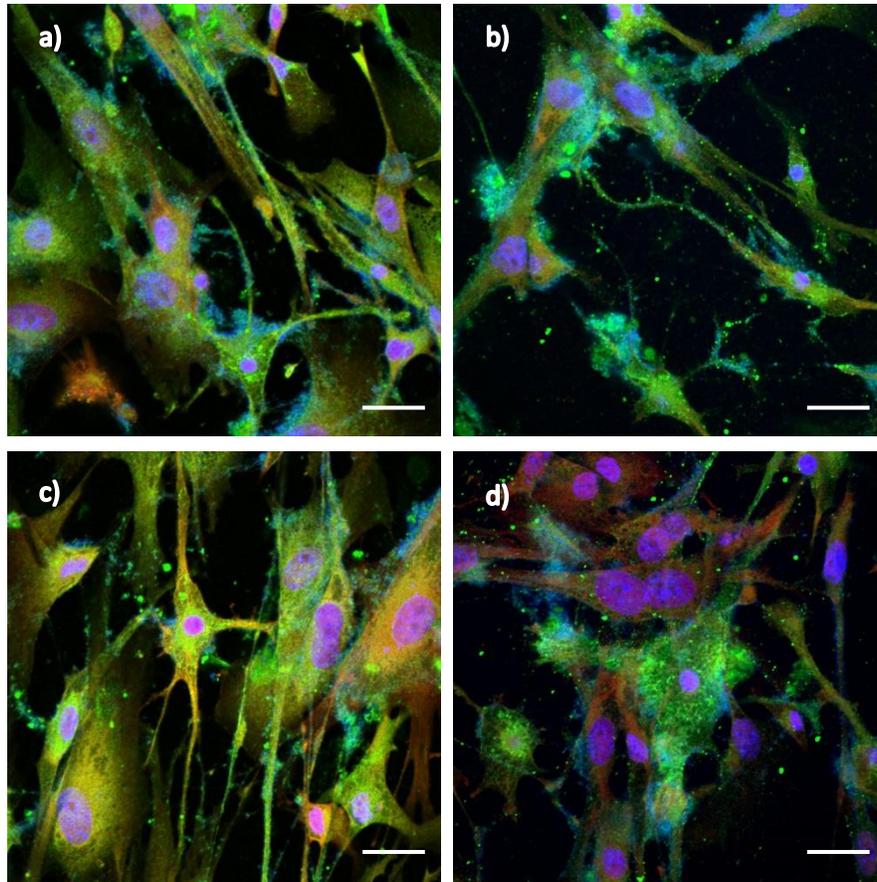


Fig. 51 Cocultivos con doble marcaje en los dos diferentes tipos de superficies de crecimiento. Poli-DL-Ornitina/ Laminina (a) músculo esquelético, b) motoneuronas) y PPy (c) músculo esquelético, d) motoneuronas (Anti-Miosina-FITC; VChat-FITC; alfa bungarotoxina/tetrametilrodamina; Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x100)

En c) se realizó el triple marcaje superficial para localizar músculo esquelético en cocultivo con motoneuronas, cultivadas en superficies de PPy con 7 días de cultivo. Se localizó el músculo esquelético con Anti-Miosina y FITC (verde), alfa-bungarotoxina y tetrametilrodamina para ver los receptores de acetilcolina de la placa neuromuscular (rojo) y núcleos con Hoechst (azul). En esta imagen no se aprecian claramente zonas de contacto sináptico en el músculo esquelético, por lo que pensamos que las células

musculares al sobrepoblar los cultivos, rompieron los enlaces sinápticos ya formados. En d) se observa un marcaje similar que en b) en donde se hace la localización de motoneuronas en cocultivo sembradas en PPy. Se localizaron las motoneuronas utilizando VChat y FITC (verde); para poder ver la placa neuromuscular se aplicó el conjugado anteriormente mencionado, al igual se localizaron los núcleos celulares con Hoechst (azul). En este caso se sigue observando una sobrepoblación de las células de músculo esquelético, y es evidente, debido al marcaje con Anti-VChat, que muestra que son muy pocas las células nerviosas marcadas, y que por lo tanto, tampoco habrá evidencia de la formación de uniones neuromusculares.

Conclusiones y perspectivas

En el crecimiento bidimensional de músculo esquelético de ratón, se obtuvieron células musculares indiferenciadas (mioblastos) que fueron cultivadas y alineadas en superficies cubiertas con Poli-Pirrol por polimerización por plasma (PPy), y que posteriormente, pudieron ser diferenciadas a miotubos gracias a las condiciones adecuadas de diferenciación. La presencia de PPy en los cultivos celulares de músculo esquelético de ratón, no alteró la morfología celular de los mioblastos y se mantuvo un adecuado proceso de diferenciación a miotubos, presentando una adecuada alineación celular. Las pruebas electrofisiológicas demostraron la presencia de actividad eléctrica celular con potenciales de acción; sin embargo, los potenciales de acción fueron lentos y de baja amplitud con respecto a los que presentan normalmente las células musculares. Las pruebas morfológicas por inmunofluorescencia mostraron la presencia de proteínas contráctiles, como la miosina en los cultivos sembrados en cajas de cultivo y en PPy.

El proceso de obtención de motoneuronas a partir de células troncales embrionarias de ratón, nos permitió obtener cultivos de motoneuronas pero con un bajo porcentaje de células totalmente diferenciadas hacia motoneuronas (GFP⁺); se obtuvo la diferenciación de motoneuronas en ambos tipos de superficies utilizadas, con igual supervivencia celular. Las células nerviosas de la médula espinal de ratón fueron sembradas en superficies tratadas con Poli-DL-Ornitina/Laminina y sobre PPy, se observó un aumento en la supervivencia celular de hasta 21 días, un incremento en la actividad eléctrica celular, así como la prevalencia de sinapsis celulares en las superficies de PPy, al ser comparadas con las células nerviosas de la médula espinal sembradas sobre Poli-DL-Ornitina/Laminina donde se obtuvo una supervivencia máxima de 8 días.

La purificación de motoneuronas de la médula espinal de ratón nos ayudó a obtener una población homogénea de este tipo celular, permitiéndonos obtener un modelo adecuado de motoneurona, con una adecuada actividad eléctrica, así como una adecuada morfología celular, con la presencia de transportadores vesiculares de acetilcolina (V-CHAT) en ambas superficies de cultivo (Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy). Al realizar el cocultivo celular bidimensional de células de músculo esquelético y motoneuronas, se observó una adecuada morfología celular de ambos tipos celulares, así como, algunas formaciones neuromusculares, al presentarse por inmunofluorescencia el marcaje de miosina (músculo esquelético), transportadores vesiculares de acetilcolina (VChat, motoneuronas) y de la placa de la unión neuromuscular (alfa-bungarotoxina) tanto en Poli-DL-Ornitina/Laminina y PPy.

En la parte del crecimiento tridimensional, la técnica de electrohilado permitió obtener camas de fibras de PLA alineadas que al ser polimerizadas nos permitieron modificar las características superficiales de las fibras. Se obtuvo un crecimiento volumétrico de células músculo esquelético y de motoneuronas, en las camas de fibras alineadas recubiertas y sin recubrir con PPy. En ambos casos se observó un adecuado anclaje celular pero un limitado desarrollo morfológico de cada tipo celular, provocado por la limitada área de crecimiento que brindaban las fibras nanométricas de PLA. En la electrofisiología celular

se obtuvieron registros de la actividad eléctrica de las motoneuronas. En la parte morfológica por inmunofluorescencia, en el cultivo volumétrico se observó la presencia de miosina, proteína contráctil muscular; en el crecimiento volumétrico de motoneuronas se observaron transportadores vesiculares de acetilcolina (VChat), importantes para la sinapsis neuromuscular.

El PPy es una técnica de recubrimiento que puede ser utilizada en crecimientos bidimensionales, así como en crecimientos volumétricos; modifica las características superficiales de cualquier tipo de superficies, ayudando a un mejor anclaje celular, y por lo tanto, a favorecer el crecimiento y la diferenciación celular, ayudando en algunos casos a aumentar la supervivencia celular, y por lo tanto a la preservación de las características morfológicas y electrofisiológicas de las células. Al ser un material biocompatible y bioinerte, el PPy no altera las características morfológicas, eléctricas y de síntesis de proteínas específicas y neurotransmisores de las células sembradas sobre éste.

Se considera como trabajo a futuro, realizar una mayor alineación a las fibras del andamio, así como el uso de geles de fibrina, colágeno o puramatrix, que nos permitan tener un mejor crecimiento y desarrollo celular. Realizar cocultivos celulares sembrados en un mismo tipo de andamio de crecimiento; específicamente, realizar un modelo de crecimiento tridimensional de redes de uniones neuromusculares, utilizando los modelos celulares ya utilizados en el crecimiento volumétrico por separado, de células de músculo esquelético y motoneuronas. Utilizar a su vez, cocultivos con otros tipos de células que puedan recrear mejor la estructura celular del tejido para brindarle una mejor estructura y soporte. Realizar las pruebas funcionales correspondientes como registros electrofisiológicos, pruebas mecánicas para medir la contracción muscular y técnicas de inmunofluorescencia e histológicas. Obtener un adecuado modelo volumétrico de estudio de la formación de uniones neuromusculares que ayude al entendimiento de los procesos de desarrollo morfológico celular, así como al estudio de múltiples enfermedades que atacan de forma directa o indirecta las uniones neuromusculares, y que estos modelos puedan ser usados como sustitutos de tejidos en la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.

Apendice I. Diagrama de flujo de la metodología empleada

Referencias

- [1] Mueller-Klieser W. Three – dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1997; 273:1109-1123.
- [2] Elliott N, Yuan F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci.* 2011; 100:59-74.
- [3] Qutub A, Popel A. Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. *BMC Syst Biol.* 2009; 3:13.
- [4] Ayala P, Lopez J, Desai T. Microtopographical cues in 3D attenuate fibrotic phenotype and extracellular matrix deposition: implications for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16:2519-27.
- [5] Bott K, Upton Z, Schrobback K, Ehrbar M, Hubbell J, Lutolf M, et al. The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. *Biomaterials.* 2010; 31:8454-64.
- [6] Li C, Tian T, Nan K, Zhao N, Guo Y, Cui J, et al. Survival advantages of multicellular spheroids vs. monolayers of HepG2 cells in vitro. *Oncol Rep.* 2008; 20:1465-71.
- [7] Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng K, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res.* 1994; 212:97-104.
- [8] Chang T, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15:559-67.
- [9] Härmä V, Virtanen J, Mäkelä R, Happonen A, Mpindi J, Knuutila M, et al. A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS ONE.* 2010; 5:e10431.
- [10] Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8:839-845.
- [11] Toda S, Watanabe K, Yokoi F, Matsumura S, Suzuki K, Ootani A, Aoki, A., Koike, N., and Sugihara, H. A new organotypic culture of thyroid tissue maintains threedimensional follicles with C cells for a long term. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294:906–911.
- [12] Elliott N, Yuan F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci.* 2011; 100:59-74.
- [13] Lan S, Safiejko-Mroczka B, Starly B. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: a study of cell viability, morphology and drug metabolism. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24:1314-23.

- [14] Gurski L, Jha A, Zhang C, Jia X, Farach-Carson M. Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials*. 2009; 30:6076-85.
- [15] Chen W, Tabata Y, Tong Y. Fabricating tissue engineering scaffolds for simultaneous cell growth and drug delivery. *Curr Pharm Des*. 2010; 16:2388-94.
- [16] Seyednejad H, Ji W, Yang F, van Nostrum C, Vermonden T, van den Beucken J, et al. Coaxially electrospun scaffolds based on hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone) and loaded with VEGF for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. 2012; 13:3650-60.
- [17] Des Rieux A, Shikanov A, Shea L. Fibrin hydrogels for non-viral vector delivery in vitro. *J Control Release*. 2009; 136:148-54.
- [18] Lei P, Padmashali R, Andreadis S. Cell-controlled and spatially arrayed gene delivery from fibrin hydrogels. *Biomaterials*. 2009; 30:3790-9.
- [19] Ehrbar M, Djonov V, Schnell C, Tschanz S, Martiny-Baron G, Schenk U, et al. Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res*. 2004; 94:1124-32.
- [20] Matthews Gary G. *Cellular Physiology of Nerve and Muscle*. 4th ed 2003. Ed. Blackwell Publishing.
- [21] Vasin A, Zueva L, Torrez C, Volfson D, J. Troy Littleton T, Bykhovskaia M. Synapsin Regulates Activity-Dependent Outgrowth of Synaptic Boutons at the Drosophila Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience*. 2014;34:32:10554-10563; doi: 10.1523/JNEUROSCI.5074-13.2014.
- [22] Bente KP, Mark AF. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*. 2012; 8:457-465; doi:10.1038/nrendo.2012.49.
- [23] Alessandri-Haber N, Paillart C, Arsac C, Gola M, Couraud F and Crest M. Specific Distribution of sodium channels in axons of rat embryo spinal motoneurons. *Journal Physiology*. 1999; 518(1):203-214.
- [24] Freshney, IR. *Culture of animal Cells. A Manual of Basic Technique*, 5 ed. 2005. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- [25] Iturralde M, Coll J. Cultivo de células animales. *Med. Clin*. 1984. Cap.82: 273-280.
- [26] Nirenberg M, Wilson S, Higashida H, Rotter A, Krueger K, Busis N, Ray R, Kenimer JG, Adler M. Modulation of Synapse Formation by Cyclic Adenosine Monophosphate. *Science*. 1983; 222(4625):794-799.
- [27] Astermark J, Stenflo J. The epidermal growth-factor-like domains of factor IX. *J Biol Chem*. 1991; 266:438-443.

- [28] Douglas WHJ, McAter JA, Dell'Orco RT, Phelps D. Visualization of cellular aggregates cultured as a three-dimensional collagen sponge matrix. *In Vitro*. 1980; 16: 306-312.
- [29] Penel C, Gerard C, Mauchamp J, Verrier B. The thyroid cell monolayer in culture: a thight sodium absorbing epithelium. *Pflugers Arch*. 1989; 414:509-515.
- [30] Hayflick L, Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25:585-621.
- [31] Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Saphiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-1147.
- [32] Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three ambryonic germ layers. *Mol Med*. 2000; 6:88-95.
- [33] Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty M. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97:11307-11312.
- [34] O'Shea KS. Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction*. 2004; 71: 1755.1765.
- [35] Cibelli JB, Grant K, Chapman K, Cunniff K, Worst T, Green H, Walker S, Gutin P, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein P, Lanza R, Studer L, Vrana K, West M. Parthenogenetic Stem Cells in Nonhuman Primates. *Science*. 2002; 295(5556):819.
- [36] Kornblum H. Introduction to Neural Stem Cells. *Stroke*. 2007; 38:810-816.
- [37] Dhara S and Stice S. Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Journal of Neuronal Biochemistry*. 2008; 105:633-640.
- [38] Zuñiga-Aguilar E, Olayo R, Ramírez-Fernández O, Morales J, Godínez R. Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2014. DOI: 10.1080/09205063.2014.898124.
- [39] Shimada Y, Fischman DA, Moscona AA. The development of nerve-muscle junctions in monolayer cultures of embryonic spinal cord and skeletal muscle cells. *The Journal of Cell Biology*. 1969; 43 (2): 382-387.
- [40] Das M, Rumsey JW, Gregory CA, Bhargava N, Kang JF, Molnar P, Riedel L, Guo X, Hickman JJ. Embryonic motoneuron-skeletal muscle co-culture in a defined system. *Neuroscience*. 2007; 146; 481-488.
- [41] Wiese S, Herrmann T, Drepper C, Jablonka S, Funk N, Klausmeyer A, Rogers ML, Rush R, Sendtner M. Isolation and enrichment of embryonic mouse motoneurons from the

lumbar spinal cord of individual mouse embryos. *NATURE PROTOCOLS*. 2010; 5(1): 31-38.

[42] Conrad R, Jablonka S, Sczegan T, Sendtner M, Wiese S, Klausmeyer A. Lectin-based Isolation and Culture of Mouse Embryonic Motoneurons. *J. Vis. Exp.* 2011; 55 <http://www.jove.com/details.php?id=3200>.

[43] Haycock JW. *3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer. 2011; 695. DOI 10.1007/978-1-60761-984-0_1.

[44] Mueller-Klieser W. Three – dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1997; 273:1109-1123.

[45] Lee J, Cuddihy M, Kotov N. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Engineering: Part B*. 2008; 14(1).

[46] Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. VCell interactions with three-dimensional matrices. *Cell Biology*. 2002; 14:633–639.

[47] Hadjipanayi E, Mudera V, Brown R. Guiding cell migration in 3D: a collagen matrix with graded directional stiffness. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009; 66:121-8.

[48] Yao L, O'Brien N, Windebank A, Pandit A. Orienting neurite growth in electrospun fibrous neural conduits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90:483-91.

[49] Xie J, MacEwan M, Schwartz A, Xia Y. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale*. 2010; 2:35-44.

[50] Cao H, Liu T, Chew S. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61:1055-64.

[51] Subramanian A, Maheswari KU, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science*. 2009; 16:108 doi:10.1186/1423-0127-16-108.

[52] Lam M, Huang Y, Birla RK, Takayama S. Microfeature guided skeletal muscle tissue engineering for highly organized 3-dimensional free-standing constructs. *Biomaterials*. 2009; 30:1150–1155.

[53] Bian W and Bursac N. Tissue engineering of functional skeletal muscle: challenges and recent advances. *IEEE Eng Med Biol Mag*. 2008; 27(5):109–113.

[54] Yan W, Fotadar U, George S, Yost M, Price R, Terracio L. Tissue Engineering of Skeletal Muscle. *Microsc Microanal*. 2005; 11(2):1254-1255.

[55] Redfield A, Nieman MT, Knudsen KA. Cadherins Promote Skeletal Muscle Differentiation in Three-dimensional Cultures". *The Journal of Cell Biology*- 1997; 138(6):1323–1331.

- [56] Li Y, Song J, Yang P, Zou R, Fan X, Zhao Z. Establishment of a three-dimensional culture and mechanical loading system for skeletal myoblasts. *Cell Biology International*. 2009; 33:192-198.
- [57] Langelaan M, Boonen K, Polak R, Baaijens F, Post M, Van der Schaft D. Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends in Food Science & Technology*. 2010; 21:59-66.
- [58] Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein E, Kohane D, Darland D, Marini R, Blitterswijk C, Mulligan R, D'Amore P, Langer R. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nature Biotechnology*. 2005; 23(7):879-884.
- [59] Matsumoto T, Sasaki J, Alsberg E, Egusa H, Yatani H, Sohmura T. Three-Dimensional Cell and Tissue Patterning in a Strained Fibrin Gel System. *PlosOne*. 2007; 2(11):1-6.
- [60] Wang W, Fan M, Zhang L, Liu S, Sun L., Wang C. Compatibility of hyaluronic acid hydrogel and skeletal muscle myoblasts. *Biomed. Mater.* 2009; 4:1-7.
- [61] Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *PNAS*. 2003; 100(22):12741-12746.
- [62] Bian W, Bursac N. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture. *Biomaterials*. 2009; 30:1401–1412.
- [63] Riboldi S, Sampaolesi M, Neuenschwander P, Cossu G, Mantero S. Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*. 2005; 26:4606–4615.
- [64] Gilmore K, Kita M, Han Y, Gelmi A, Higgins MJ, Moulton S, Clark G, Kapsa R, Wallace G. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. *Biomaterials*. 2009; 30:5292–5304.
- [65] Kamelger FS, Marksteiner R, Margreiter E, Klima G, G. Wechselberger G, Hering S, Pizaa H. A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model. *Biomaterials*. 2004; 25:1649–1655.
- [66] Myers T, Nickerson C, Kaushal D, Otte C, Bentrup K, Ramamurthy R, Nelman M, Pierson D, Philipp M. (2008). Closing the phenotypic gap between transformed neuronal cell lines in culture and untransformed neurons. *Journal of Neuroscience Methods*. 2008; 174:31–41.
- [67] Irons H, Cullen D, Shapiro N, Lambert N, Lee R, LaPlaca M. “Three-dimensional neural constructs: a novel platform for neurophysiological investigation”. *J. Neural Eng.* 2008; 5:333–341.

- [68] Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishn S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2005; 26:2603–2610.
- [69] Corey JM, Gertz CC, Bor-Shuen W., Birrell LK, Johnson SL, Martin DC, Feldman LF. The design of electrospun PLLA nanofiber scaffolds compatible with serum-free growth of primary motor and sensory neurons. *Acta Biomaterialia*. 2008; 4: 863–875.
- [70] Schmidt CE, Leach JB: Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng*. 2003; 5:293-347.
- [71] Geller HM, Fawcett JW: Building a bridge: engineering spinal cord repair. *Exp Neurol*. 2002; 174:125-136.
- [72] Bellamkonda R, Ranieri JP, Bouche N, Aebischer P: Hydrogel-based three dimensional matrix for neural cells. *J Biomed Mater Res*. 1995; 29:663-671.
- [73] Carbonetto ST, Gruver MM: Nerve fiber growth on defined hydrogel substrates. *Science*. 1982; 216:897-899.
- [74] Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R: Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 1994; 12:689-693.
- [75] Olayo R, Ríos C, Salgado CH, Morales J. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008; 19:817-826.
- [76] Zuñiga-Aguilar E, Godinez R, Morales MA, Cifuentes F, Ramírez-Fernández O, Morales J, Olayo R. Crecimiento de Células Nerviosas Motoras sobre Material Modificado Superficialmente por Polimerización por Plasma. *IFMBEProceedings 2013*; 33:120-123.
- [77] Cruz JG, Mondragón-Lozano G, Díaz-Ruiz A, Manjarrez J, Olayo R, Salgado-Ceballos H, Olayo MG, Morales J, Alvarez-Mejía L, Morales A, Méndez-Armenta M, Plascencia N, Fernández M, Ríos C. Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *J Mater Sci: Mater Med*. 2012; 23: 2583–2592.
- [78] Olayo R, Ríos C, Salgado CH, Morales J. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008; 19:817-826.
- [79] Pérez-Tejada E, Gómez Quiroz LE, Morales J, Gutiérrez MC, Olayo MG, Cruz GJ, Olayo R. Cultivo de Hepatocitos sobre vidrio modificado con un polímero de pirrol sintetizado por plasma. *Superficies y Vacío*. 2007; 21(3):10-14.
- [80] Morales J, Pérez-Tejada E, Montiel CR, Torres VH, Olayo R. Modificación superficial por plasma aplicada a biomateriales [Surface modification by plasma applied to

biomaterials]. In: La Física Biológica en México: Temas Selectos 2 [Biological Physics in Mexico: Selected Items 2]. México D. F.: Colegio Nacional. 2008, p. 241–257.

[81] Ramírez – Fernández O, Godínez R, Morales J, Gómez-Quiroz L, Gutiérrez-Ruiz MC, Zuñiga-Aguilar E, Olayo R. Superficies modificadas mediante polimerización por plasma para cocultivos de modelos hepáticos. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 2012; 33(2): 127-135.

[82] Olayo R, Ríos C, Salgado-Ceballos H, Morales J. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2008; 19:817–826.

[83] Dhillon A, Kaur A, Srivastava AK, Avasthi DK. Experimental investigations of semi-crystalline plasma polymerized polypyrrole for surface coating. *Prog. Org. Coat.* 2010; 69:396–401.

[84] Zhang J, Wu MZ, Pu TS, Zhang ZY, Jin RP, Tong ZS, Zhu DZ, Cao DX, Zhu FY, Cao JQ. Investigation of the plasma polymer deposited from pyrrole. *Thin Solid Films*. 1997; 307:14–20.

[85] Wang J, Neoh KG, Kang ET. Comparative study of chemically synthesized and plasma polymerized pyrrole and thiophene thin films. *Thin Solid Films*. 2004;446:205–217.

[86] Wichterle H, Lieberam I, Porter J, Jessel T. Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into Motor Neurons. *CELL*. 2002; 110:385-397.

[87] Miles G, Yohn D, Wichterle H, Jessell T, Rafuse V, Brownstone R. Functional Properties of Motoneurons Derived from Mouse Embryonic Stem Cells. *The Journal of Neuroscience*. 2004; 24(36):7848-7858.

[88] López-González R, Kunckles P, Velasco I. Transient Recovery in a Rat Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis After Transplantation of Motor Neurons Derived From Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Transplantation*. 2009; 18:1171–1181.

[89] Hubbard KS, Gut IM, Scheeler SM, Lyman ME, McNutt PM. Compatibility of SYTO 13 and Hoechst 33342 for longitudinal imaging of neuron viability and cell death. *BMC Res. Not.* 2012;5:1–5. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/437>.

[90] Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*. 1993;365:27–32.

[91] Hille B. Classical biophysics of the squid giant axon. In: Hille B, editor. *Ion channels on excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland (MA): University of Washington, Sinauer Associate; 2001. p. 441–469.

[92] Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol* 1952;17:500–544.

[93] Hodgkin AL, Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of loligo. *J. Physiol.* 1952;116:449–472.

Apendice I. Diagrama de flujo de la metodología

