



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**“DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE INGENIERÍA TISULAR EN LA
DIFERENCIACIÓN CELULAR CEREBRAL, COMO POSIBLE HERRAMIENTA
TERAPÉUTICA EN LESIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).”**

Presentado por:

Génesis Nicole Argueta Barrios

8-963-716

Asesor:

Diego A. Reginensi E.

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE INGENIERÍA TISULAR EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR CEREBRAL, COMO POSIBLE HERRAMIENTA TERAPÉUTICA EN LESIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC).”

Por:

Génesis Nicole Argueta Barrios _____

8-963-716

Trabajo de Graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Genética y Biología Molecular.

Dr. Diego Reginensi _____
Presidente

Dr. Ariel Magallón _____
Jurado

Mgtr. Ovidio Durán _____
Jurado

DEDICATORIA

Para mi amada familia, que me han dado la oportunidad de seguir mis deseos y me han apoyado incondicionalmente en alcanzar este logro.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme alcanzar esta importante etapa en mi vida. A mi madre, Elizabeth Barrios, y a mi padre, Porfirio Argueta, les expreso mi más profundo agradecimiento por su apoyo emocional constante y por haberme alentado en los momentos más difíciles de este proceso. A mi hermana, Astrik Argueta, agradezco sus valiosos consejos y su ánimo inquebrantable.

A mi pareja, Ricardo Gómez, le agradezco de corazón por el apoyo incondicional en los momentos más difíciles, cuando sentí la tentación de rendirme. A mis amigos y compañeros, les agradezco por sus consejos, palabras de aliento, su sentido del humor y carisma, que hicieron que mis días en el laboratorio fueran mucho más agradables.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi asesor principal, el Dr. Diego Reginensi, por su guía, apoyo y generosidad al compartir su conocimiento a lo largo de esta travesía. También agradezco profundamente al Dr. Luis Luis, por su apoyo constante, sus consejos y conocimientos que fueron fundamentales para realizar esta tesis; A mis co-asesores, el Dr. Ariel Magallón y el Mgtr. Ovidio Durán, por la confianza depositada en mí y el tiempo dedicado a mi formación.

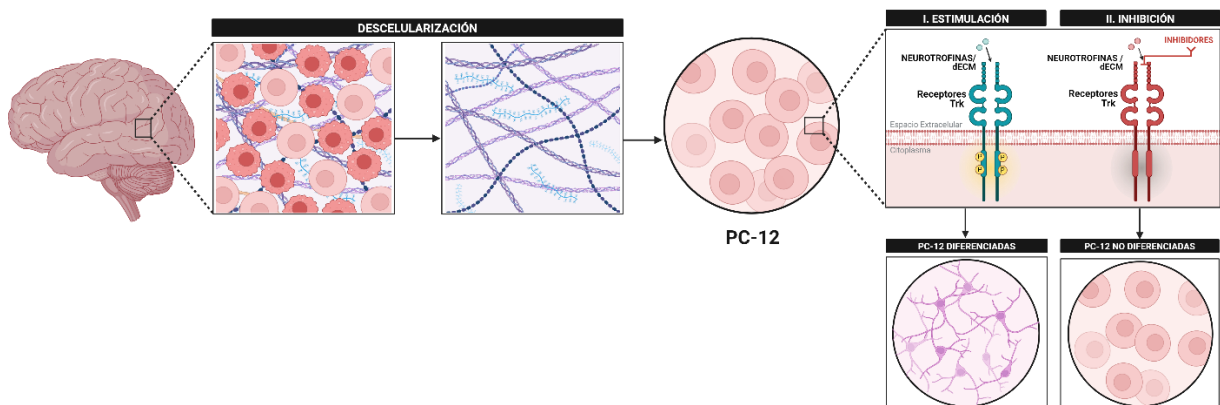
Finalmente, agradezco sinceramente al Dr. Jay Molino y a UDELAS por el apoyo y por facilitarme las instalaciones, fundamentales para el desarrollo de mis actividades.

RESUMEN

En el campo de las ciencias, existe un gran número de especialistas que buscan explicar y establecer un modelo respecto a la forma en la que funciona, se desarrolla y se mantiene el sistema nervioso humano. En el ser humano, los factores neurotróficos juegan un papel clave, ya sea desde las etapas más tempranas del desarrollo embrionario hasta la plasticidad sináptica en la edad adulta. El proyecto de opción de grado titulado “Desarrollo de estrategias de ingeniería tisular en la diferenciación celular cerebral, como posible herramienta terapéutica en lesiones del sistema nervioso central (SNC)”, tiene como objetivo principal la evaluación del efecto fisiológico de los factores neurotróficos, ya sea aislada y/o integrados en la matriz extracelular (ECM) en un cultivo celular, basado en un modelo unidireccional de diferenciación.

Este proyecto se basó en dos etapas experimentales: (i) la primera, se enfocó en la diferenciación de la línea celular PC-12 (células de feocromocitoma de rata) a linaje neuronal, mediante inducción a través de factores neurotróficos y matriz extracelular descelularizada (dECM) (ii) la segunda etapa, se enfocó en la inhibición de las rutas de señalización (p.e receptores tirosina quinasa) de los factores neurotróficos y dECM. Los resultados obtenidos nos indicaron que las vías de señalización mediadas por BDNF/TrkB y NGF/TrkA y la dECM, como factor soluble, son capaces de promover la diferenciación celular. A partir de esta información sobre cómo se da la interacción factor-receptor, se realizaron experimentos de bloqueo de las vías NGF/TrkA, BDNF/TrkB y dECM cerebral mediante la administración de los inhibidores GW441756

y ANA-12 respectivamente. Y se obtuvo que la inhibición específica de estos receptores reduce significativamente la diferenciación celular en células PC-12 tratadas con NGF y BDNF. Además, la inhibición de TrkB produjo una disminución en la diferenciación celular, lo que sugiere que las señales bioactivas presentes en la dECM podrían interactuar preferentemente con las rutas de señalización activadas por BDNF. Este conocimiento puede ser de gran importancia para profundizar en el conocimiento sobre el mecanismo de acción dentro del sistema nervioso, lo cual es de suma relevancia en estudios sobre el desarrollo de tratamientos de una amplia gama de trastornos neurológicos y psiquiátricos.



Resumen gráfico. Resumen de las etapas experimentales desarrolladas, en donde la etapa (I) está dirigida a la diferenciación celular y (II) la inhibición específica de los receptores.

ABSTRACT

In the field of science, there are a large number of specialists who seek to explain and establish a model for how the human nervous system functions, develops and maintains itself. In humans, neurotrophic factors play a key role, from the earliest stages of embryonic development to synaptic plasticity in adulthood. The undergraduate project entitled “Development of tissue engineering strategies in brain cell differentiation as a possible therapeutic tool in central nervous system (CNS) lesions”, has as its main objective the evaluation of the physiological effect of neurotrophic factors, either isolated and/or integrated in the extracellular matrix (ECM) in a cell culture, based on a unidirectional model of differentiation.

This project was based on two experimental stages: (i) the first one focused on the differentiation of the PC-12 cell line (rat pheochromocytoma cells) to neuronal lineage, by induction through neurotrophic factors and decellularized extracellular matrix (dECM) (ii) the second stage focused on the inhibition of the signaling pathways (e.g. tyrosine kinase receptors) of the neurotrophic factors and dECM. The results obtained indicated that signaling pathways mediated by BDNF/TrkB and NGF/TrkA and dECM, as a soluble factor, are able to promote cell differentiation. Based on this information on how the factor-receptor interaction occurs, experiments were performed to block the NGF/TrkA, BDNF/TrkB and brain dECM pathways by administering GW441756 and ANA-12 inhibitors, respectively. And it was obtained that specific inhibition of these receptors significantly reduced cell differentiation in PC-12 cells treated with NGF and BDNF. Moreover, inhibition of TrkB resulted in decreased cell differentiation,

suggesting that bioactive signals present in dECM might preferentially interact with BDNF-activated signaling pathways. This knowledge may be of great importance to deepen the understanding of the mechanism of action within the nervous system, which is of utmost relevance in studies on the development of treatments for a wide range of neurological and psychiatric disorders.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	16
PROBLEMÁTICA	20
JUSTIFICACIÓN.....	23
OBJETIVOS.....	27
MARCO TEÓRICO	29
1. Las células PC-12 como modelo en investigaciones neurobiológicas	30
2. Los Factores Neurotróficos	32
2.1 Las neurotrofinas.....	33
2.2 Los receptores TrK	35
3. Mecanismos de activación y señalización intracelular.	38
4. Matriz extracelular cerebral.	40
4.1 Composición y función de la matriz extracelular	40
4.2 Composición específica de la matriz extracelular cerebral.....	42
5. Matriz extracelular cerebral, como andamio en ingeniería tisular.	44
5.1 Papel de la matriz extracelular cerebral en la señalización celular.	44
5.2 Matriz extracelular cerebral como moduladora de procesos celulares cerebrales.	46
6. Bloqueo de señalización neurotrófica.	46

6.1	Métodos de bloqueo de receptores de factores neurotróficos.	47
6.2	Efectos del bloqueo en la diferenciación celular.	48
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		49
1.	Obtención y Caracterización de matriz extracelular de cerebro porcino	50
1.1	Obtención de la matriz extracelular descelularizada de cerebro porcino	50
1.2	Cuantificación de ADN.....	50
1.3	Cuantificación de proteínas, azúcares y lípidos	51
1.3.1	Cuantificación de proteínas.....	51
1.3.2	Cuantificación de Lípidos	52
1.3.3	Cuantificación de azúcares	53
1.4	Histología.....	54
1.5	Prueba de esterilidad de tejidos.....	55
2.	Establecimiento de cultivo de línea celular PC-12.....	56
2.1	Preparación de placa.....	57
3.	Diferenciación a morfología neuronal de PC12.....	58
3.1	Diferenciación con factor neurotrófico NGF	58
3.2	Diferenciación con factor neurotrófico BDNF	58
3.3	Diferenciación con matriz extracelular descelularizada.....	59
4.	Caracterización de células diferenciadas por factores neurotróficos.....	60
4.1	Caracterización por inmunofluorescencia	60
5.	Bloqueo de receptores específicos de factores neurotróficos	62
5.1	Inhibición selectiva del receptor tirosina quinasa A (TrkA) - GW441756.....	62

5.2	Inhibición selectiva del receptor BDNF tirosina quinasa B (TrkB) – ANA-12.....	63
6.	Cuantificación de extensiones neuríticas mediante herramientas computacionales.....	64
	RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	66
1.	Obtención y caracterización de matriz extracelular de cerebro porcino.....	67
1.1	Disección y descelularización del cerebro porcino.....	67
1.2	Evaluación de material genético en dECM	68
1.3	Evaluación de contenido de proteínas en dECM	70
1.4	Evaluación de contenido de lípidos en dECM.....	72
1.5	Evaluación de contenido de azúcares en dECM.....	73
1.6	Evaluación de esterilidad de dECM	74
2.	Diferenciación a morfología neuronal de PC-12.....	75
2.1	Diferenciación con factores neurotróficos NGF / BDNF.....	75
2.1.1	Caracterización de células diferenciadas por factores neurotróficos.....	79
2.2	Diferenciación con factor soluble de dECM	79
3.	Inhibición de Receptores Trk.....	82
3.1	Inhibición de estimulación con factores neurotróficos.....	82
3.2	Inhibición de estimulación con factor soluble de dECM	84
	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	89
1.	Obtención y caracterización de matriz extracelular de cerebro porcino.....	90
2.	Modulación <i>in vitro</i> de la diferenciación celular	95
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	105

CONCLUSIONES	106
RECOMENDACIONES	107
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA RELACIÓN NEUROTROFINA – RECEPTOR TIROSINA QUINASA (TRK).....	18
FIGURA 2. CULTIVO DE CÉLULAS PC-12	31
FIGURA 3. ESQUEMA DE INTERACCIONES ENTRE NEUROTROFINAS Y RECEPTORES TRK	34
FIGURA 4. ESQUEMA DE ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES TRKA, TRKB Y TRKC	36
FIGURA 5. ESQUEMA DE UNIÓN LIGANDO - RECEPTOR QUE CONLLEVA AL DESENCADENAMIENTO DE VÍAS INTRACELULARES.....	40
FIGURA 6. ESQUEMA DE LA COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR CEREBRAL	43
FIGURA 7. DIAGRAMA DE CUANTIFICACIÓN DE ADN EN TEJIDO NATIVO Y DESCELULARIZADO.	51
FIGURA 8. DIAGRAMA DE ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y AZÚCARES EN TEJIDO NATIVO Y DESCELULARIZADO.	53
FIGURA 9. DIAGRAMA DE TINCIÓN DE TEJIDOS NATIVOS Y DESCELULARIZADOS.	55
FIGURA 10. DIAGRAMA DE PRUEBA DE ESTERILIDAD BACTERIANA	56
FIGURA 11. DIAGRAMA DE PRUEBA DE ESTERILIDAD MICOLÓGICA	56
FIGURA 12. DIAGRAMA DE EXPANSIÓN Y CULTIVO CELULAR.....	57
FIGURA 13. DIAGRAMA DE ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS PC-12 CON EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) Y FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF).....	59
FIGURA 14. DIAGRAMA DE ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS PC-12 CON MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA (CORTEZA, CEREBELO Y TRONCO).	60
FIGURA 15. DIAGRAMA DE TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	62
FIGURA 16. DIAGRAMA DE BLOQUEO DE RECEPTOR TRKA CON INHIBIDOR GW441756	63
FIGURA 17. DIAGRAMA DE BLOQUEO DE RECEPTOR TRKB CON INHIBIDOR ANA-12	64
FIGURA 18. DISECCIÓN Y DESCELULARIZACIÓN DE CEREBRO PORCINO.	68
FIGURA 19. ELECTROFORESIS DE ADN DE TEJIDO NATIVO Y DESCELULARIZADO.....	69
FIGURA 20. EVALUACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL CONTENIDO NUCLEAR EN DECM.....	70

FIGURA 21. EVALUACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL CONTENIDO PROTEICO EN dECM.....	71
FIGURA 22. EVALUACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL CONTENIDO LIPÍDICO EN dECM.	72
FIGURA 23. EVALUACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL CONTENIDO DE AZÚCARES EN dECM.	74
FIGURA 24. PRUEBA DE ESTERILIDAD EN TEJIDOS DESCELULARIZADOS	75
FIGURA 25. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE PC-12 BAJO ESTIMULACIÓN CON FACTORES NEUROTRÓFICOS	76
FIGURA 26. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE PC-12 BAJO ESTIMULACIÓN CON NGF.....	76
FIGURA 27. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE PC-12 BAJO ESTIMULACIÓN CON BDNF.....	77
FIGURA 28. CARACTERIZACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA	79
FIGURA 29. ESTIMULACIÓN CON FACTOR SOLUBLE DE dECM.	80
FIGURA 30. INHIBICIÓN MEDIDA POR GW441756 Y ANA-12..	82
FIGURA 31. INHIBICIÓN MEDIDA POR GW441756 Y ANA-12 EN CÉLULAS PC-12 ESTIMULADAS CON dECM	84

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE PC-12 BAJO ESTIMULACIÓN CON FACTORES NEUROTRÓFICOS	78
GRÁFICA 2. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ESTIMULACIÓN MEDIADA POR DECM.	81
GRÁFICA 3. CUANTIFICACIÓN DE DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LA INHIBICIÓN DE RECEPTORES TRKA Y TRKB RESPECTIVAMENTE, BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE NGF, BDNF, FACTOR SOLUBLE DE DECM DE LAS ÁREAS CEREBELO, CORTEZA Y TRONCO.....	86
GRÁFICA 4. CUANTIFICACIÓN DE LA LONGITUD NEURÍTICA DE LA INHIBICIÓN DE RECEPTORES TRKA Y TRKB RESPECTIVAMENTE, BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE NGF, BDNF, FACTOR SOLUBLE DE DECM DE LAS ÁREAS CEREBELO, CORTEZA Y TRONCO.....	87

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los seres humanos están formados por varios sistemas que trabajan de manera coordinada para mantener el equilibrio y garantizar su supervivencia. El sistema nervioso, juega un rol en prácticamente todos los aspectos de nuestra salud y bienestar. Guía nuestro diario vivir desde el momento en que nos despertamos; las actividades automáticas como respirar; y procesos que involucran más complejidad como pensar, leer, recordar y sentir emociones. Su componente más importante, el cerebro, es quizás el más complejo de todos los órganos que conforman el ser humano. Un cerebro desarrollado se compone aproximadamente de 86 mil millones de células que procesan información, conocidas como neuronas, y 85 mil millones de células no neuronales (Herculano-Houzel, 2012; Maldonado & Alsayouri, 2023; Stiles & Jernigan, 2010)

Estas son células excitables que transmiten señales por todo el cuerpo mediante un proceso eléctrico-químico, proceso denominado: sinapsis. Durante la sinapsis, generalmente, el terminal axonal (zona presináptica) transmite las señales hacia la zona dendrítica (zona postsináptica) (Ludwig & Varacallo, 2023).

Durante la sinapsis química entran en el juego moléculas de gran importancia, para el funcionamiento y regulación de la formación de las conexiones sinápticas, donde promueven la supervivencia y plasticidad de las neuronas conectadas, estas son llamadas neurotrofinas o factores neurotróficos (Gómez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2013; Hernández-Echeagaray, 2020).

Las neurotrofinas es una familia de proteínas que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso, desde la diferenciación celular, crecimiento de las neuritas, hasta la muerte celular natural. Estas actúan sobre las neuronas centrales y periféricas, de forma sinérgica, en un momento determinado del desarrollo cerebral (S. D. Skaper, 2018). Existen cuatro neurotrofinas caracterizadas: factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4 (NT-4) (Huang & Reichardt, 2001a). El efecto molecular de las diversas neurotrofinas es por acción de su unión con receptores específicos de tirosina quinasa (Trk) (Huang & Reichardt, 2003). Donde el NGF se une a TrkA, BDNF y NT-4 a TrkB, por último, NT-3 a TrkC (*Figura 1*) (S. D. Skaper, 2018).

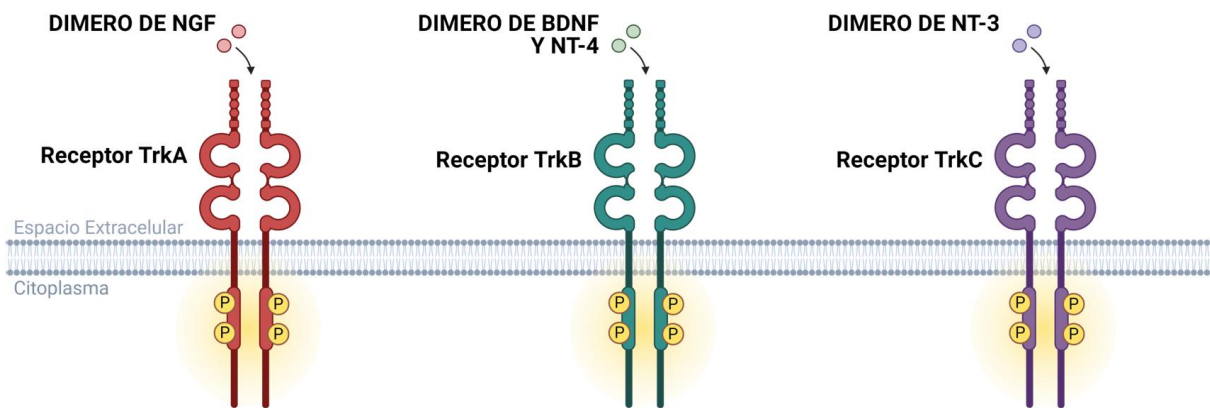


Figura 1. Esquema relación neurotrofina – receptor tirosina quinasa (Trk).

La promoción de la supervivencia de las neuronas durante su desarrollo embrionaria y/o tras un daño fisiológico (p.e traumatismo, neurodegeneración, etc), ha promovido el interés por la comprensión de los mecanismos de acción de las neurotrofinas, las cuales tienen una gran capacidad de actuar como agentes terapéuticos para el posible tratamiento de lesiones provocadas en el sistema nervioso y enfermedades

neurodegenerativas (Alfonsetti et al., 2023; Ibáñez, 1995). La comprensión biológica de los mecanismos de acción, a nivel molecular, de estos polipéptidos neurotróficos, ha permitido diseñar derivados y análogos con propiedades farmacológicas específicas (Ibáñez, 1995).

La matriz extracelular (MEC), corresponde al ecosistema cerebral y tiene por función actuar de sustrato en los procesos de migración, proliferación y diferenciación celular en el sistema nervioso (Naidu, 2009). La matriz extracelular se localiza entre las neuronas y las células gliales representando aproximadamente el 20% del volumen total del cerebro (Lam et al., 2019; Rike & Stern, 2023). Sus funciones principales durante el desarrollo del SNC, es proporcionar el entorno que regula la migración celular, el guiado axonal y la sinaptogénesis; mientras que en el SNC adulto, ayuda a mantener la estabilidad sináptica (Lam et al., 2019). Estudios recientes, indican que moléculas de la MEC, tales como: proteoglicanos, glicoproteínas, factores de crecimiento relacionadas en los procesos cerebrales, utilizan mecanismos de interacción con diversos receptores de la superficie celular y activan cascadas intracelulares (Dityatev & Schachner, 2003).

Descrito lo anterior, el objetivo de este estudio es comprender el papel funcional de los factores neurotróficos como un mecanismo de diferenciación celular y tanto mediante experimentos de inducción / bloqueo en cultivo celular. Este proyecto tiene como visión a futuro el desarrollo de terapias contra enfermedades del SNC.

PROBLEMÁTICA

Una de los mayores desafíos terapéuticos en la medicina son las lesiones del sistema nervioso central (SNC), sin embargo, actualmente el tratamiento de las lesiones axonales sigue siendo un desafío sin resolver debido a la limitada capacidad de regeneración del tejido nervioso (F. Han et al., 2020). Por ello, los traumatismos craneoencefálicos, los accidentes cerebrovasculares y las enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson o el Alzheimer, que afectan gravemente a un gran porcentaje de la población mundial, carecen de tratamiento completamente efectivo. Es por eso que es importante en el campo de la neurociencia, la comprensión de los procesos biológicos cerebrales y la búsqueda de nuevas terapias que permitan reparar el daño neuronal y restaurar las funciones perdidas (Fan et al., 2022).

Los factores neurotróficos tienen un papel fundamental en el SNC, en la plasticidad sináptica, proliferación y supervivencia neuronal y también el soporte trófico de las células gliales (Abe, 2000; Alfonsetti et al., 2023; Levy et al., 2012). Sin embargo, es bien sabido que las alteraciones de los niveles de factores neurotróficos o de sus receptores pueden provocar la muerte neuronal y promover diversas patologías (p.e enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer) y envejecimiento (Levy et al., 2012).

La alteración de estos factores neurotróficos causa distintas patologías en el sistema nervioso (Levy et al., 2012). Por ello, la incorporación de factores neurotróficos puede mejorar la supervivencia de las neuronas y células gliales, en estudios tanto *in vitro* (Siebert & Osterhout, 2021), como *in vivo* (Bondarenko & Saarma, 2021; Lindholm et

al., 2007). Son numerosos los trabajos experimentales y ensayos clínicos que han evaluado la administración de factores neurotróficos, como posible tratamiento terapéuticos en lesiones del SNC (Fursa et al., 2024); lo cual queda demostrado mediante numerosos estudios experimentales que se datan como mínimo hace 25 años, los convierte en un interesante candidato como agente co-terapéutico, en combinación, diversos biomateriales / terapia celular en las enfermedades cerebrales (Alfonsetti et al., 2022).

JUSTIFICACIÓN

Se tiene por justificación de la investigación múltiples aristas, tales como:

1.1 La importancia de la comprensión de la matriz extracelular cerebral / factores neurotróficos, como señales fisiológicas cerebrales.

Las interacciones de la dECM cerebral / factores neurotróficos y su participación como señalizadores en la activación de vías intracelulares describen la complejidad de la fisiología del sistema nervioso en la supervivencia, desarrollo y función de las células nerviosas. A pesar del creciente interés del campo, aun diversos aspectos siguen siendo objeto de debate y quedan por explicar hallazgos contradictorios. La investigación básica sobre la regulación general de los factores neurotróficos dentro del sistema nervioso, pueden, en un futuro, conllevar el descubrimiento de posibles procesos terapéuticos. Por ende, la comprensión del papel de estas proteínas es clave en diversas afecciones fisiopatológicas, como podemos mencionar: enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)), depresión, trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad, entre otros. Además, las alteraciones en la ECM se han asociado con diversas enfermedades neurológicas, lo que la convierte en un blanco potencial para nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en la regeneración y funcionalidad neuronal. Dado su papel en la supervivencia, proliferación y migración celular en el SNC, comprender esta compleja red de señalización es fundamental para el desarrollo de nuevas terapias.

1.2 dECM cerebral / señales neurotróficas, como posibles diana terapéuticas.

Los factores neurotróficos hoy en día cuentan con una base científica sólida, son numerosos los estudios que han descrito el mecanismo molecular específico de los factores neurotróficos ante la inflamación, lesión, apoptosis, diferenciación celular, crecimiento neurítico, entre otros del sistema nervioso central. De esta forma, se posiciona como dianas terapéuticas prometedoras e incluso como complemento de terapias existentes, debido a que los factores neurotróficos podrían potenciar otros tipos de intervenciones como las terapias génicas y el uso de biomateriales.

De esta forma, este estudio es de gran relevancia ya que el desarrollo de enfoques terapéuticos basados en la diferenciación celular podría abrir nuevas posibilidades para el tratamiento de lesiones en el SNC, mejorando las opciones de recuperación y ofreciendo nuevas esperanzas para pacientes (F. Han et al., 2020).

Por lo que estudio tiene por impacto que el desarrollo de este proyecto va acorde con las necesidades clínicas actuales de desarrollar terapias regenerativas que permitan superar las limitaciones de los enfoques tradicionales, como las terapias farmacológicas, que solo ofrecen un alivio sintomático. Además, la comprensión de los mecanismos de diferenciación neuronal, como los factores neurotróficos, facilitarían el desarrollo de tecnologías que promuevan la regeneración del tejido cerebral dañado. De igual forma, a nivel económico podrían reducir el valor o costo que va a asociado al cuidado a largo plazo de pacientes con lesiones del SNC y mejorar su calidad de vida.

Dentro de este contexto, la dECM es una estrategia innovadora en el campo de la medicina regenerativa, ya que recrea un microambiente biomimético que favorece la diferenciación neuronal y la reparación del tejido nervioso. Su capacidad para regular la disponibilidad de factores neurotróficos y la respuesta inflamatoria en el SNC la convierte en una opción terapéutica prometedora. Además, su combinación con células madre y terapias génicas podría potenciar la regeneración neuronal y mejorar la funcionalidad en pacientes con enfermedades neurodegenerativas o lesiones traumáticas, ofreciendo nuevas alternativas con un impacto significativo en su recuperación y calidad de vida.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial de la dECM / neurotrofinas, derivadas de tejido cerebral, como posible estrategia terapéutica en Biomedicina.

Objetivos Específicos

- I. Establecer un estudio *in vitro*, de diferenciación unidireccional, basado en la aplicación de dECM cerebral / factores neurotróficos.
- II. Desarrollar estrategias *in vitro* en el bloqueo molecular para la dECM cerebral / factores neurotróficos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Las células PC-12 como modelo en investigaciones neurobiológicas

El uso *in vitro* de sustancias químicas en células de origen animal o humano, nos permiten observar los efectos específicos en células de forma individual o importantes vías moleculares que son ampliamente utilizadas para estudiar la neurodegeneración. Para esto, la elección del linaje celular adecuado al diseño experimental es clave para obtener los resultados esperados (Wiatrak et al., 2020a).

Distintos estudios neurobiológicos emplean el linaje celular PC-12. Estas células también llamadas células del feocromocitoma, clon 12 (PC-12), es una línea celular que se obtienen del feocromocitoma de rata originado en las células cromafines de la médula suprarrenal. Este linaje celular monoclonal fue trasplantado de un meduloblastoma suprarrenal de rata por Greene y Tischler en 1976 (Greene & Tischler, 1976; Xie et al., 2023).

En la actualidad, han sido descritos una gran variedad de células PC-12 (Martin & Grishanin, 2003), sin embargo, existen dos grandes variantes de este linaje celular, según –American Type Culture Collection (ATCC)- están las células PC12 tradicionales (PC12, ATCC CRL-1721), cuyo crecimiento es en suspensión, y las adherentes (PC12 Adh, ATCC CRL-1721.1). Las células PC12 en suspensión crecen como pequeños grupos celulares flotantes de forma irregular o como unas pocas células dispersas ligeramente adheridas (*Figura 2*). Suelen agregarse y no adherirse a superficies no recubiertas. Son células pequeñas (6-14 μm de diámetro), de morfología redonda, con un tiempo de duplicación de entre 48 y 96 horas (Fujita et al.,

1989). Están caracterizadas por tener gránulos secretores para reservas moléculas pequeñas, hormonas peptídicas, neuropéptidos y enzimas de procesamiento; Sin embargo, su principal característica es la neuro secreción de catecolaminas (dopamina y noradrenalina), la presencia de canales iónicos y receptores de neurotransmisores, lo que las convierte en un modelo adecuado para estudiar la neuro secreción y la diferenciación neuronal (Kassas et al., 2012; Wiatrak et al., 2020a).

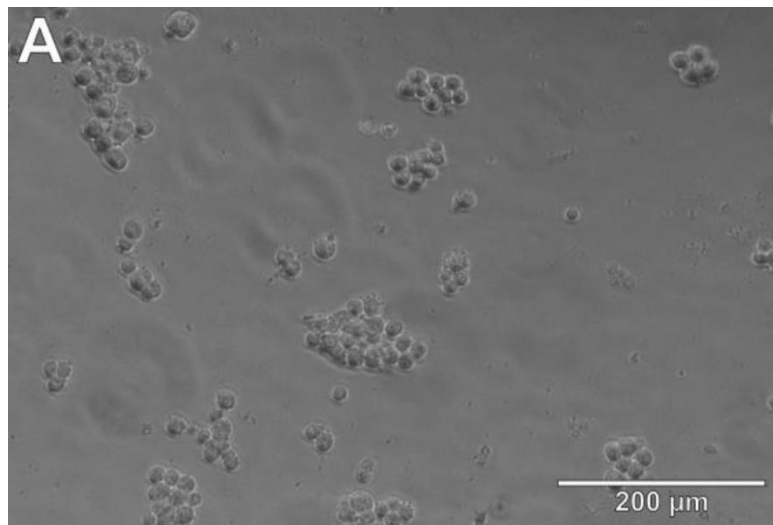


Figura 2. Cultivo de células PC-12. Se aprecia la formación de agrupaciones o “clúster” de células PC-12 (Balon & Wiatrak, 2021).

Debido a su característica de diferenciarse en células similares a neuronas, que implica el crecimiento de neuritas en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF) (Greene & Tischler, 1982) las convierte en una herramienta esencial para los investigadores que estudian la complejidad del sistema nervioso. De esta forma, la versatilidad de las PC12 ha sido ampliamente usada en neurobiología para estudiar áreas como la regeneración nerviosa y diferenciación celular. Estudios realizados por (Sultan et al., 2021) demostraron los efectos de las células madre de la pulpa dental y

sus factores derivados sobre la diferenciación, supervivencia y proliferación de las células PC12, revelando una vía prometedora para la regeneración nerviosa. En otros estudios como el de (Ando et al., 2021) se han centrado en la osteocalcina, una proteína derivada del hueso conocida por su capacidad de unión al calcio, como promotora de la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células PC12, y se destaca que esta proteína mejora las propiedades neuronales.

De igual forma, el uso de estas células se extiende hasta la detección de fármacos, principalmente para evaluar compuestos neuro protectores y neurodegenerativos, esencial para encontrar tratamientos de enfermedades neurodegenerativas. Un estudio realizado por (Shanmuganathan et al., 2018) enfatizó las propiedades neuro protectoras del α -bisabolol en un modelo de enfermedad de Parkinson utilizando la línea celular PC-12 y demostró que el α -bisabolol tiene la capacidad de reducir la amiloidogénesis y la apoptosis al mismo tiempo que regulaba los efectos neurotóxicos de la beta amiloide.

2. Los Factores Neurotróficos

En el sistema nervioso de vertebrados el desarrollo, funcionamiento y mantenimiento está regulado por neurotrofinas que al unirse a receptores tirosina quinasa activan diversas vías de señalización. Estas regulan aspectos como el crecimiento de los axones, el destino celular, el patrón de inervación y la expresión de proteínas (neurotransmisores y canales iónicos) importante para el funcionamiento de neuronal;

Además, controlan la función, plasticidad sináptica y supervivencia neuronal en un sistema nervioso maduro (Reichardt, 2006).

2.1 Las neurotrofinas

Son una familia de proteínas que regulan procesos como la creación, supervivencia, crecimiento, diferenciación y muerte de neuronas en el sistema nervioso periférico y central (Huang & Reichardt, 2001). En mamíferos, existen cuatro neurotrofinas que han sido caracterizadas: factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4 (NT-4) derivan de un gen ancestral común, son similares en secuencia y estructura y, por tanto, se denominan colectivamente neurotrofinas (Huang & Reichardt, 2001; F. S. Lee et al., 2001).

La primera neurotrofina en ser identificada en la década de 1950 fue el NGF (Alastra et al., 2021; Cowan, 2001), la producción de esta proteína sucede por la separación o ruptura de su precursor (pro-NGF), que tiene una función distinta a la descrita del NGF maduro (Wang et al., 2014) que promueve el crecimiento, la diferenciación y la función de las células nerviosas y el mantenimiento de las neuronas (Toti et al., 2006; Wang et al., 2014). El segundo más estudiado de la familia de las neurotrofinas en el SNC es BDNF. En 1982, fue por primera vez purificado a partir de cerebro de cerdo, donde se demostró que cumple con funciones que favorecen la supervivencia de una subpoblación de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Barde et al., 1982). Se sintetiza a partir del pro-BDNF (precursor) para formar el BDNF maduro (Benarroch, 2015a).

Por otro lado, los factores neurotróficos 3 y 4 (NT-3; NT-4), son parte de la familia de las neurotrofinas. NT-3 fue descubierto después de NGF y BDNF donde se demostró que ayuda al crecimiento de neuritas tanto del ganglio nodoso como del ganglio simpático (Maisonpierre et al., 1990). Estas proteínas desencadenan múltiples vías que dan lugar a múltiples respuestas celulares, pero para que suceda esto, es necesario que se unan a un receptor.

Los efectos del NGF están mediados por la unión a su receptor de alta afinidad catalíticamente activo, el receptor *trkA*, que se encuentra en la superficie celular (Huang & Reichardt, 2003; Vera et al., 2014). La NT-3 se une con mayor afinidad a la *trkC* y también se une con menor afinidad a *trkB* (Razavi et al., 2015), mientras que la NT-4, al igual que el BDNF, se une a *trkB* (Figura 3) (Benarroch, 2015a).

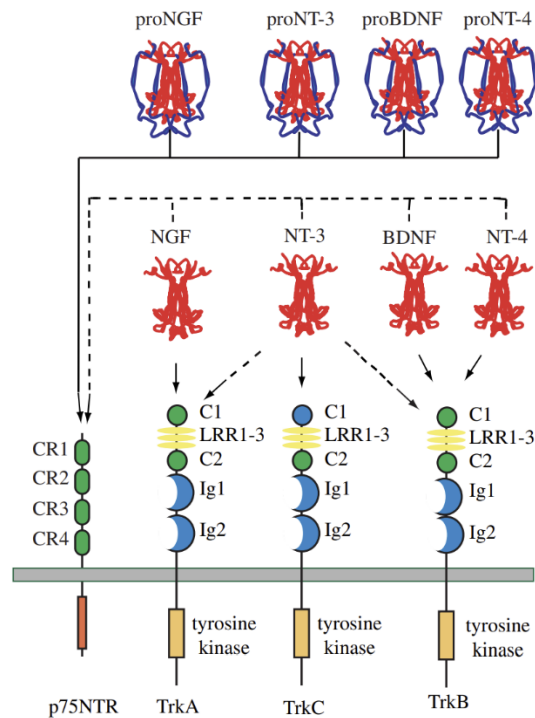


Figura 3. Esquema de interacciones entre neurotrofinas y receptores Trk. (Reichardt, 2006).

2.2 Los receptores Trk

Estos receptores de neurotrofinas desempeña un papel fundamental en la ontogenia del sistema nervioso de los mamíferos, desempeñando funciones cruciales en la neurogénesis (Barbacid, 1995). La regulación de la supervivencia celular, proliferación, destino de los precursores neurales, crecimiento y patrón de axones y dendritas, la expresión y actividad de proteínas funcionalmente importantes (canales iónicos y receptores de los neurotransmisores), está dado por la señalización de neurotrofinas a través de estos receptores (Deinhardt & Chao, 2014).

Los receptores tirosinas quinasa (Trk) es una familia de tres receptores que son activados por una o más de cuatro neurotrofinas. El nombre de la familia Trk se origina del oncogén que llevó a su descubrimiento (Barbacid et al., 1991). Este oncogén se aisló de carcinomas en ensayos de transferencia de genes y al clonarse, se descubrió que su estructura indicaba que se trataba de un receptor tirosina quinasa (Patapoutian A & Reichardt LF, 2001). Como resultado, este protooncogén se denominó quinasa relacionada con tropomiosina (trk) y ahora se conoce comúnmente como trkA (Huang & Reichardt, 2003). Inmediatamente, se aislaron dos miembros potenciales adicionales (los genes trkB y trkC, se identificaron por su alta homología con trkA), y se demostró que todos estos genes se expresan en el sistema nervioso indicando un posible papel en el desarrollo y la función neuronal (Huang & Reichardt, 2003; Patapoutian A & Reichardt LF, 2001).

La familia Trk de receptores tirosina quinasa se considera la segunda clase principal de receptores de neurotrofinas, que abarca tres proteínas transmembrana de tipo I de paso único. Siendo TrkA codificada por el gen NTRK1 localizado en el cromosoma

1q21-q22 (Weier et al., 1995), TrkB codificada por el gen NTRK2 localizado en el cromosoma 9q22.1 (Nakagawara et al., 1995) y TrkC codificado por el gen NTRK3 localizado en el cromosoma 15q25 (Valent et al., 1997)

Cada receptor cuenta con un dominio extracelular, una región transmembrana y una región intracelular con el dominio tirosina quinasa. El dominio extracelular fuertemente glicosilado, contiene un grupo rico en cisteína (C1) seguido de tres repeticiones leucinérgicas de 24 residuos (LRR1-3), otro grupo rico en cisteína (C2) y dos dominios similares a inmunoglobulinas (Ig1 e Ig2) (*Figura 4*) (Reichardt, 2006; S. Skaper, 2008). Los patrones LRR1-3 son específicos de las proteínas TRK y no se encuentran en otras tirosinas quinasa receptoras (Cocco et al., 2018). Son cinco residuos críticos en la región intracelular: tres dentro del bucle de activación del dominio quinasa, necesarios para la actividad quinasa completa, y dos a cada lado del dominio tirosina quinasa, cuya función es de sitio de acoplamiento dependientes de la fosforilación para adaptadores citoplasmáticos y enzimas (Cunningham & Greene, 1998).

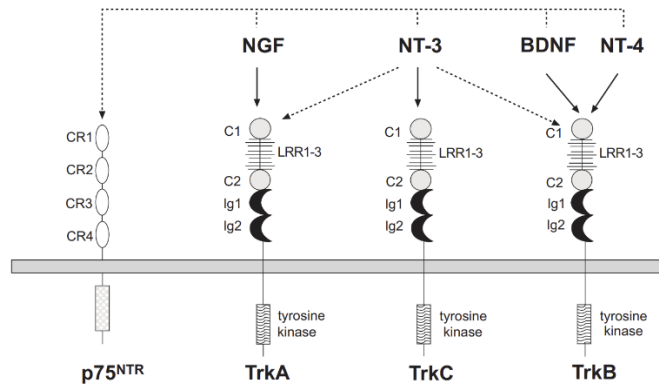


Figura 4. Esquema de estructura de los receptores TrkA, TrkB y TrkC respectivamente (S. D. Skaper, 2012).

El principal mecanismo de activación de los receptores Trk se da por la unión de neurotrofinas. Estos receptores, interaccionan con sus ligandos usando el segundo de sus dominios Ig (Ultsch et al., 1999; Wlesmann et al., 1999). La vía de señalización Trk inicia con la unión de la neurotrofinas a los receptores en la superficie celular provocando la dimerización del receptor. Una vez dimerizado el receptor autofosforila residuos de tirosina específicos en el bucle de activación del dominio quinasa (Y676, Y680 y Y681 en TrkA y los residuos correspondientes en TrkB y TrkC) (Cunningham & Greene, 1998). Esta fosforilación es necesaria para la activación del receptor Trk (Cocco et al., 2018) y conduce a la fosforilación de otros residuos de tirosina (Y496 y Y791 en TrkA), lo que permite el acoplamiento de adaptadores citoplasmáticos y enzimas, que a su vez impulsa una serie de vías de señalización descendentes (Deinhardt & Chao, 2014; Reichardt, 2006; S. Skaper, 2008).

De esta forma su rol dentro del desarrollo neuronal radica en su expresión en distintas áreas o subconjuntos de neuronas. Por ejemplo, en el sistema nervioso central (SNC) se encuentra altamente expresado el receptor TrkB, sin embargo, si nos vamos a poblaciones neuronales periféricas los receptores TrkA y TrkC están expresados. En la mayoría de las neuronas nociceptivas de la raíz dorsal y los ganglios del trigémino se encuentran expresados los receptores TrkA (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994), mientras que las neuronas que se diferencian en neuronas propioceptivas durante la neurogénesis expresan TrkC. Las neuronas que transmiten información sensorial visceral sobre el pH y la presión sanguínea expresan TrkB y dependen del BDNF para su desarrollo y diferenciación (Fariñas et al., 1996; Huang & Reichardt, 2001)

3. Mecanismos de activación y señalización intracelular.

La expresión interna de un receptor Trk confiere la capacidad de respuesta a las neurotrofinas; no obstante, el empalme diferencial de los ARNm TrkA, TrkB y TrkC origina isoformas de Trk con diferencias en sus dominios extracelulares que afecta la unión del ligando. De esta forma la presencia o ausencia de secuencias cortas de aminoácidos en los dominios yuxta membranales de cada receptor afecta la capacidad de algunas neurotrofinas para activar los receptores Trk (Barbacid, 1995; Huang & Reichardt, 2003).

El mecanismo de acción del factor neurotrófico NGF, inicia con la producción de este, el cual suele verse estimulada por estrés celular, lesiones, inflamación o señales de desarrollo. Luego el NGF es liberado al espacio extracelular por sus células de origen, cuya liberación puede estar regulada por diversos factores, como, citoquinas y otras moléculas de señalización (Aloe et al., 2015; S. Skaper, 2008). Una vez liberadas estas proteínas, el NGF se difunde a través del espacio extracelular para alcanzar las neuronas que tiene por objetivo. La unión al receptor TrkA, es el siguiente paso dentro de su mecanismo, aquí El NGF se une específicamente a su receptor de alta afinidad, el TrkA, cuya expresión predomina en la superficie de las neuronas diana. Estos receptores, interaccionan con sus ligandos usando el segundo de sus dominios Ig (Ultsch et al., 1999; Wlesmann et al., 1999). La unión del NGF a TrkA induce la dimerización del receptor (Reichardt, 2006). Una vez dimerizado el receptor autofosforila residuos de tirosina específicos en el bucle de activación del dominio quinasa (Y676, Y680 y Y681 en TrkA y los residuos correspondientes en TrkB y TrkC) (Cunningham & Greene, 1998). Esta fosforilación es necesaria para la activación del

receptor Trk (Cocco et al., 2018) y conduce a la fosforilación de otros residuos de tirosina (Y496 y Y791 en TrkA), lo que permite el acoplamiento de adaptadores citoplasmáticos y enzimas, que a su vez impulsa una serie de vías de señalización descendentes (Deinhardt & Chao, 2014; Reichardt, 2006; S. Skaper, 2008).

La expresión génica del BDNF se regula a nivel transcripcional. Diversos estímulos, como la actividad neuronal, los factores neurotróficos y los factores ambientales, pueden inducir la expresión del BDNF. La regulación dependiente de la actividad desempeña un papel importante, ya que el BDNF se regula al alza en respuesta a la actividad sináptica y la despolarización neuronal (S. Skaper, 2008; S. D. Skaper, 2018). Una vez sintetizado, el BDNF se empaqueta en vesículas y se transporta a los terminales presinápticos de las neuronas. Puede liberarse tanto de los sitios presinápticos como postsinápticos tras la actividad sináptica, incluyendo la despolarización y la afluencia de calcio.

De esta forma, la unión de NGF con TrkA induce la activación de la vía RAS/MAPK, que con lleva al aumento de la proliferación celular mediante la señalización ERK. La unión de BDNF, NT-3 o NT-4 al receptor TrkB induce la activación de la vía RAS-ERK, PI3K y PLC γ , que promueve la supervivencia neuronal. La unión de NT-3 a TrkC induce la activación preferente de la vía PI3K/AKT, evitando la apoptosis y aumentando la supervivencia celular (*Figura 5*) (Amatu et al., 2016, 2019; Bathina & Das, 2015; Nakagawara et al., 1995).

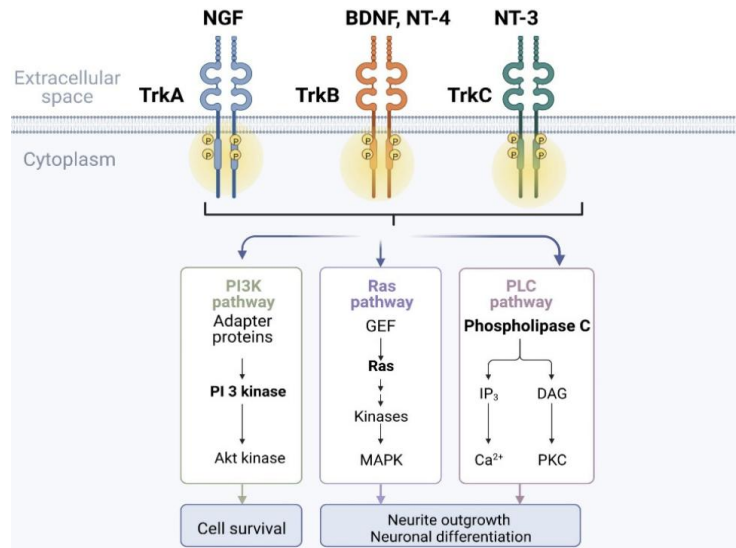


Figura 5. Esquema de unión ligando - receptor que conlleva al desencadenamiento de vías intracelulares (Gupta et al., 2022).

4. Matriz extracelular cerebral.

Las matrices extracelulares (MEC) son redes arquitectónicas tridimensionales multiplicadas y bien organizadas con funciones estructurales y funcionales relevantes en la organización y renovación de tejidos (Karamanos et al., 2021). Las ECM no solo proporcionan estructuras o andamios físicos para el acoplamiento de las células, sino que también regulan muchos procesos celulares gracias a su función como medio de comunicación, ejercen diversas funciones celulares cruciales a través de interacciones célula-célula y célula-matriz (Manou et al., 2019; A. D. Theocharis & Karamanos, 2019).

4.1 Composición y función de la matriz extracelular

Los elementos fundamentales de estas ultraestructuras incluyen los colágenos, los proteoglicanos (PG) y los glicosaminoglicanos (GAG), la elastina y fibras elásticas,

lamininas, la fibronectina, y otras proteínas y glicoproteínas como las proteínas matricelulares (A. D. Theocharis et al., 2014, 2016).

Los componentes de la matriz extracelular se encuentran organizados en una estructura 3D, el cual se divide en dos partes principales, la membrana basal y la matriz intersticial. A pesar de sus diferencias, poseen una estructura básica similar. Están formados por distintos tipos de colágenos el cual forma el armazón de ambas y las proteínas no estructurales se unen a este andamiaje, comunicándose con las células circundantes a través de integrinas (Bosman & Stamenkovic, 2003).

Colágeno tipo IV, lamininas y la fibronectina (confiere al tejido superpuesto cierta resistencia a la tracción) son unos de los principales elementos que constituyen la membrana basal esta última confiere al tejido suprayacente cierta resistencia a la tracción. En cuanto a las características, es mucho más densa y baja en porosidad comparada con la matriz intersticial (Lu et al., 2012). El perlecano, que es un proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) relevante en la membrana basal, se vincula con el FGF y el VEGF, ejerciendo influencia en los procesos angiogénicos. Así, la membrana basal está presente tanto en los vasos sanguíneos como en los tejidos epitelial y endotelial, constituyendo una matriz altamente estructurada donde el epitelio se apoya en la membrana basal para cumplir con su función prevista (Kim et al., 2011).

En los lugares donde se encuentra la membrana basal está la matriz intersticial, los principales componentes de esta matriz son los colágenos, la elastina y la fibronectina, que crean un gel amorfo tridimensional. Aunque la mayoría de las proteínas fibrosas de la matriz son colágenos, es la fibronectina la encargada de establecer la estructura de la misma. Cada tejido del cuerpo posee su propia distintiva matriz extracelular, que

varía tanto en su composición como en sus propiedades topográficas (Frantz et al., 2010).

En la actualidad, se admite que la matriz extracelular es un ambiente dinámico, que sufre modificaciones continuas en su composición y estructura. Esto sucede como reacción a las acciones de las células adyacentes. Por lo tanto, es crucial entender cómo la comunicación entre las células y la MEC aprenden a ajustarse mutuamente.

Las matrices extracelulares actúan como canales de comunicación entre las células de órganos y tejidos, facilitando la coordinación de diversas señales que se transmiten tanto desde el interior hacia el exterior como en la dirección contraria. (A. Theocharis et al., 2012). Como resultado, las matrices extracelulares dirigen la morfogénesis, el desarrollo y la homeostasis de los tejidos al regular la fisiología celular, el crecimiento, la supervivencia, la diferenciación y la adhesión de las células (Frantz et al., 2010b).

4.2 Composición específica de la matriz extracelular cerebral.

La estructura de la matriz extracelular varía según el tipo de tejido y juega un papel importante en las funciones específicas de cada uno (Frantz et al., 2010b). La matriz extracelular en el cerebro es distinta en estructura, ya que contiene menos proteínas estructurales fibrosas como colágeno o elastina, pero más proteoglicanos en comparación con otros tejidos (Alovskaya et al., 2007; Ruoslahti, 1996).

Además de su presencia en la estructura de la matriz extracelular, algunos proteoglicanos están arraigados a membranas celulares, que regulan la disponibilidad de factores de crecimiento para las células, como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGF), mediante la unión a las cadenas laterales de carbohidratos de los proteoglicanos, conocidos como glicosaminoglicanos (GAG) (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009).

Estos proteoglicanos tienen un impacto significativo en el comportamiento de las células neuronales, influenciando la adhesión celular y el crecimiento de las neuritas.

En el cerebro, los lecticanos, una subfamilia de proteoglicanos, son particularmente abundantes en la matriz extracelular (Alovskaya et al., 2007; Ruoslahti, 1996).

Cuatro miembros de la familia lectican han sido identificados en diversas variantes en el cerebro: brevican y neurocan, que son específicos de la matriz extracelular cerebral, y agregcan y versican, que están presentes en diversos tejidos (Rauch, 2007; Ruoslahti, 1996).

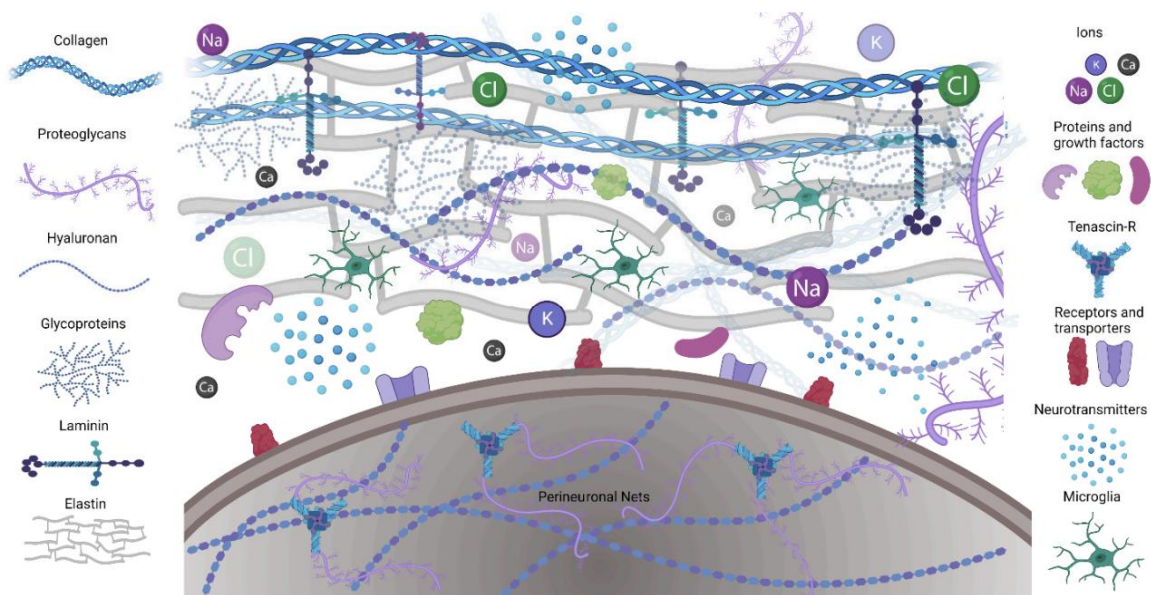


Figura 6. Esquema de la composición (proteínas, proteoglicanos, factores de crecimiento, etc) de la matriz extracelular cerebral (Soles et al., 2023).

La composición de la matriz extracelular también varía entre diferentes regiones del cerebro, lo que sugiere su influencia en la función neuronal. Además, la matriz extracelular en el cerebro está sujeta a una regulación constante *in vivo* por enzimas secretadas por las células, como las metaloproteinasas de matriz (MMP), que facilitan la plasticidad y la remodelación dinámica del cerebro. En términos de masa o volumen, la matriz extracelular en el cerebro representa un porcentaje relativamente bajo en comparación con otros tejidos, aproximadamente un 20% del peso total del cerebro (Chelyshev et al., 2022; Nicholson & Syková, 1998; Rauch, 2007).

(Hastings et al., 2019) nos afirma que dada que la matriz extracelular es una compleja red de macromoléculas que rodea las células y los tejidos, esta además de actuar como soporte estructural y mecánico, también es fundamental para la modulación de la actividad celular, ya sea por la activación o supresión de vías de señalización intracelular. Dada la composición única de la matriz extracelular en el cerebro, estudios utilizando tejido cerebral descelularizado son más específicos para la diferenciación *in vitro* de células madre embrionarias y tejidos neuronales humanos (Hoshiba et al., 2016).

5. Matriz extracelular cerebral, como andamio en ingeniería tisular.

5.1 Papel de la matriz extracelular cerebral en la señalización celular.

Las proteínas de la matriz extracelular desempeñan roles esenciales y complejos en la señalización de los receptores en la superficie celular. En primer lugar, la matriz extracelular funciona como un reservorio para factores de crecimiento. Estos factores,

al estar unidos a la matriz extracelular, pueden liberarse localmente y enlazarse con sus receptores específicos. Muchas proteínas de la matriz extracelular poseen sitios de unión tanto para la adhesión celular como para los factores de crecimiento, facilitando la concentración de estos factores cerca de sus receptores en la superficie celular y en los puntos de adhesión celular. Esta localización de los factores de crecimiento, y su correspondiente señalización mediada por la matriz extracelular, probablemente contribuye a la formación de gradientes de morfógenos solubles y difusibles, los cuales son cruciales para la creación de patrones durante los procesos de desarrollo (Kirkpatrick et al., 2004; Kjellén & Lindahl, 1991; Kresse & Schnherr, 2001; Kreuger et al., 2004). De esta forma, la unión entre la matriz extracelular y factores de crecimiento constantemente implica dominios específicos de las proteínas de la matriz extracelular que dan lugar a la modulación de las actividades de señalización. Numerosos estudios han utilizado la matriz extracelular en la modulación de la señalización celular. Baiguera et al., (2014) confirmó su biocompatibilidad y demostró que la ECM derivada del cerebro de rata posee potencial de diferenciación cuando se administra en células mesenquimales estromales alogénicas. Por su parte, Crapo et al., (2014) investigó *in vitro* el efecto de la ECM en forma soluble, derivada del sistema nervioso central (SNC), específicamente del cerebro, y encontró que a una concentración de 100 mg/mL puede inducir la diferenciación de células madre neuronales en neuronas.

5.2 Matriz extracelular cerebral como moduladora de procesos celulares cerebrales.

Los factores de crecimiento neurítico son agentes que estimulan el crecimiento de las fibras neuronales y frecuentemente participan tanto en el mantenimiento como en la diferenciación neuronal.

Son muchos los centros de investigación que han demostrado que la ECM y sus componentes (entre estos los denominados factores de crecimiento) promueven el crecimiento neuronal (Sanes, 1989). Se ha descrito en estudios (Fujii et al., 1982; Vlodavsky et al., 1982) que la matriz extracelular de distintas fuentes promueve el crecimiento de neuritas en células PC12 en ausencia de NGF. Crapo et al., (2012) demostraron que los andamios de matriz extracelular del sistema nervioso central retienen proteínas neuronales y factores de crecimiento, los cuales, al ser evaluados *in vitro* en células PC-12, demostraron citocompatibilidad y promovieron la migración, proliferación y diferenciación celular. Por su parte, Reginensi et al., (2020) utilizaron ECM descelularizada de tres regiones del cerebro porcino en forma soluble y observaron que su administración en células PC-12 inducía diferenciación, evidenciando variaciones en la maduración neuronal según la región cerebral de origen.

6. Bloqueo de señalización neurotrófica.

Los receptores son proteínas especializadas que permiten el funcionamiento de las diferentes células del organismo, son los mensajeros químicos de hormonas, neurotransmisores u otros mediadores. Dicho anteriormente estos cuentan con sitios

de unión que reciben el mensaje, y la interacción en estos sitios provoca modificaciones en el receptor, lo que resulta en la transmisión del mensaje para desencadenar una respuesta celular (Hinson et al., 2010)

Por otra parte, los compuestos que se unen al receptor se llaman ligandos (agonistas si al unirse a los receptores generan el efecto deseado y antagonistas si la molécula se une al receptor, pero no lo activa, impidiendo así que los ligandos naturales se unan y activen el receptor)(Berg & Clarke, 2018). Este método es común en la investigación y tratamiento de diversas enfermedades, ya que muchos procesos celulares dependen de la activación de estos receptores para funcionar correctamente.

6.1 Métodos de bloqueo de receptores de factores neurotróficos.

Los factores neurotróficos son proteínas que juegan un papel crucial en el crecimiento, supervivencia y diferenciación de las neuronas (Huang & Reichardt, 2001). El bloqueo de estos factores se realiza mediante estrategias, como anticuerpos específicos unidos a los factores neurotróficos, evitando su interacción con los receptores celulares. Otra técnica incluye el uso de moléculas pequeñas que inhiben la señalización intracelular desencadenada por estos factores, deteniendo su efecto en las células objetivo.

Entre los inhibidores dirigidos a los receptores Trk se encuentran GW441756 (TrkA), ANA-12 (TrkB), AZD-1332 (TrkA, TrkB y TrkC) y GNF-5837 (TrkA, TrkB y TrkC). Excepto ANA-12, que actúa como un antagonista no competitivo, los demás inhibidores son antagonistas competitivos que bloquean la actividad de Trk al competir con ATP por su sitio de unión (Albaugh et al., 2012; Cazorla et al., 2011; Thress et al., 2009; Wood et al., 2004). Este enfoque se utiliza para estudiar los roles de los factores

neurotróficos en diversas enfermedades neurodegenerativas y para el desarrollo de nuevas terapias (S. Y. Han, 2021).

6.2 Efectos del bloqueo en la diferenciación celular.

El bloqueo de receptores o factores neurotróficos puede interferir en este proceso, alterando la capacidad de las células para seguir el camino de diferenciación normal. Dependiendo del tipo de célula y del receptor o factor bloqueado, los efectos pueden incluir la inhibición completa de la diferenciación, la desviación hacia un tipo celular diferente, o incluso la inducción de la muerte celular (S. Y. Han, 2021; Yan et al., 2019).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

1. Obtención y Caracterización de matriz extracelular de cerebro porcino

1.1 Obtención de la matriz extracelular descelularizada de cerebro porcino

El tejido cerebral de origen porcino fue diseccionado y se extrajo corteza, cerebelo y tronco. Estos tejidos extraídos fueron sometidos a una descelularización, cuyo proceso involucra el uso de detergentes y otros agentes químicos o físicos para eliminar las células, reduciendo el daño en la estructura del mismo (Reginensi et al., 2020b). Los tejidos descelularizados, fueron liofilizados y almacenados a -20°C hasta su uso.

1.2 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación del ADN se usó el reactivo de ADNds Quant-iT™ PicoGreen™ (Invitrogen, P11496). Siguiendo las especificaciones del fabricante, se inició diluyendo 5 μL de ADN experimental en TE hasta un volumen final de 100 μl . Se agregaron 100 μL de solución de trabajo de ADNds Quant-iT™ PicoGreen™ a cada muestra, y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. La fluorescencia de las muestras y estándares se registraron a las longitudes de onda de excitación y emisión de 480nm y 520nm, respectivamente (*Figura 7*).

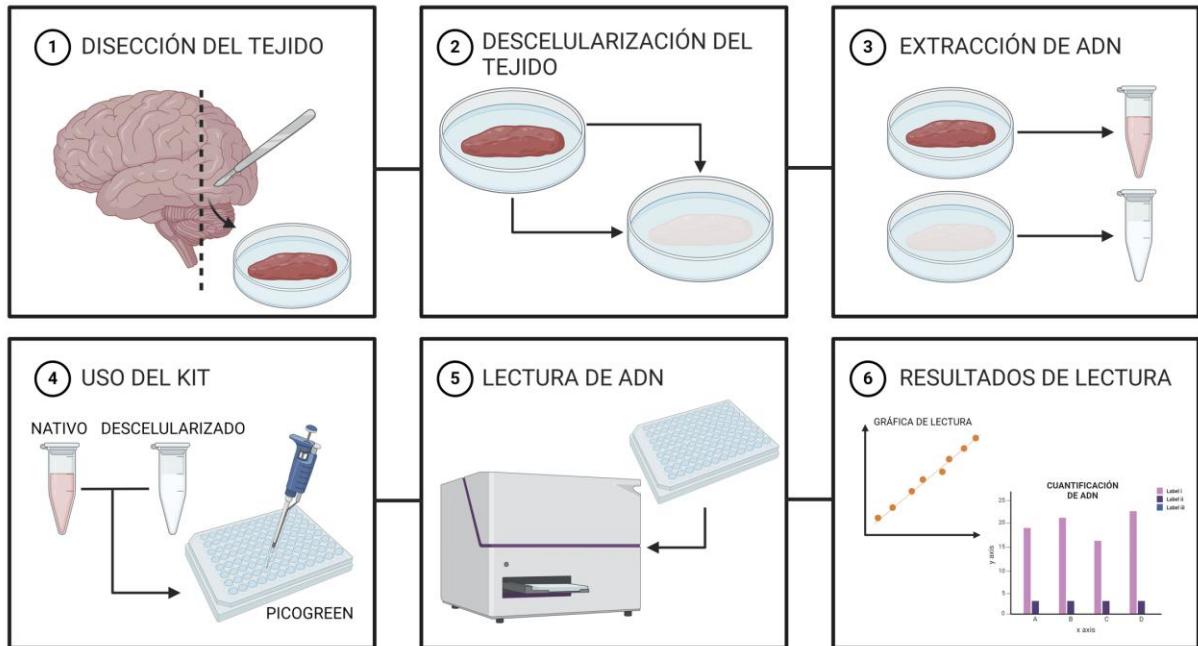


Figura 7. Diagrama de cuantificación de ADN utilizando muestras de tejido nativo y descelularizado.

1.3 Cuantificación de proteínas, azúcares y lípidos

Como parte de la caracterización de la matriz extracelular descelularizada de cerebro porcino, se procedió a realizar análisis de los niveles de proteína, azúcares y lípidos (*Figura 8*).

1.3.1 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermofisher, 23227) para cuantificar proteínas de los tejidos descelularizados y nativos. Primero, se pesó 0,5 gramos de cada una de las tres secciones (corteza, cerebelo y tronco) de tejidos nativos y descelularizados, se sonicaron por un periodo de 10 minutos en tampón de lisis (TRIS-cloruro de hidrógeno 50mM, pH 7,4, que contiene cloruro de sodio 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 al 1,2%, desoxicolato de sodio al 0,5% y SDS al 0,1%),

luego se incubó a 4°C por 12 horas. Finalmente, se continuó con las instrucciones del fabricante para la cuantificación de proteínas. La placa se leyó a 580 nm en un lector/espectrofotómetro de placas de 96 pocillos (ACCURIS Modelo # MR9600).

1.3.2 Cuantificación de Lípidos

Para la cuantificación de lípidos, se utilizó el kit de extracción de lípidos libre de cloroformo (Abcam, ab211044). Las muestras descelularizadas y nativas utilizadas fueron las tres secciones (corteza, cerebelo y tronco). Se pesaron 10 mg de cada tejido para la extracción y se añadieron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL donde luego se le añadió 500 µL del tampón de extracción de lípidos del fabricante. Inmediatamente se agitó en vortex durante 2 minutos. Luego, la mezcla se incubó durante 20 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente (RT). Se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos y se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, transfiriéndolo a un tubo limpio.

Para la cuantificación de lípidos se utilizó el kit de cuantificación de lípidos (Cell Biolabs, STA-613). Se incubaron las muestras y los estándares, en horno a 90°C por 30 minutos para evaporar los solventes orgánicos. Una vez retiradas las muestras del horno se transfieren a 4°C por 5 minutos y se le agregan 150 µl de ácido sulfúrico concentrado. Luego se transfieren 100 µl de cada muestra y estándares a un plato de 96 pocillos, y se añaden 100 µl del Vanillin Reagent. Por último, se incubó el plato de 96 pocillos con las muestras y estándares, a 37°C y se procedió a la lectura a 540nm en un lector de placas (ACCURIS Modelo # MR9600).

1.3.3 Cuantificación de azúcares

Para el análisis de proteoglicanos y glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG) se utilizó el kit *-Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan (sGAG)-*(Biocolor, RBCB1000) siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepararon los estándares en diferentes concentraciones de menor a mayor porcentaje. Luego se pesaron 30 mg de cada tejido nativo y descelularizado (corteza, cerebelo y tronco) y se diluyó en 1 mL de agua destilada. Posteriormente, se le agregó el reactivo de colorante Blyscan y el reactivo de disociación del fabricante. Finalmente se añadieron 200 μ L de cada muestra y estándar a una placa de 96 pocillos para su lectura en el espectrofotómetro.

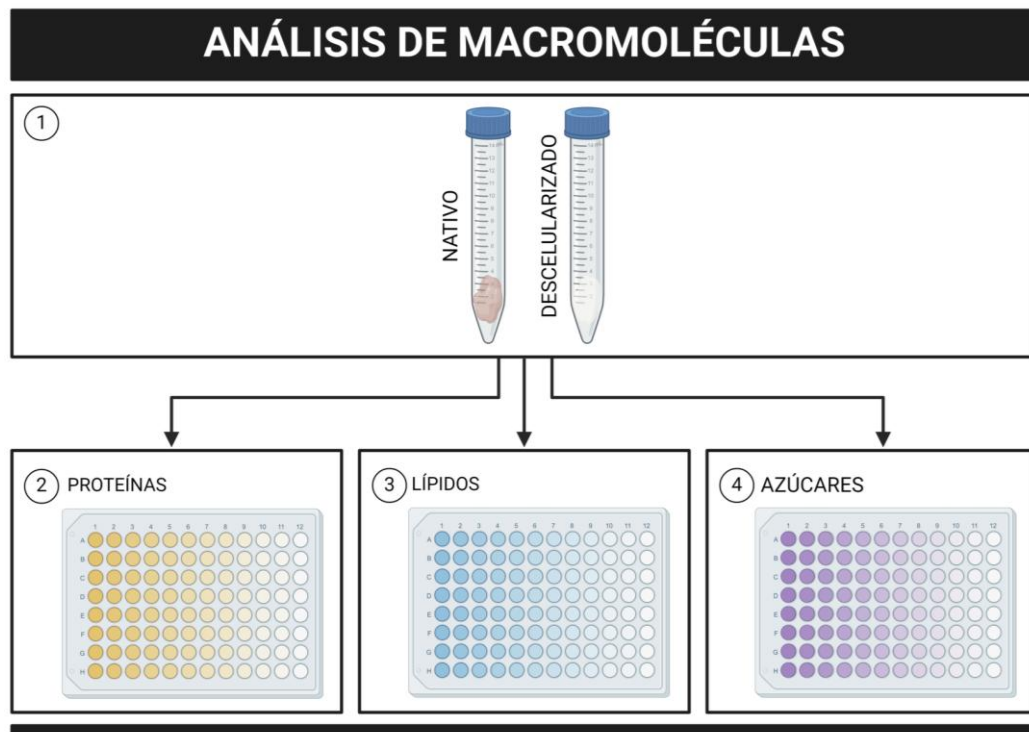


Figura 8. Diagrama de análisis y cuantificación de proteínas, lípidos y azúcares en muestras de tejido nativo y descelularizado liofilizado de cerebro porcino.

1.4 Histología

Para la histología se trabajaron los tejidos de corteza, cerebelo y tronco, todas en su estado nativo y descelularizado (*Figura 9*). Las mismas fueron fijadas con formalina al 10% (AGONLABS, 1006) por un periodo de 24 horas a RT (Reginensi et al., 2020b). Una vez lavados los tejidos, se deshidrataron en series crecientes de etanol, luego las muestras fueron sometidas a un proceso de inclusión en parafina durante toda la noche, obteniendo así los bloques de parafina que contienen la muestras a teñir (Mungenast et al., 2023).

Por último, se seccionaron los bloques de tejido en parafina con un micrótomo, obteniendo muestras de 4 μm , las cuales fueron montadas en portaobjetos para disolver la parafina a 80°C. Antes de la tinción con Hemotoxilina y Eosina (H&E) (VWR, 95057-844), Coomassie Blue (Bio-Rad, 1610786), Luxol Fast Blue (Abcam, ab150675), PAS (Periodic acid-Schiff) (Merck, 1.090.330.500) y Alcian Blue (Wako, 013-13801) las muestras se rehidrataron con una serie decreciente de etanol y agua destilada (Mungenast et al., 2023).

HISTOLOGÍA DE TEJIDOS

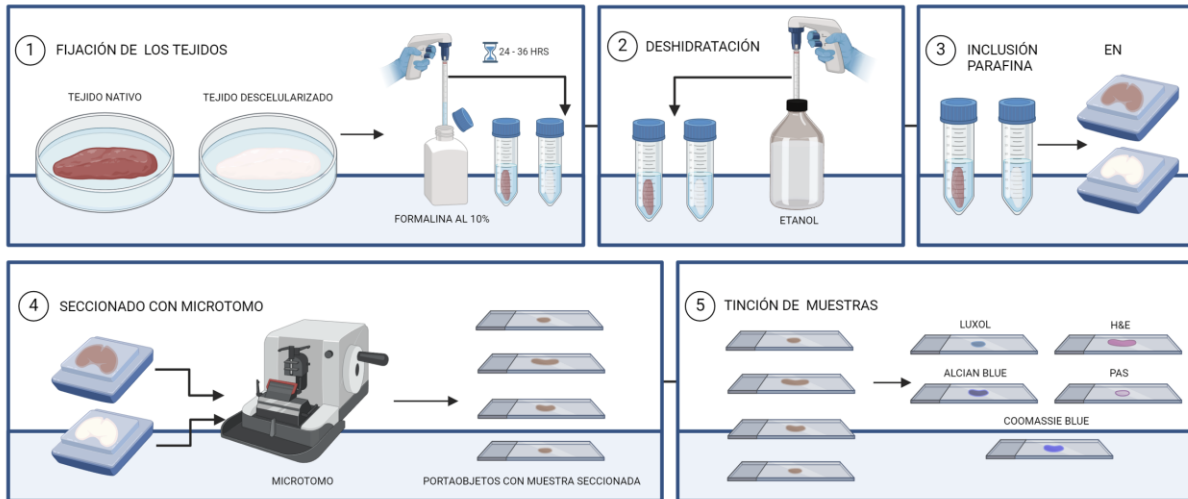


Figura 9. Diagrama de tinción de tejidos nativos y descelularizados de corteza, cerebelo y tronco, con H&E, PAS, Luxol blue, Coomassie blue y Alcian blue respectivamente.

1.5 Prueba de esterilidad de tejidos

La prueba microbiana se realizó con el fin de determinar si el tejido cerebral porcino descelularizado liofilizado no posee contaminación bacteriana o fúngica. Se prepararon dos tipos de placas: placas petri de caldo Luria-Bertani (LB), para el análisis bacteriano y placas petri con agar papa dextrosa, para el análisis micológico.

Para el análisis bacteriano, se pesó 5 mg de cada muestra y se diluyó en 0.5 mL de medio de cultivo estéril. Se dispersaron 20 μ L de cada muestra utilizando un asa de Drigalsky en las placas de caldo LB y se incubaron durante un periodo de 2 días a una temperatura de 37°C para evaluar el crecimiento bacteriano (*Figura 10*). Para el análisis micológico se realizó el mismo procedimiento con una incubación de 5 días a una temperatura de (26-30) °C para evaluar el crecimiento fúngico (*Figura 11*).

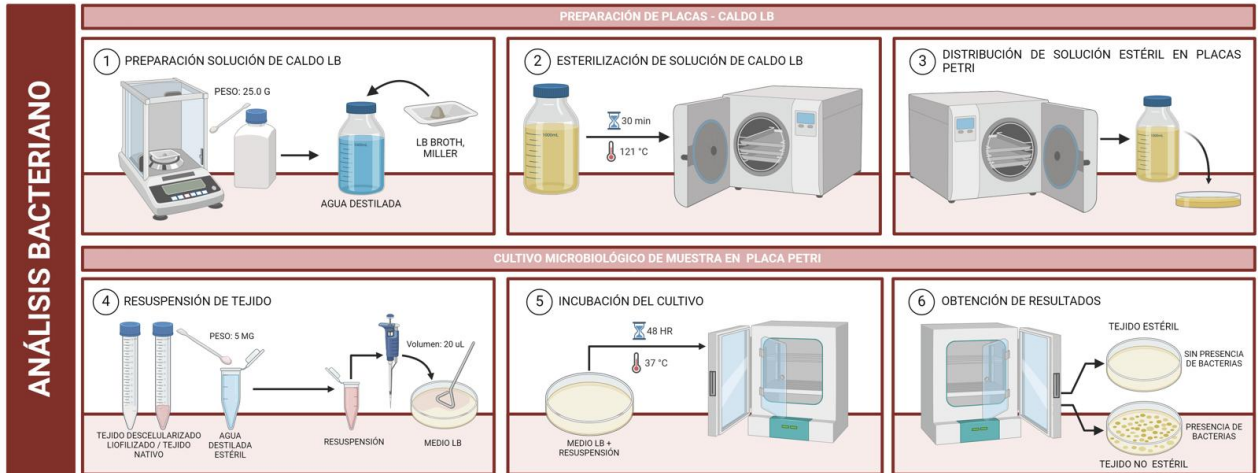


Figura 10. Diagrama de prueba de esterilidad bacteriana de muestras de tejido descelularizado y nativo, de cerebelo, corteza y tronco extraídas de cerebro porcino.

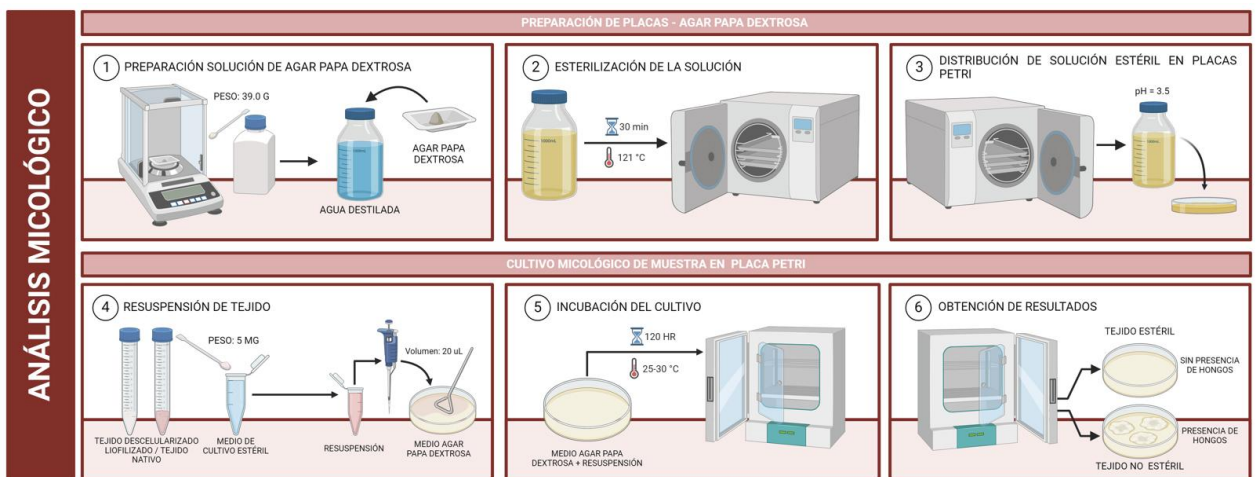


Figura 11. Diagrama de prueba de esterilidad micológica de muestras de tejido descelularizado y nativo, de cerebelo, corteza y tronco extraídas de cerebro porcino.

2. Establecimiento de cultivo de línea celular PC-12

Para el establecimiento de diferenciación similar a neurona (neuron-like), se empleó el linaje celular PC-12 (CRL-1721) de American Type Culture Collection (ATCC). En primera instancia las células se cultivaron en suspensión en un matraz T-75, siguiendo el protocolo *in vitro* establecido por ATCC. El cultivo se mantuvo en medio RPMI-1640

(Sigma Aldrich R0883-1L) suplementado con suero de caballo (HS) al 15%, suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibiótico penicilina/estreptomicina al 1%, en ambiente humificado a 37°C con CO₂ al 5%, hasta una confluencia del 80% al 90% (*Figura 12, pasos 1 al 5*) (Collection, 2022; Wiatrak et al., 2020b).

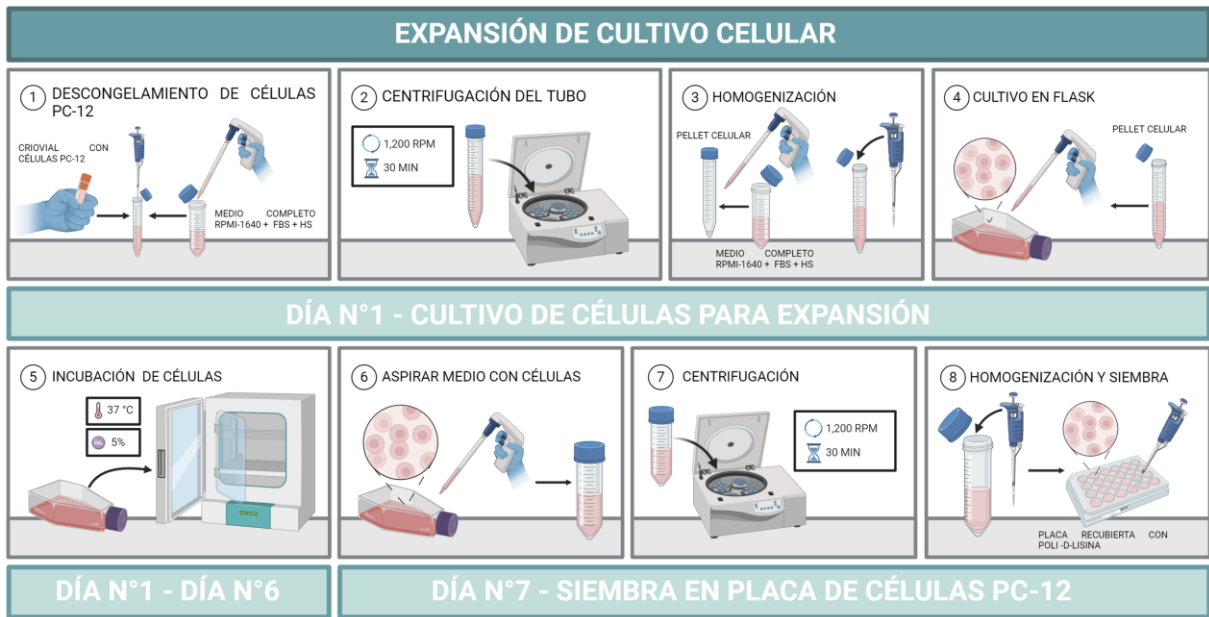


Figura 12. Diagrama de expansión y Cultivo celular. (1-5) Descongelamiento, expansión y cultivo de células PC-12 para experimentación. (6-8) Siembra en placa de células PC-12.

2.1 Preparación de placa

Para adherir las células a la placa fue necesario recubrir el sustrato, para esto se realizó una dilución de Poli-D-Lisina (PDL) (Sigma Aldrich, P7280-5MG) a una concentración final de (0.5 mg/mL) en fosfato buffer salino (PBS), la solución se depositó en cada pocillo y se incubó toda la noche a 4°C. Por último, se incubó la placa a 37 °C durante 2 horas, y se le realizaron tres lavados con PBS.

3. Diferenciación a morfología neuronal de PC12

Para la diferenciación: se sembró en una placa de 24 pocillos a una densidad de 3×10^4 células/mL por pocillo (*Figura 12, pasos 6 al 8*), estas se disgregaron gradualmente utilizando jeringas con agujas de diámetros 21G, 20G y 18G. La placa se dejó incubando toda la noche para permitir la adherencia de las células y comenzar con el proceso de estimulación, haciendo cada estimulación de forma independiente.

3.1 Diferenciación con factor neurotrófico NGF

Una vez adheridas las células a la placa, se utilizó el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Alomone labs N-245) para inducir la diferenciación a morfología neuronal en las células PC-12. Se retiró el medio preexistente en los pocillos, y se realizaron tres lavados con medio completo y se sustituyeron a medio DMEM alto en glucosa, suplementado con bajo contenido en suero (1% de HS y 1% de FBS). Inmediatamente, se le administró el factor neurotrófico NGF a una concentración final de 50 ng/mL, por un periodo de 7 días. La administración de NGF se efectuó cada 48 horas (*Figura 13*) (Barbakadze et al., 2023; Karliner & Merry, 2023a).

3.2 Diferenciación con factor neurotrófico BDNF

De igual forma se utilizó el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Alomone labs, B-250) para inducir la diferenciación a morfología neuronal. Las células PC-12 en adhesión se cultivaron durante un periodo de 7 días en DMEM alto en glucosa, suplementado con 1% de HS y 1% de FBS. A las mismas se le suministró cada 48 horas BDNF a una concentración de 100 – 200 ng/mL (*Figura 13*) (Jiang et al., 2018).

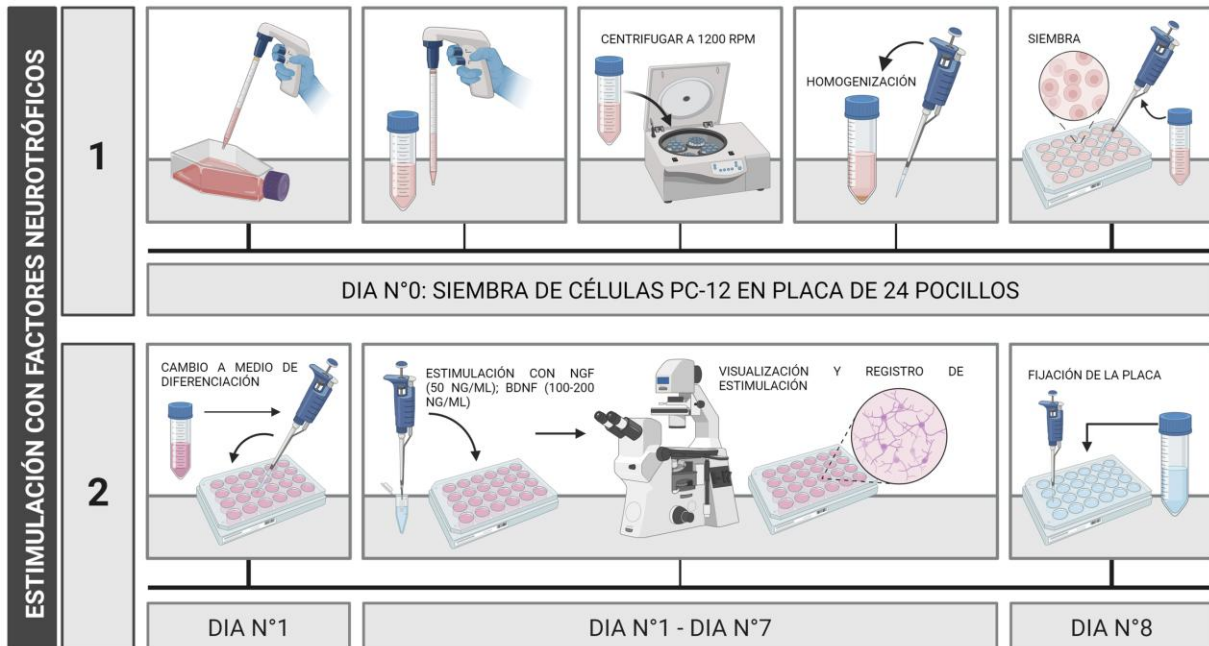


Figura 13. Diagrama de estimulación de células PC-12 con el factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

3.3 Diferenciación con matriz extracelular descelularizada

Para la diferenciación con matriz extracelular descelularizada (*Figura 14*), se utilizó cerebro porcino de las áreas: tronco, corteza y cerebelo, donde el material diseccionado, descelularizado y liofilizado se usó de manera individual como factor de diferenciación añadido al medio (DMEM alto en glucosa, suplementado con 1% de HS y 1% de FBS), a una concentración 1×10^5 ng/mL, durante 7 días y estimulados cada 48 horas (Reginensi et al., 2020b).

Nota: Los procesos de diferenciación fueron registrados fotográficamente, cada 48 horas, utilizando un microscopio invertido.

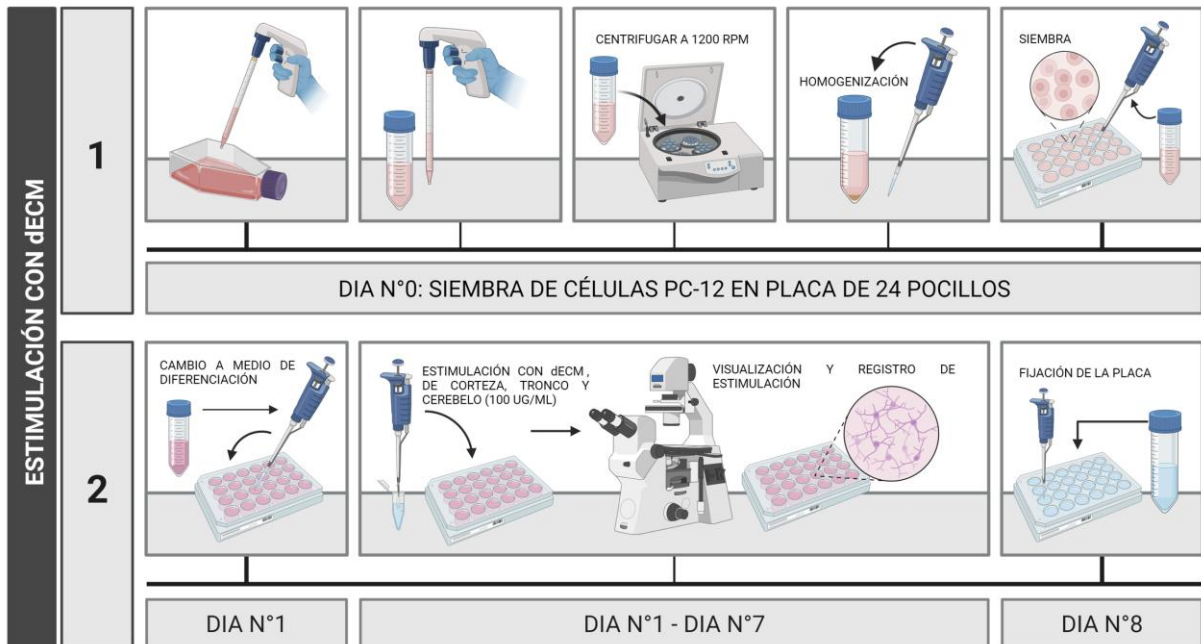


Figura 14. Diagrama de estimulación de células PC-12 con matriz extracelular descelularizada (corteza, cerebelo y tronco).

4. Caracterización de células diferenciadas por factores neurotróficos

4.1 Caracterización por inmunofluorescencia

Para la caracterización se procedió a evaluar la expresión de marcadores específicos mediante inmunofluorescencia. (Figura 15). Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos: las células se incubaron en paraformaldehído al 4% durante 10 min a 37°C, se descartó y se lavó con PBS tres veces; permeabilización, las células se incubaron en Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 10 min, se descartó la solución y se lavaron tres veces con PBS; bloqueo, para ello se adicionó una solución de BSA al 1%, glicina en PBST (PBS + 0.1% de Tween 20) y se incuban durante 30 minutos; inmunotinción, se le agregó la concentración de anticuerpo primario Alexa iFluor 594 (ABCAM, ab176757) diluido en BSA al 1% en PBST (1:500) y se incubaron durante toda la

noche a 4°C, se descartó la solución y se lavaron las células tres veces con PBS. Como próximo paso se realizó un contraste con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), el cual teñirá el núcleo, para esto se incubaron las células con *-DAPI ready made solution with Antifade-* (Sigma Aldrich, MBD0020-10ML) durante 5 minutos, en un ambiente sin luz. Por último, se lavaron las células con PBS y se realizó el montaje con 7µL de *-Fluoromount-G Slide Mounting Medium-* (Electron Microscopy Science, 17984-25), y se selló el cubreobjetos con esmalte de uñas (Abcam, 2023; Im et al., 2019).

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

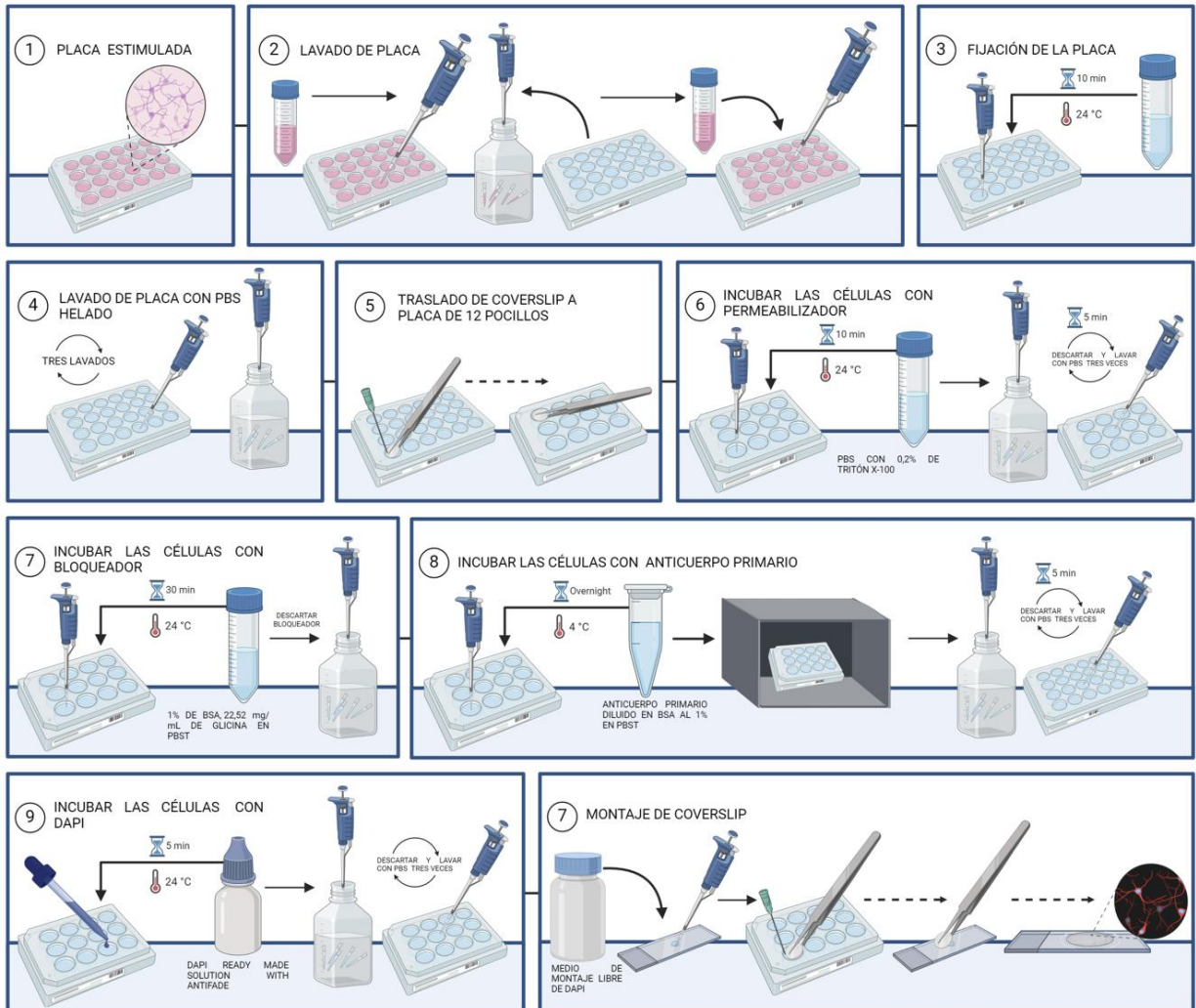


Figura 15. Diagrama de técnica de inmunofluorescencia, donde se contempla la fijación, permeabilización, bloqueo, incubación del anticuerpo y montaje del cubreobjetos con células.

5. Bloqueo de receptores específicos de factores neurotróficos

5.1 Inhibición selectiva del receptor tirosina quinasa A (TrkA) - GW441756

Para la inhibición del receptor TrkA las células PC-12 se sembraron en una placa de 24 pocillos recubierta con PDL a una densidad total de 30,000 células por pocillo y se

dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente se le reemplazó el medio completo (RPMI-1640 con 15% de HS, 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina) por medio DMEM alto en glucosa libre de suero, junto con el inhibidor de TrkA (GW441756) a una concentración de 20 μ M, se incubó a 37°C por 60 minutos (Figura 16). Transcurrido el tiempo, se procedió a estimular cada pocillo con NGF a 50ng/mL. Finalmente, se mantuvo un registro fotográfico hasta las 72 horas (Bapat et al., 2016a; Rogdakis et al., 2022; Yilmaz et al., 2022).

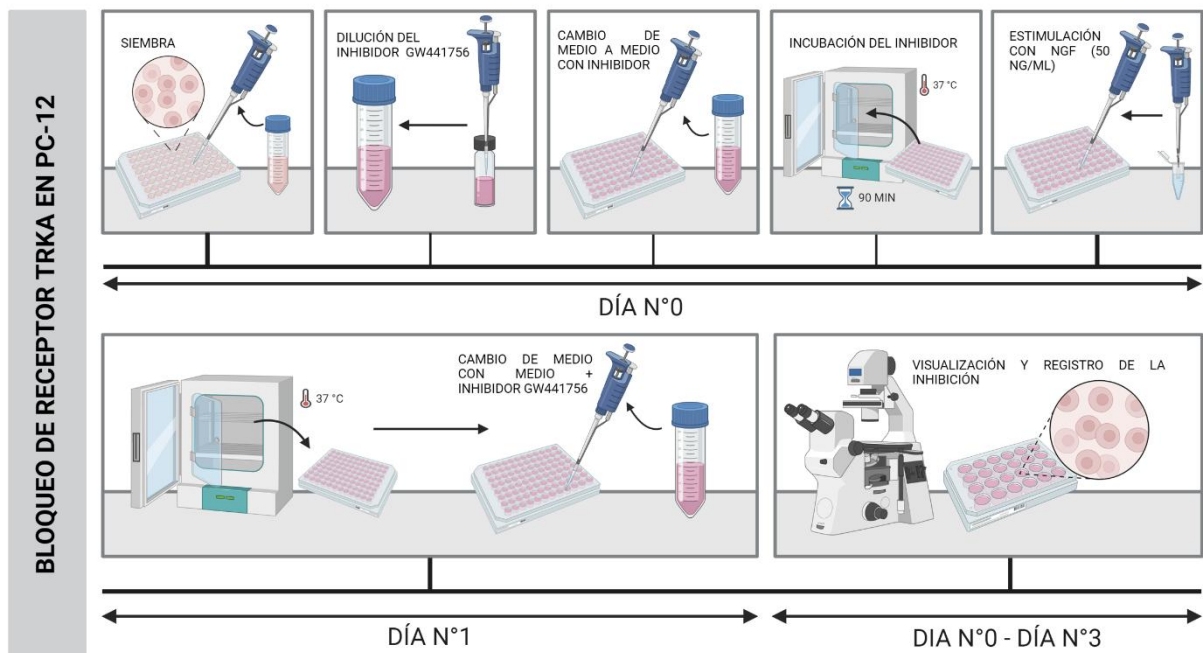


Figura 16. Diagrama de bloqueo de receptor trkA con inhibidor GW441756 a una concentración final de 20 μ M, por un lapso de 72 horas.

5.2 Inhibición selectiva del receptor BDNF tirosina quinasa B (TrkB) – ANA-12.

Para la inhibición del receptor TrkB se sembraron las células PC-12 en una placa de 24 pocillos recubierta con PDL en medio RPMI-1640 con 15 % de HS, 10 % de FBS y penicilina/estreptomicina al 1 %, se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5. El medio se

reemplazó después de 24 horas con 500 μ L medio DMEM libre de suero más el inhibidor ANA-12 a una concentración de 5 μ M, donde se dejó incubando a 37°C por un periodo de 60 minutos (*Figura 17*). Una vez pasado el tiempo de incubación se procede a estimular con BDNF (100 ng/mL). Finalmente, se mantuvo un registro fotográfico hasta las 72 horas (Li et al., 2019; Paris et al., 2020).

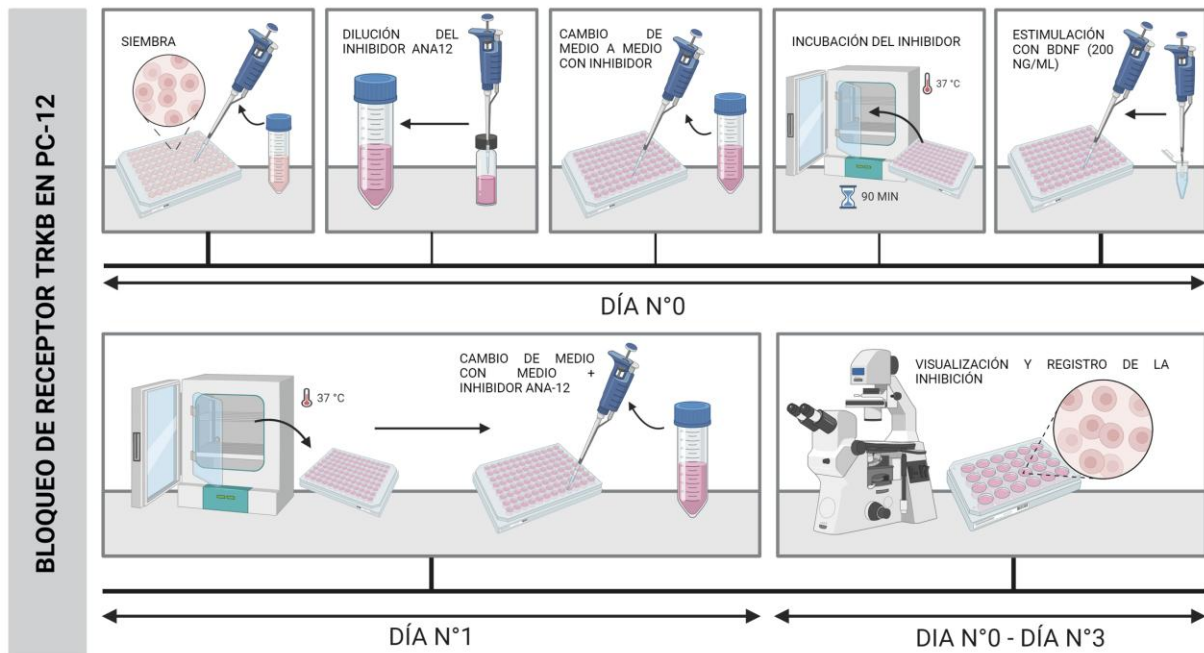


Figura 17. Diagrama de bloqueo de receptor trkB con inhibidor ANA-12 a una concentración final de 05 μ M, por un lapso de 72 horas.

6. Cuantificación de extensiones neuríticas mediante herramientas computacionales

El proceso de cuantificación implica el análisis y la medición de las proyecciones celulares durante una estimulación, como las neuritas. La cuantificación de extensiones neuríticas comienza con la adquisición de las imágenes microscópicas de las células PC-12, una vez obtenidas se procesaron para mejorar la calidad de la

imagen. A continuación, se empleó el software ImageJ / Fiji para medir parámetros como el número de células diferenciadas y la longitud de las estructuras neuríticas. Los criterios utilizados para determinar el porcentaje de diferenciación celular incluyen: (1) la pérdida de la morfología redonda característica de las células PC-12, evidenciada por el desarrollo de un cono de crecimiento neuronal, y (2) la presencia de neuritas. En total, se analizaron 807 células ($n = 807$) entre los grupos estimulados e inhibidos. Para la medición de la longitud neurítica, se consideró la distancia desde la base del cono de crecimiento neuronal hasta el extremo de la neurita principal, sin incluir ramificaciones o bifurcaciones. Además, el número promedio de células cuantificadas por campo fue de 5 ($n = 5$) (Harrill & Mundy, 2011).

CAPÍTULO III

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

1. Obtención y caracterización de matriz extracelular de cerebro porcino

Dado que la matriz extracelular descclularizada se utilizó como factor soluble, fue necesario obtenerla y caracterizarla antes de la estimulación en células PC-12.

1.1 Disección y descclularización del cerebro porcino

Tras la disección del cerebro porcino, cada sección se descclularizó por separado. Inicialmente, el tejido nativo presentaba una tonalidad rosácea (*Figura 18*). Luego del proceso, la tonalidad cambió gradualmente a blanco, y se observó una reducción en volumen y tamaño debido a las fuerzas mecánicas y químicas aplicadas durante los lavados. Las muestras de ECM descclularizado fueron congeladas inmediatamente a -80°C y liofilizadas para su posterior análisis molecular e histológico.

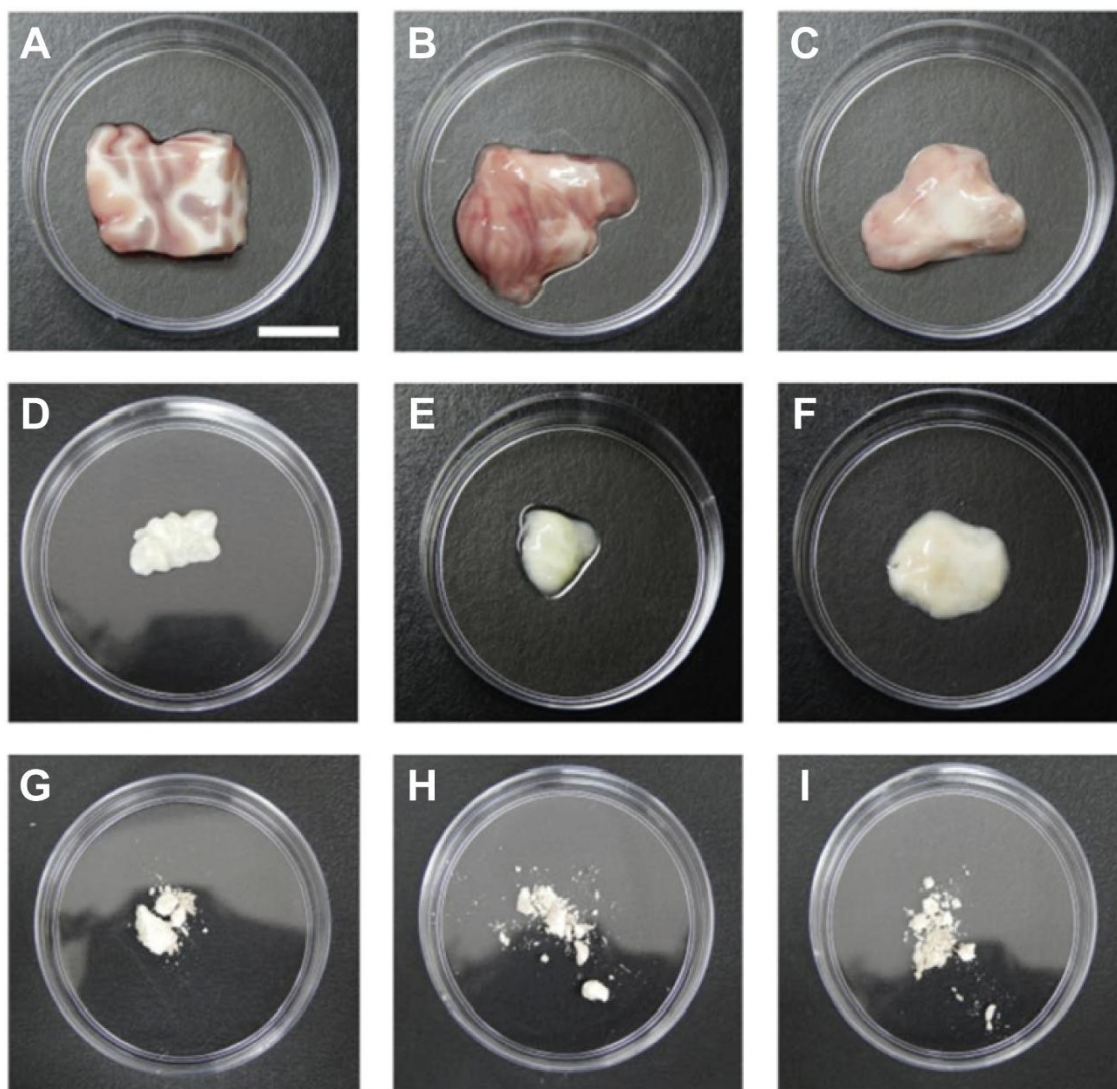


Figura 18. Disección y descelularización de cerebro porcino. (A) Corteza Nativa, (B) Cerebelo Nativo, (C) Tronco Nativo, (D) Corteza Descelularizada, (E) Cerebelo Descelularizado, (F) Tronco Descelularizado, (G) Corteza Descelularizada Liofilizada, (H) Cerebelo Descelularizado Liofilizado, (I) Tronco Descelularizado Liofilizado. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 200 μm .

1.2 Evaluación de material genético en dECM

Para evaluar la presencia de material genético y la efectividad del proceso, se realizó una caracterización cualitativa mediante la histología de las tres regiones cerebrales (cerebelo, corteza y tronco) utilizando tinción H&E, que tiñe los núcleos celulares de

azul y el citoplasma de rosa. Se observó que los tejidos nativos (*Figura 20, A-C*) presentaban más núcleos que los descelularizados (*Figura 20, D-F*), lo que confirma la remoción del contenido nuclear durante el proceso.

En paralelo, se realizó una electroforesis (*Figura 19*) a los dos grupos de tejidos. Todas las muestras nativas, presentaron ADN de alto peso molecular, mientras que las muestras descelularizadas mostraron un contenido de ADN prácticamente nulo, indicando una remoción exitosa del ADN luego de la descelularización de los tejidos de cada área.

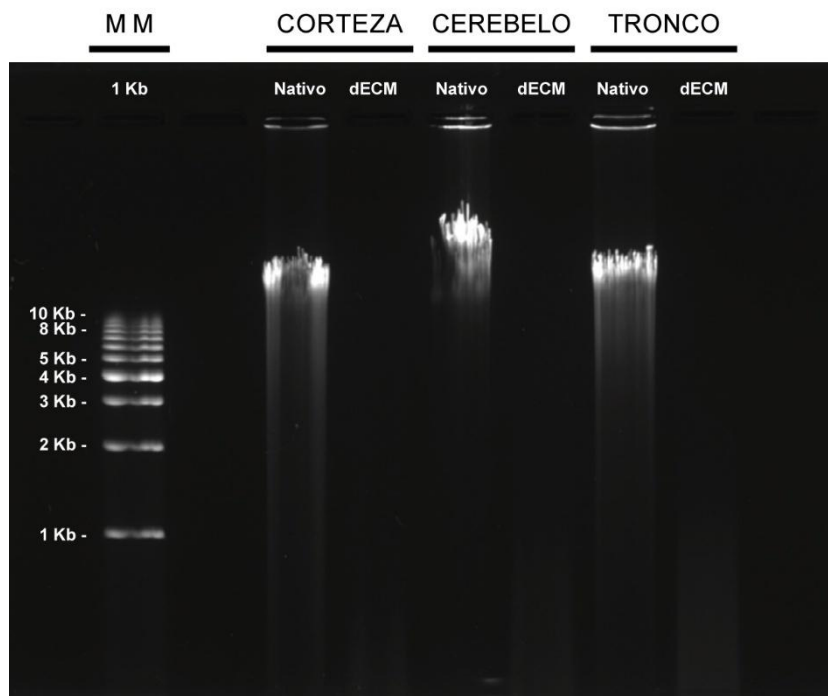


Figura 19. Electroforesis de ADN de tejido nativo y descelularizado de las áreas: corteza, cerebelo y tronco. MM hace referencia al marcador molecular.

Además, se cuantificó la concentración de ADN mediante el ensayo ADNds Quant-iT™ PicoGreen™. Los resultados mostraron que el ADN en los tejidos descelularizados de las tres regiones era casi nulo en comparación con los tejidos

nativos (*Figura 20G*), lo que demuestra la eficacia del proceso. La concentración de ADN en la corteza se redujo de 18.201 $\mu\text{g/mL}$ a 98 $\mu\text{g/mL}$, en el cerebelo de 17.574 $\mu\text{g/mL}$ a 64.33 $\mu\text{g/mL}$, y en el tronco de 16.757 $\mu\text{g/mL}$ a 82 $\mu\text{g/mL}$, indicando un cambio significativo en todas las regiones y una remoción del material genético del ($\pm 99.46\%$), ($\pm 99.63\%$) y ($\pm 99.51\%$), respectivamente.

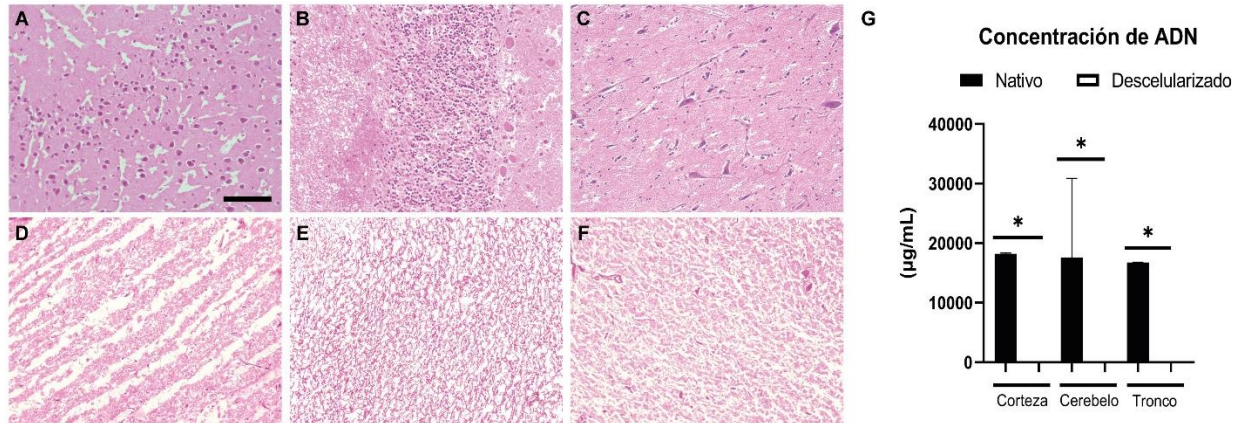


Figura 20. Evaluación cualitativa y cuantitativa del contenido nuclear en dECM. Tinción con H&E en (A) Corteza nativa, (B) Cerebelo nativo, (C) Tronco nativo, (D) Corteza descelularizada, (E) Cerebelo descelularizado, (F) Tronco descelularizado. (G) Concentración de ADN de tejido nativo vs descelularizado. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μm . Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). * Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05.

1.3 Evaluación de contenido de proteínas en dECM

Para evaluar el contenido proteico de los tejidos descelularizados, se realizó un análisis histológico de las tres regiones cerebrales (cerebelo, corteza y tronco) utilizando la tinción azul de Coomassie, que tiñe las proteínas inespecíficas de azul. Se observó que tanto los tejidos nativos como los descelularizados presentaban esta coloración (*Figura 21, A-F*). Sin embargo, los tejidos descelularizados mostraron

espacios en su estructura, lo que sugiere una pérdida de proteínas durante el proceso de descelularización.

Para cuantificar las proteínas tras la descelularización, se empleó el ensayo de ácido bicinconínico (BCA). Los resultados mostraron una menor concentración de proteínas en los tejidos descelularizados en comparación con los tejidos nativos (*Figura 21G*), lo que confirma la pérdida proteica durante el proceso. La concentración de proteínas en la corteza se redujo de 4.405 $\mu\text{g/mL}$ a 2.247 $\mu\text{g/mL}$, en el cerebelo de 4.028 $\mu\text{g/mL}$ a 2.357 $\mu\text{g/mL}$, y en el tronco de 3.064 $\mu\text{g/mL}$ a 1.739 $\mu\text{g/mL}$, indicando un cambio significativo en todas las regiones y una reducción del contenido proteico del ($\pm 48.99\%$), ($\pm 41.49\%$) y ($\pm 41.49\%$), respectivamente.

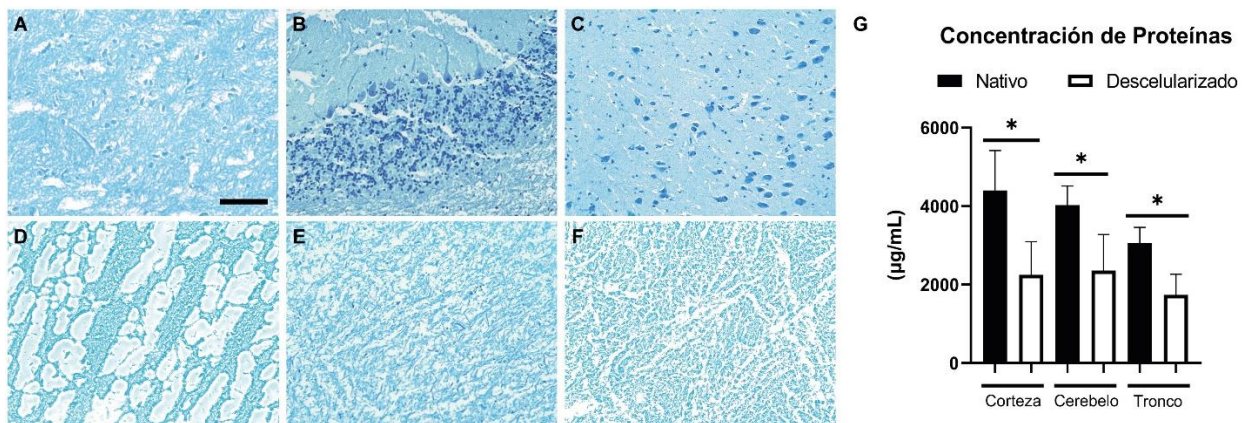


Figura 21. Evaluación cualitativa y cuantitativa del contenido proteico en dECM. Tinción con azul de coomassie en (A) Corteza nativa, (B) Cerebelo nativo, (C) Tronco nativo, (D) Corteza descelularizada, (E) Cerebelo descelularizado, (F) Tronco descelularizado. (G) Concentración de proteínas de tejido nativo vs descelularizado. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μm . Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). * Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05.

1.4 Evaluación de contenido de lípidos en dECM

Para evaluar el contenido de lípidos en los tejidos descelularizados, se realizó un análisis histológico de las tres regiones cerebrales (cerebelo, corteza y tronco) utilizando la tinción "Luxol Fast Blue", que permite visualizar los fosfolípidos y galactolípidos presentes en las vainas de mielina de los tejidos nerviosos. Se observó que tanto los tejidos nativos como los descelularizados presentaban la coloración azul, lo que indica la presencia y distribución de lípidos (*Figura 22, A-F*).

Para cuantificar los lípidos tras la descelularización, se utilizó un kit de cuantificación de lípidos. Los resultados mostraron un aumento en el contenido lipídico tras la descelularización en la corteza de 83.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 112.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el cerebelo 90.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 114.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando un aumento de la concentración de lípidos del 26.26% y 20.69% respectivamente. Sin embargo, en el tronco disminuyó de 107.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 84.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, una reducción del 21.64%. No se observaron diferencias significativas entre los tejidos nativos y descelularizados en ninguna de las regiones (*Figura 22G*).

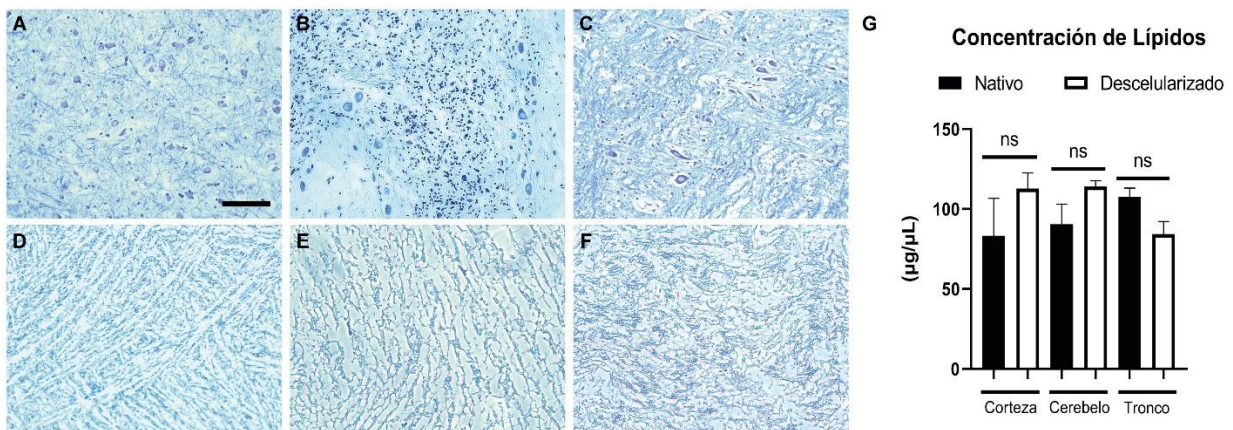


Figura 22. Evaluación cualitativa y cuantitativa del contenido lipídico en dECM. Tinción con Luxol Fast Blue en (A) Corteza nativa, (B) Cerebelo nativo, (C) Tronco nativo, (D) Corteza descelularizada, (E) Cerebelo descelularizado, (F) Tronco descelularizado. (G) Concentración de proteínas de tejido nativo vs descelularizado. La barra de escala de todas las imágenes es

igual a 180 μm . Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). ns Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05.

1.5 Evaluación de contenido de azúcares en dECM

Para evaluar la presencia de azúcares tras la descelularización, se realizó un análisis histológico de las tres regiones cerebrales (cerebelo, corteza y tronco) utilizando la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS), que tiñe de magenta los hidratos de carbono, glicoproteínas y proteoglicanos. Tanto los tejidos nativos como los descelularizados mostraron coloración magenta, aunque los tejidos descelularizados presentaron vacíos estructurales en comparación con los tejidos nativos, donde la coloración era más homogénea (*Figura 23, A-F*).

Para cuantificar el contenido de azúcares, se utilizó el ensayo de glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG) Blyscan. Los resultados mostraron un mayor contenido de glicosaminoglicanos tras la descelularización en la corteza de 18.76 $\mu\text{g/mL}$ a 20.17 $\mu\text{g/mL}$, cerebelo de 14.12 $\mu\text{g/mL}$ a 21.94 $\mu\text{g/mL}$ y tronco de 20.74 $\mu\text{g/mL}$ vs 25.06 $\mu\text{g/mL}$, indicando un aumento de concentración de azúcares del ($\pm 7\%$), ($\pm 35.64\%$) y ($\pm 17.24\%$), respectivamente (*Figura 23G*).

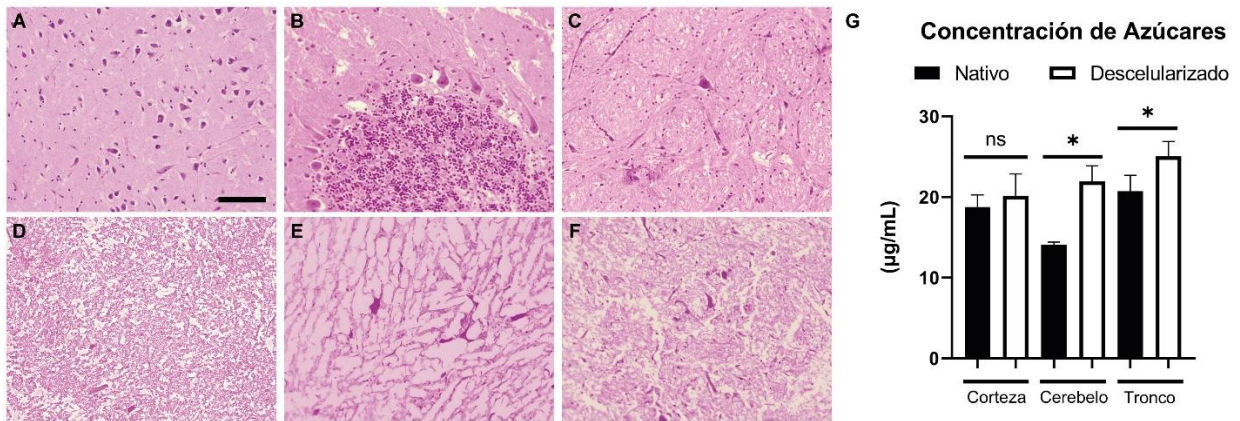


Figura 23. Evaluación cualitativa y cuantitativa del contenido de azúcares en dECM. Tinción con PAS en (A) Corteza nativa, (B) Cerebelo nativo, (C) Tronco nativo, (D) Corteza descelularizada, (E) Cerebelo descelularizado, (F) Tronco descelularizado. (G) Concentración de azúcares de tejido nativo vs descelularizado. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 µm. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). * Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05. ns Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05.

1.6 Evaluación de esterilidad de dECM

El análisis bacteriano y micológico para el tejido descelularizado liofilizado de las áreas de tronco, corteza, y cerebelo, no presentaron presencia de microorganismos.

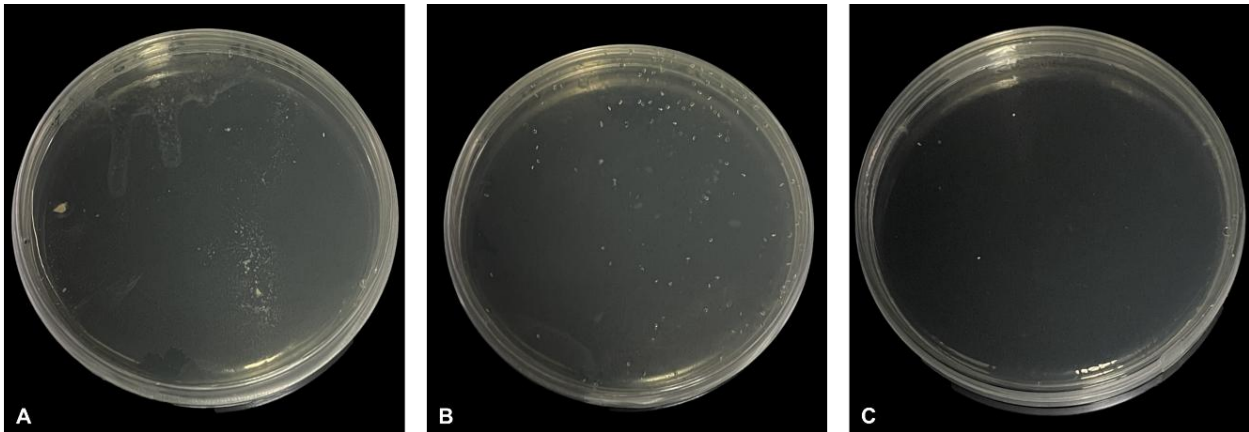


Figura 24. Prueba de esterilidad en tejidos descelularizados, donde (A) es corteza descelularizada, (B) tronco descelularizado y (C) cerebelo descelularizado.

2. Diferenciación a morfología neuronal de PC-12

2.1 Diferenciación con factores neurotróficos NGF / BDNF

Se analizó el potencial de diferenciación tras la administración de los factores neurotróficos NGF y BDNF (*Figura 25*), observándose maduración neurítica y la presencia de extensiones. Las células PC-12 control (*Figura 25A*), adheridas sin suministro de factores neurotróficos, mantuvieron su estructura redonda a lo largo de los siete días de experimentación. En contraste, la estimulación con NGF (*Figura 25B*) promovió el crecimiento de extensiones neuríticas, las cuales alcanzaron una longitud considerable desde el segundo día de tratamiento.

Por otro lado, bajo el suministro de BDNF (*Figura 25C*), también se observaron extensiones neuríticas, aunque su longitud fue notablemente menor en comparación con las estimuladas con NGF. Al igual que con NGF, la estimulación comenzó a mostrar efectos a partir del segundo día.



Figura 25. Evaluación cualitativa de PC-12 bajo estimulación con factores neurotróficos: (A) Control sin factores neurotróficos, (B) NGF (50 ng/mL), (C) BDNF (150 ng/mL). La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μ m.

Además, se realizó un conteo celular para determinar el porcentaje de células diferenciadas y evaluar la efectividad del factor neurotrófico en la estimulación de las PC-12. El conteo mediado por NGF mostró una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre las células control y las diferenciadas (4.759% vs 55.34%). Esto demuestra que NGF indujo una estimulación del 50% con respecto al control.

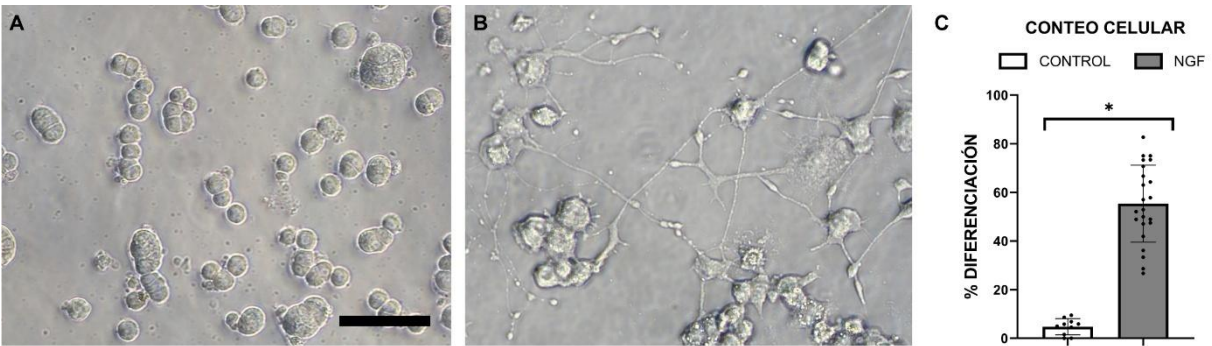


Figura 26. Evaluación cuantitativa de PC-12 bajo estimulación con NGF: (A) Control de PC-12 sin administración de NGF. (B) Estimulación mediada por NGF. (C) Cuantificación del porcentaje de diferenciación de células control y células diferenciadas por NGF. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μ m. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). * Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05.

De igual forma, se evaluó el porcentaje de diferenciación bajo la estimulación con BDNF mostrando una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre las células control y las diferenciadas (4.759% vs 39.14%), lo que nos indica que la capacidad de inducción de diferenciación celular del BDNF es de un 34.38%.

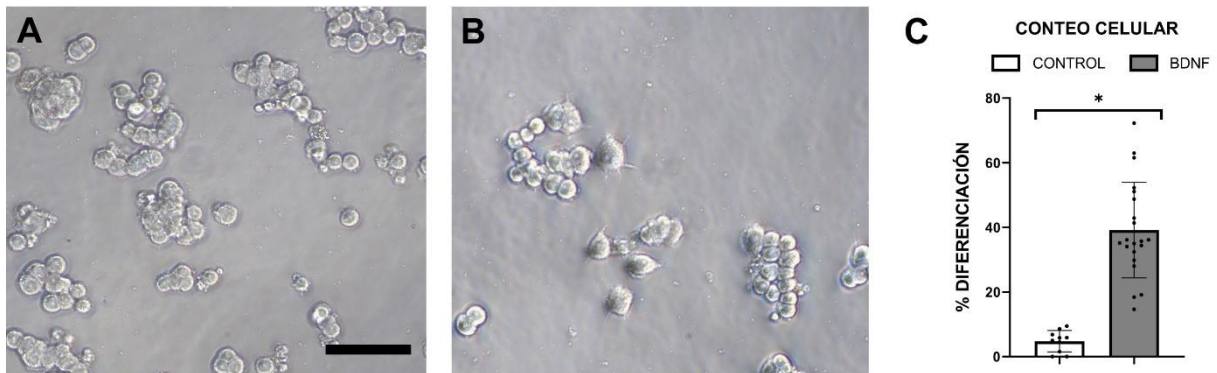


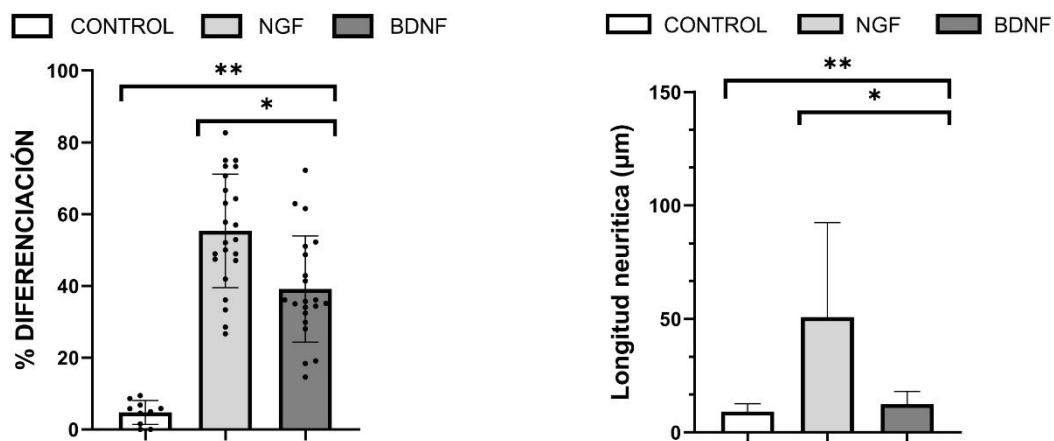
Figura 27. Evaluación cuantitativa de PC-12 bajo estimulación con BDNF: (A) Control de PC-12 sin administración de BDNF. (B) Estimulación mediada por BDNF. (C) Cuantificación del porcentaje de diferenciación celular, células control, y células diferenciadas. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μm . Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). *Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05.

Luego, se realizó una comparación entre los dos factores (NGF y BDNF), para evaluar su capacidad estimulante (*Gráfica 1A*). Se observó que NGF induce un porcentaje de diferenciación celular mayor a la ejercida por BDNF ($\pm 15.62\%$), marcando diferencias significativas.

Conforme a evaluar si el factor neurotrófico induce mayor diferenciación celular, se realizó una cuantificación de la longitud promedio de las neuritas entre las células estimuladas con NGF y BDNF (*Gráfica 1B*). Los resultados mostraron diferencias significativas entre el promedio de longitud de las células control y las células estimuladas con NGF (9.166 μm vs 50.79 μm , $p < 0.0001$), con un aumento de 41.62

μm en las neuritas respecto al control. Igualmente, se observó una diferencia significativa entre el control y las estimuladas con BDNF ($9.166 \mu\text{m}$ vs $12.44 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$), con un incremento de $3.27 \mu\text{m}$ en el crecimiento neurítico. Al comparar NGF y BDNF, NGF indujo un aumento de $38.35 \mu\text{m}$ en la longitud promedio de las neuritas respecto a BDNF, observando una diferencia significativa ($50.79 \mu\text{m}$ vs $12.44 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$).

A. CUANTIFICACIÓN DE DIFERENCIACIÓN CELULAR **B. CUANTIFICACIÓN DE LONGITUD NEURÍTICA**



Gráfica 1. Evaluación cuantitativa de PC-12 bajo estimulación con factores neurotróficos: (A) Cuantificación de diferenciación celular de los factores NGF y BDNF. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). (B) Cuantificación de extensiones neuríticas tras la administración de factores neurotróficos NGF y BDNF. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional no paramétrico con un análisis post hoc de Dunn ($p < 0,05$). *Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05. ** Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs control.

2.1.1 Caracterización de células diferenciadas por factores neurotróficos

La caracterización por inmunofluorescencia (*Figura 28*) mostró que las extensiones neuríticas de las células estimuladas con NGF son visiblemente más largas en micrómetros que las estimuladas con BDNF. Además, se observó una clara diferencia entre las células estimuladas y las de control (sin factores neurotróficos).

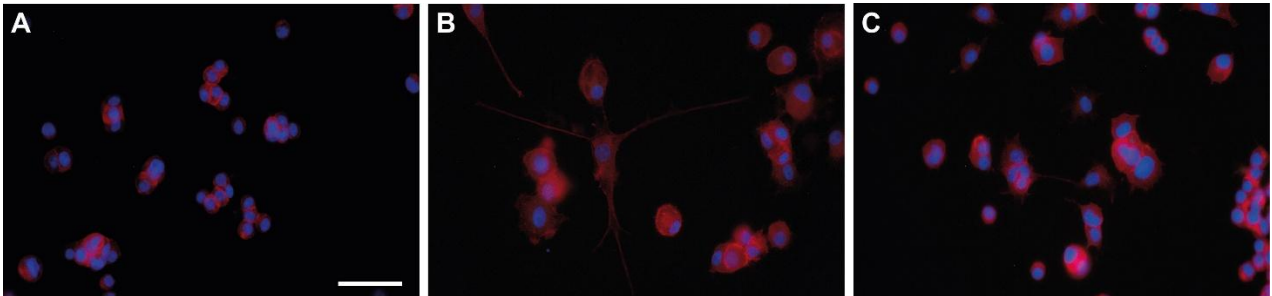


Figura 28. Caracterización por inmunofluorescencia: (A) Control de PC-12 sin estimular. (B) Estimulación mediada por NGF (50 ng/mL). (C) Estimulación mediada por BDNF (150 ng/mL). La barra de escala de todas las imágenes es igual a 40 μ m.

2.2 Diferenciación con factor soluble de dECM

Las células fueron expuestas a la administración del factor soluble de dECM proveniente de la corteza, cerebelo y tronco (*Figura 29*) a una concentración de 1×10^5 ng/mL durante 7 días, con estímulos cada 48 horas. Se observó crecimiento neurítico desde el primer día.

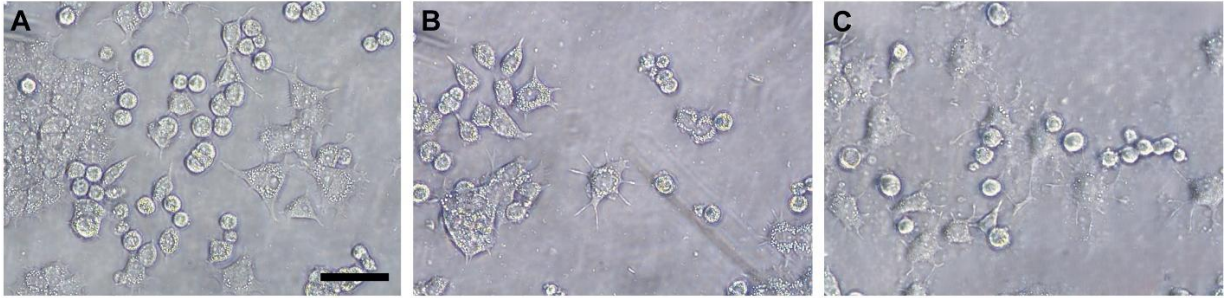
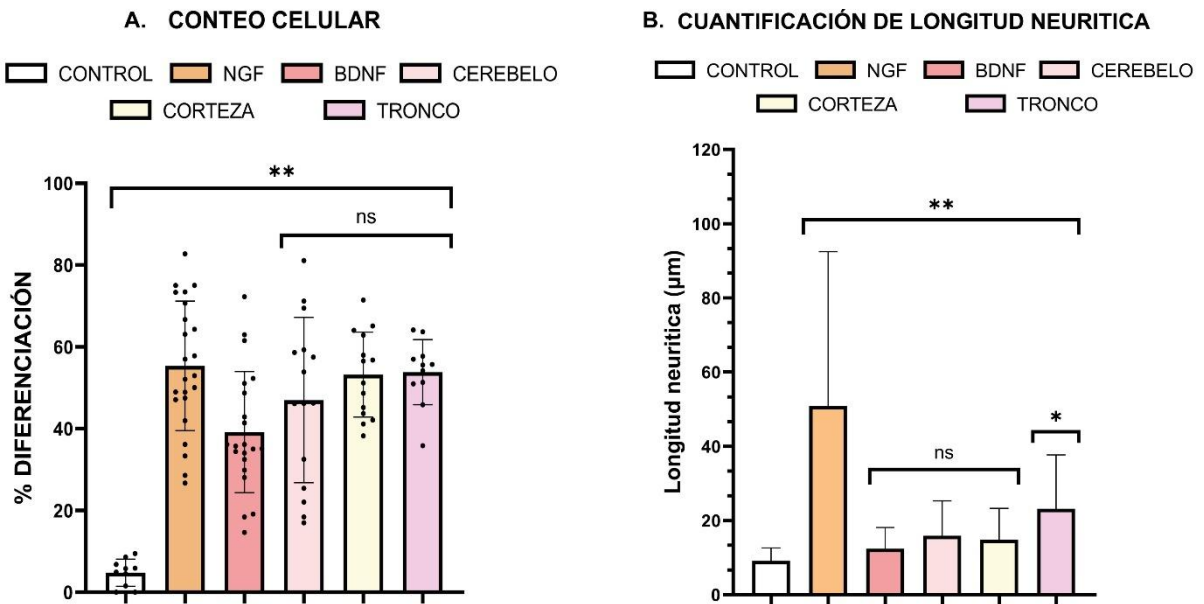


Figura 29. Estimulación con factor soluble de dECM a una concentración final de 1×10^5 ng/mL, (A) Corteza, (B) Cerebelo y (C) Tronco. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μ m.

Para evaluar la efectividad del factor soluble de dECM y comparar con la estimulación por factores neurotróficos, se cuantificaron el porcentaje de diferenciación celular y las longitudes neuríticas (*Gráfica 2*) entre el control negativo (células sin dECM soluble), los controles positivos (estimuladas con NGF y BDNF) y las estimuladas con dECM de las áreas de corteza, cerebelo y tronco. Respecto al porcentaje de diferenciación celular, no hubo un cambio significativo entre los controles positivos y aquellas estimuladas con el factor soluble de dECM, sin embargo, con respecto al control negativo se observaron cambios significativos. Igualmente, al comparar la capacidad estimulante de las distintas áreas de dECM, tronco fue el que indujo mayor diferenciación (53.79%) seguido de corteza (53.20%) y de último cerebelo (46.98%) indicando una diferencia con respecto al control de 49.03%, 48.44% y 42.22%, respectivamente.

Por otra parte, existe una diferencia significativa entre el control positivo de NGF y las células estimuladas con factor soluble de dECM de cada área; Sin embargo, al comparar el control positivo de BDNF no hubo una diferencia significativa, con respecto a cerebelo y corteza, pero una diferencia significativa con dECM del área tronco.

Igualmente se comparó, la longitud entre las áreas estudiadas, donde se demostró que tronco tuvo una mayor extensión neurítica (23.20 μm), seguido de cerebelo (15.93 μm) y corteza (14.83 μm), indicando una diferencia con respecto al control de 14.03 μm , 6.76 μm y 5.66 μm , respectivamente.



Gráfica 2. Evaluación cuantitativa de la estimulación mediada por dECM. (A) Cuantificación del porcentaje de diferenciación celular. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). **Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs control. ns Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05 vs NGF y BDNF. (B) Cuantificación de longitud neurítica. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional no paramétrico con un análisis post hoc de Dunn ($p < 0,05$). *Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs BDNF. **Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs NGF. ns Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05.

3. Inhibición de Receptores Trk

3.1 Inhibición de estimulación con factores neurotróficos

Se inhibieron los receptores TrkA y TrkB durante 72 horas con concentraciones finales de 20 μM y 5 μM , respectivamente, previo a la estimulación con factores neurotróficos.

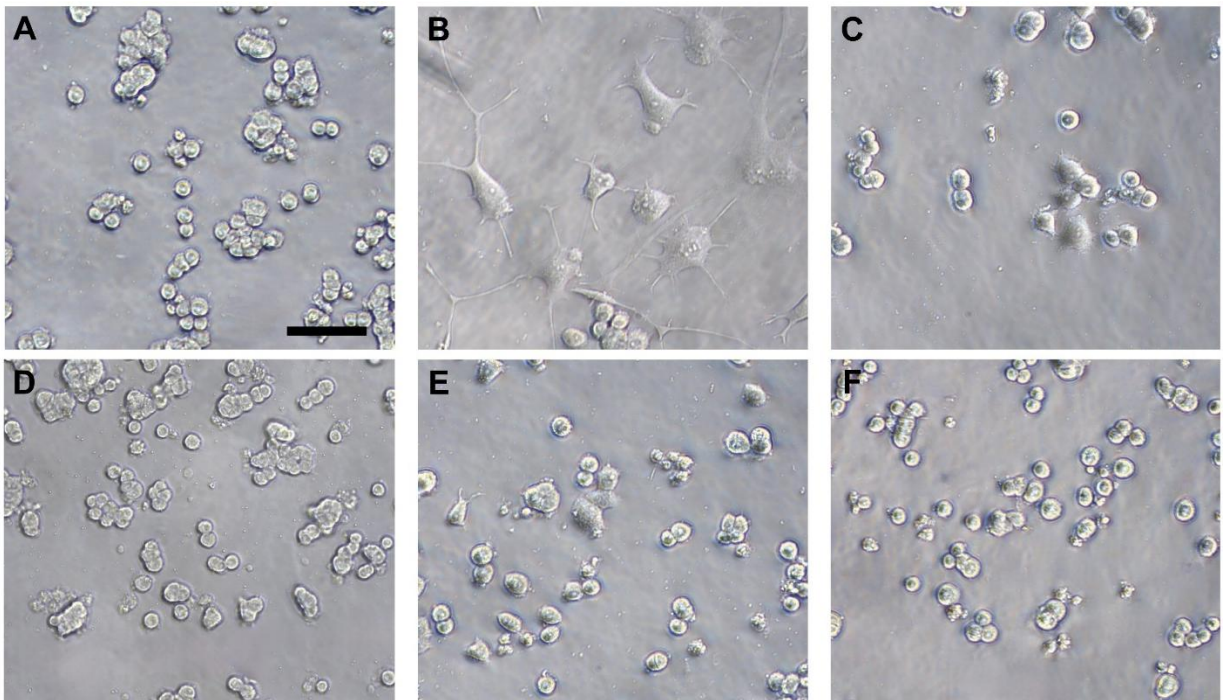


Figura 30. Inhibición medida por GW441756 y ANA-12. (A) Control sin estimulación, (B) PC-12 estimuladas con NGF, (C) PC-12 estimuladas con BDNF, (D) Control de inhibición, (E) PC-12 inhibidas con GW441756 y (F) PC-12 inhibidas con ANA-12. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μm .

Dado que algunas de las células inhibidas mostraron estimulación, se cuantificó tanto el porcentaje de diferenciación y la longitud neurítica de las células tratadas con GW441756 en comparación con las estimuladas con NGF. Los resultados mostraron una diferencia significativa en el porcentaje de diferenciación entre las células estimuladas con NGF y las tratadas con GW441756 (55.34% vs 12.89%) donde se

redujo aproximadamente un 42.45%. Igualmente, al comparar la longitud neurítica de NGF (50.79 μm) y las inhibidas (10.49 μm), se observó que se redujo un 40.30 μm de la longitud neurítica bajo la administración de GW441756. En cuanto a las células tratadas con ANA-12, hubo una diferencia significativa entre las células estimuladas y las inhibidas, tanto para el porcentaje de diferenciación celular (39.14% vs 10.52%) con una diferencia de 28.62%, como para el crecimiento o extensión neurítica (12.44 μm vs 5.94 μm), representando una reducción de 6.50 μm .

De igual forma, se analizaron los valores obtenidos de los grupos NGF y BDNF, al inhibirlos con el receptor no específico de unión (*Gráfica 3*). Para NGF no hubo un cambio significativo entre las células estimuladas y la inhibición de TrkB (55.34% vs 51.60%) lo que equivale a una diferencia de 3.74%. En el grupo de BDNF, no hubo un cambio significativo entre las células estimuladas y la inhibición de TrkA (39.14% vs 22.11%) con una diferencia del 17.03%. Además, se comparó la longitud neurítica al inhibirlos con el receptor no específico de unión (*Gráfica 4*). Para NGF, no hubo un cambio significativo entre las células estimuladas y la inhibición con TrkB (50.79 μm vs 44.98 μm) con una diferencia de longitud de 5.81 μm . En el grupo de BDNF, no hubo un cambio significativo entre las células estimuladas (12.44 μm) y las inhibidas con TrkA (15.61 μm), con una diferencia de longitud de 3.17 μm . Esto nos indica que al estimular con los receptores no específicos de las neurotrofinas no hay una inhibición significativa.

3.2 Inhibición de estimulación con factor soluble de dECM

De igual forma, se realizó una inhibición de TrkA (20 μ M) y TrkB (5 μ M) durante 72 horas en las células PC-12 previas a ser estimuladas con el factor soluble de dECM de corteza, cerebelo y tronco. Visualmente, se observó una diferencia entre las células estimuladas e inhibidas, a pesar de que la inhibición fue parcial. Las células inhibidas con GW441756 mostraron mayor estimulación en comparación con las inhibidas con ANA-12.

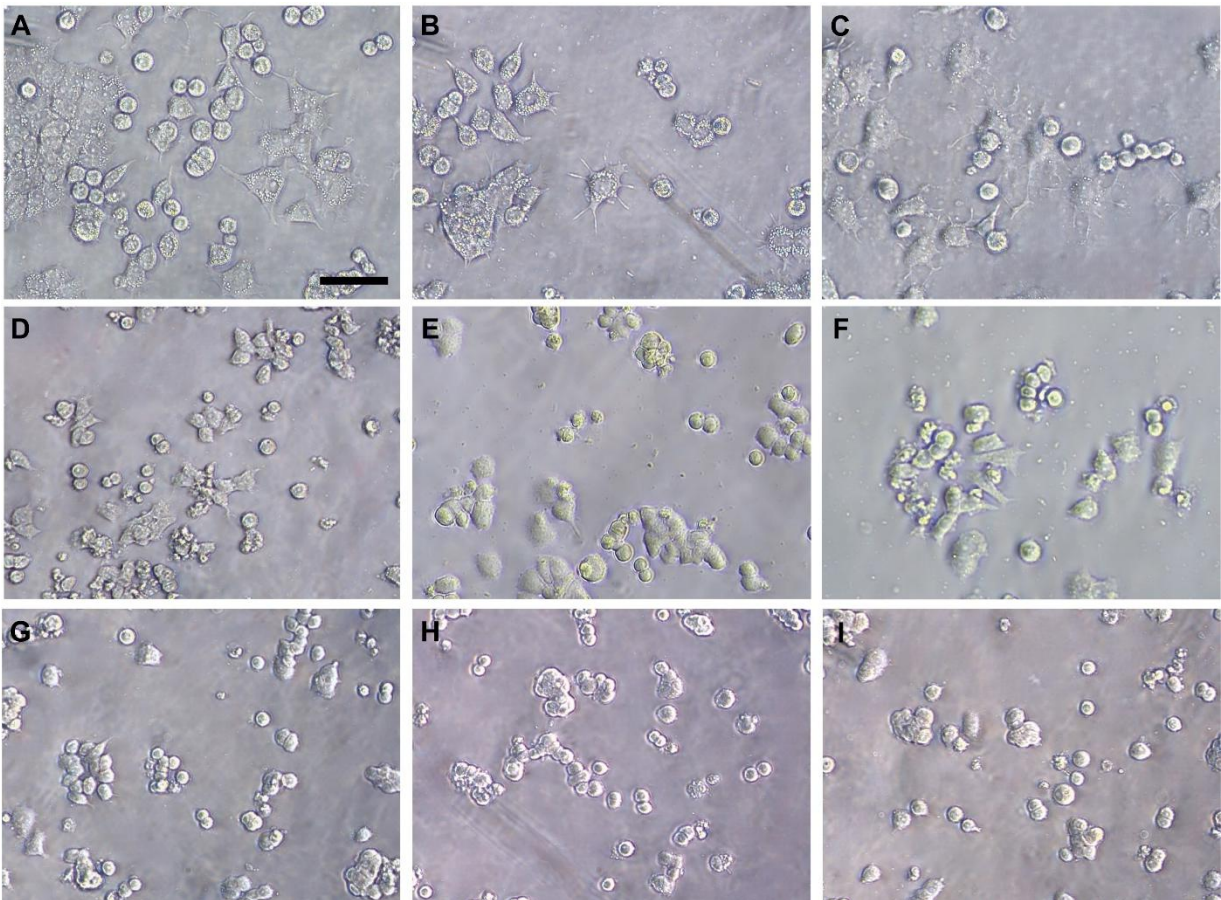
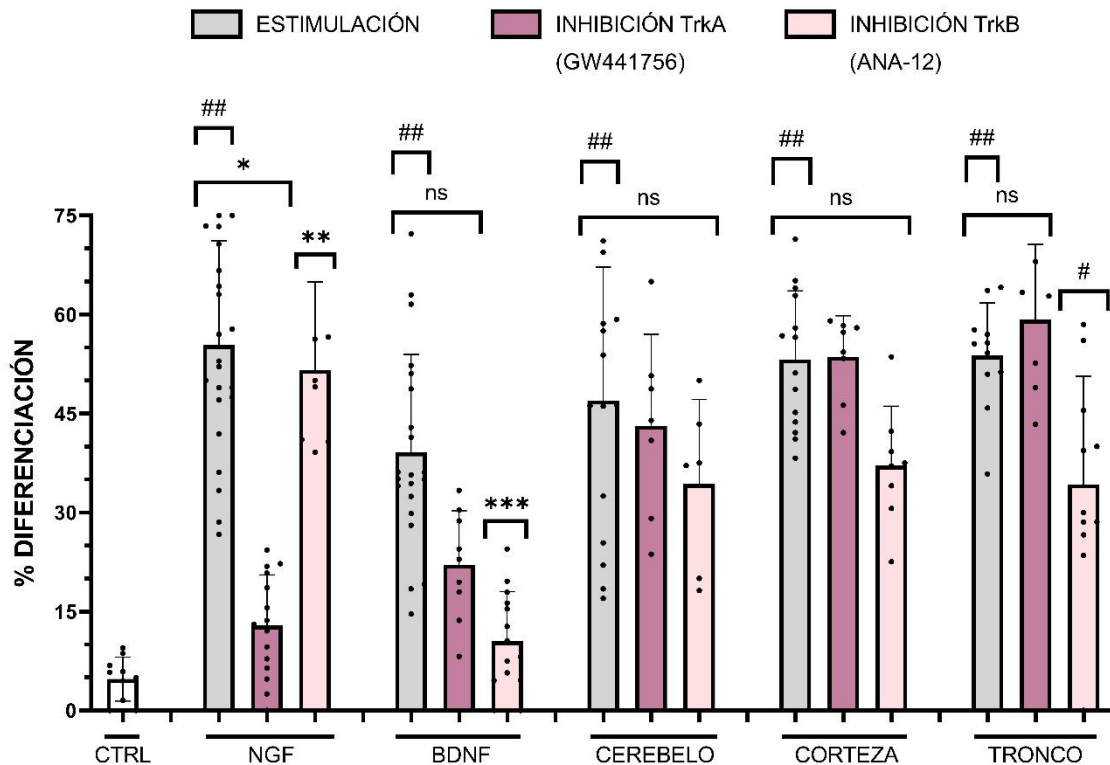


Figura 31. Inhibición medida por GW441756 y ANA-12 en células PC-12 estimuladas con dECM del área de (A) Corteza (B) Cerebelo, (C) Tronco. Control de inhibición mediado por GW441756 en células estimuladas con dECM del área de (D) Corteza (E) Cerebelo, (F) Tronco. Control de inhibición mediado por ANA-12 en células estimuladas con dECM del área

de (G) Corteza (H) Cerebelo, (I) Tronco. La barra de escala de todas las imágenes es igual a 180 μm .

Se cuantificó el porcentaje de diferenciación (*Gráfica 3*), para el grupo de cerebelo y corteza no hubo un cambio significativo entre las células estimuladas y sus respectivas inhibiciones, sin embargo, evaluando cada uno de los valores, se puede observar que se redujo el porcentaje de diferenciación tras la inhibición de TrkB (Cerebelo, de 46.98% a 34.37%, lo que representa una diferencia de $\pm 12.61\%$ y Corteza, 53.20% a 37.10% lo que representa una diferencia de $\pm 16.10\%$), mientras que el porcentaje con respecto a la inhibición de TrkA, permaneció casi igual que el de la estimulación. Al comparar la inhibición con la estimulación de tronco, se pudo observar un cambio significativo entre la estimulación y la inhibición de TrkB (53.79% vs 34.24%) indicando una diferencia aproximada de 19.55%, y un cambio no significativo entre la estimulación y la inhibición de TrkA (53.79% vs 59.24%), lo que representa una diferencia de 5.45%.

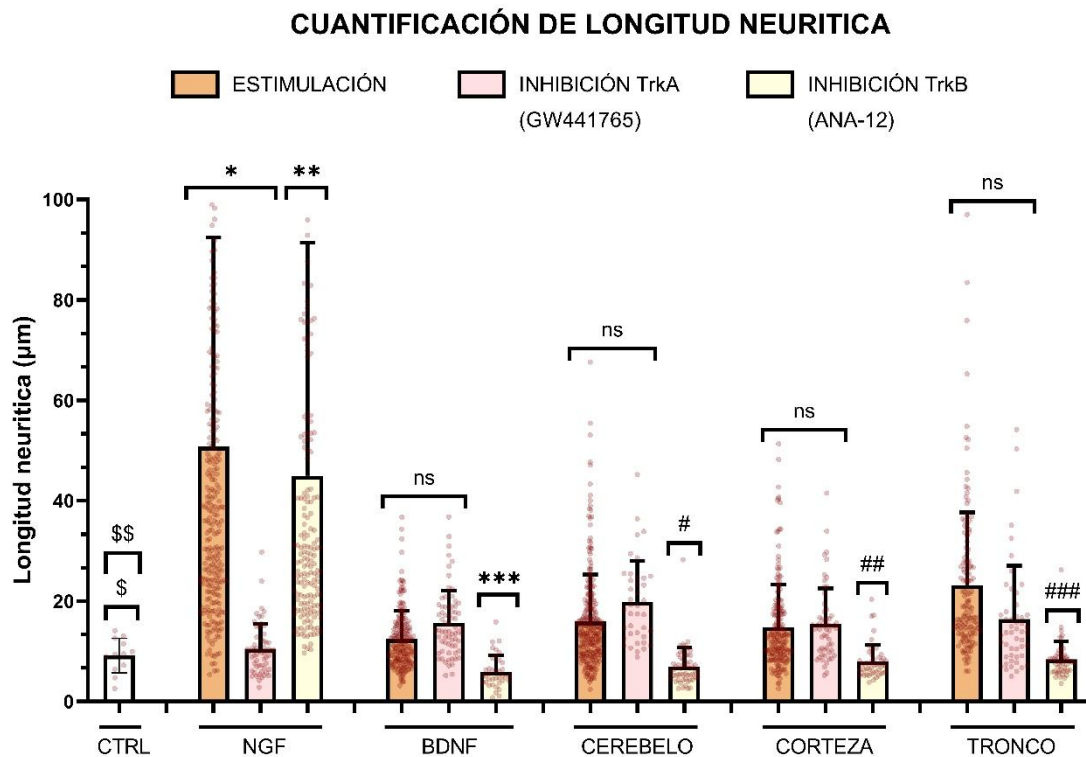
CUANTIFICACIÓN DE DIFERENCIACIÓN CELULAR



Gráfica 3. Cuantificación de diferenciación celular de la inhibición de receptores TrkA y TrkB respectivamente, bajo la administración de NGF, BDNF, factor soluble de dECM de las áreas cerebelo, corteza y tronco. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional con un análisis post hoc de Tukey ($p < 0,05$). * Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05. ** Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05 vs estimulación NGF. *** Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs estimulación BDNF. # Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs estimulación BDNF. ## Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs control. ns Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05.

Se cuantificó la longitud neurítica (*Gráfica 4*) de las células tratadas con GW441756 frente a las estimuladas con dECM. Los resultados no mostraron una diferencia significativa entre la longitud neurítica de las células estimuladas con dECM (cerebelo:

15.93 μm ; corteza: 14.83 μm ; tronco: 23.20 μm) y las tratadas con GW441756 (cerebelo: 19.81 μm ; corteza: 15.48 μm ; tronco: 16.41 μm), indicando una diferencia de longitud neurítica de 3.88 μm , 0.65 μm y 6.79 μm , respectivamente. Sin embargo, hubo una diferencia significativa en las células estimuladas con dECM (cerebelo: 15.93 μm ; corteza: 14.83 μm ; tronco: 23.20 μm). y las tratadas con ANA-12 (cerebelo: 6.94 μm ; corteza: 7.97 μm ; tronco: 8.40 μm), lo que representa una diferencia de longitud neurítica 8.99 μm , 6.86 μm y 14.80 μm respectivamente, indicando que la inhibición de TrkB fue más efectiva comparada a la inhibición de TrkA.



Gráfica 4. Cuantificación de la longitud neurítica de la Inhibición de receptores TrkA y TrkB respectivamente, bajo la administración de NGF, BDNF, factor soluble de dECM de las áreas cerebelo, corteza y tronco. Se determinaron diferencias significativas entre todos los grupos mediante un ANOVA unidireccional no paramétrico con un análisis post hoc de Dunn ($p < 0,05$). * Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05. ** Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05 vs estimulación NGF. *** Hace

referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs estimulación BDNF. # Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs estimulación cerebelo. ## Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs estimulación corteza. ### Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs estimulación tronco. \$ Hace referencia a un valor p estadísticamente significativo inferior a 0,05 vs estimulación NGF y Tronco. \$\$ Hace referencia a un valor p estadísticamente no significativo superior a 0,05 vs estimulación BDNF, Cerebelo y Corteza.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Obtención y caracterización de matriz extracelular de cerebro porcino

La obtención de una matriz extracelular adecuada para aplicaciones biomédicas requiere preservar tanto la estructura como las propiedades bioactivas de las subregiones cerebrales. En este estudio, se llevó a cabo la descelularización de tres regiones específicas del cerebro porcino (corteza, cerebelo y tronco encefálico), a diferencia de otros estudios, como el de Simsa et al., (2021), que descelularizan el cerebro en su totalidad. Los análisis histológicos y bioquímicos realizados tras la descelularización confirman y resaltan las diferencias entre las subregiones cerebrales estudiadas y sus posibles efectos en la diferenciación celular.

La cuantificación del material genético fue el primer parámetro analizado tras la descelularización, la remoción adecuada del contenido intracelular es un criterio esencial para evitar una respuesta inmune adversa en aplicaciones terapéuticas (Crapo et al., 2011; Gilpin & Yang, 2017). La caracterización cualitativa mediante tinción de H&E reveló una alta densidad de núcleos celulares en los tejidos nativos, en contraste con el tejido descelularizado, donde estos fueron eliminados con éxito tras el proceso de descelularización. Esto indicó una remoción efectiva del material genético, lo cual fue corroborado mediante electroforesis en gel, donde los tejidos nativos mostraron fragmentos de alto peso molecular (>10,000 pb), mientras que los descelularizados presentaron valores <1,000 pb. Estos resultados se correlacionaron con la cuantificación de ADN mediante el ensayo PicoGreen™, evidenciando una reducción drástica del contenido de ADN en todas las regiones cerebrales analizadas.

Los resultados obtenidos son consistentes con los reportados por Crapo et al., (2012), lo que confirma la eficacia del protocolo de descelularización en la eliminación del material genético. Además, coinciden con la literatura, que señala que la descelularización tiene como objetivo remover células y componentes intracelulares, en particular ADN y ARN, mediante métodos químicos, enzimáticos, físicos o combinados, preservando simultáneamente proteínas estructurales y reguladoras de la matriz extracelular (MEC) (Gilpin & Yang, 2017; Neishabouri et al., 2022).

La conservación de determinadas proteínas podría ser relevante, ya que se ha demostrado que algunas glicoproteínas favorecen la expansión de neuritas, así como la supervivencia y el crecimiento neuronal (Dequach et al., 2011). La preservación de la estructura proteica se evaluó cualitativamente mediante tinción con azul de Coomassie evidenciando la presencia de contenido proteico tanto en los tejidos nativos como en los descelularizados, lo que indica que, se conservó un porcentaje de proteínas, presumiblemente reguladoras y estructurales (Gilpin & Yang, 2017). La cuantificación mediante el ensayo de BCA confirmó la retención de proteínas en los tejidos descelularizados, aunque con una reducción en su concentración. Estos resultados coinciden con los reportados por Simsa et al., (2021) quienes evidenciaron que la descelularización disminuye la concentración proteica, sin embargo, describen que se preservaron proteínas estructurales, en su mayoría colágeno y ciertos factores de crecimiento. Esta pérdida proteica se atribuye a la eliminación celular, dado que la remoción de células conlleva la eliminación de proteínas intracelulares y solubles, como se ha descrito en estudios previos de descelularización, sin embargo, se sugiere que el nivel proteico residual corresponde a la conservación de proteínas estructurales de la matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, laminina y ciertos factores de

crecimiento, como lo describe Gilpin & Yang, (2017); Zhang et al., (2022). Igualmente es importante destacar que las diferencias en las concentraciones entre las distintas áreas cerebrales, es debido a que el contenido proteico en el SNC varía según el tipo de tejido, la región específica y sus funciones en el organismo. Los resultados nos sugieren que la técnica de descelularización empleada permite la retención de ciertas proteínas, aunque no se dispone de información precisa sobre cuáles permanecen en el tejido y cuáles se eliminan.

Uno de los componentes más importantes de la membrana celular, y los cuales son esenciales para muchos procesos en el cerebro incluyendo la señalización neuronal y la integridad estructural, son los lípidos. El principal hallazgo durante la caracterización de lípidos mediante la tinción "Luxol Fast Blue" es que tanto en los tejidos nativos como en los descelularizados se conserva la coloración azul, lo que indica la presencia de fosfolípidos y galactolípidos (Moszczyński et al., 2020). Sin embargo, la cuantificación de lípidos arrojó resultados interesantes: en algunas regiones cerebrales, como la corteza y el cerebelo, hubo un aumento en el contenido lipídico tras la descelularización. Debido a que el proceso de descelularización demanda un equilibrio entre la preservación de la estructura nativa de la ECM y la eliminación celular, eliminar todos los elementos como el ADN, y los lípidos de un tejido es imposible. Al descelularizar tejidos del sistema nervioso, la alta densidad de axones y mielina puede dificultar su eliminación. Debido a su resistencia a ciertos tratamientos, su remoción completa puede requerir métodos adicionales, como el uso de detergentes específicos o enzimas (Zhang et al., 2022). De igual forma, la composición lipídica del tejido cerebral difiere en función a las condiciones de descelularización y la técnica de extracción de lípidos, además que puede alterar la estructura y composición de la

matriz extracelular, influyendo en la forma en que se retienen y distribuyen los lípidos (Golebiowska et al., 2024; Nakamura et al., 2017; Yaldiz et al., 2022).

Los glicosaminoglicanos (GAGs) desempeñan un papel clave en el desarrollo, migración y crecimiento neurítico en el SNC. Dequach et al., (2011) describe estos compuestos como elementos clave de la MEC y desempeñan un papel esencial en la comunicación celular y la regulación de factores de crecimiento, por ello, su contenido fue evaluado tras el proceso de descelerización. El análisis mediante tinción PAS confirmó la presencia de azúcares en los tejidos nativos y descelerizados. Estos hallazgos son consistentes con los niveles de glicosaminoglicanos (GAGs) cuantificados mediante el ensayo de Blyscan. Sin embargo, en todas las regiones cerebrales analizadas, la concentración de GAGs en la matriz extracelular (MEC) descelerizada fue mayor en comparación con los tejidos nativos, lo que sugiere una mayor concentración relativa de azúcares tras la descelerización, posiblemente debido a la eliminación de proteínas intracelulares y ADN. Dado que el objetivo del proceso es la eliminación celular sin comprometer la integridad de la MEC, la retención de GAGs y proteoglicanos, (ejm. Perlecano), se ve favorecida.

En general, las variaciones detectadas en la eliminación de material celular y la conservación de la ECM entre diferentes zonas del cerebro podrían estar vinculadas con las particularidades inherentes de cada zona. El cerebelo es altamente rico en neuronas, contiene el 80% de las neuronas del cerebro organizadas en una densa capa celular y la presencia de células como las de Purkinje puede reducir la eficacia del proceso (Jimshelishvili & Dididze, 2019), luego sigue la corteza cerebral, también presenta una alta densidad celular, compuesta por una red compleja de neuronas

interconectadas que forman la capa más externa del cerebro, por lo que la remoción de ADN y proteínas intracelulares es más notoria (Javed & Lui, 2018) y por último se encuentra el tronco, contiene sustancia gris y blanca. La sustancia blanca, particularmente está compuesta principalmente por axones, que poseen una alta densidad de fibras mielinizadas, lo que puede dificultar la penetración de detergentes y agentes descelularizantes, afectando la eficiencia del proceso (Basinger & Hogg, 2023). Dicho esto, el cerebelo, la corteza y el tronco cerebral poseen distintos factores como grosor, densidad celular, composiciones de ECM e incluso complejidades anatómicas, lo cual podría afectar la efectividad del proceso de descelularización (Yaldiz et al., 2022).

En función de garantizar la integridad de nuestros resultados y a futuro la seguridad de la aplicación en estudios celulares y posibles terapias regenerativas, es necesario realizar la prueba de esterilidad de la dECM de cerebro porcino. Los resultados demostraron la ausencia de contaminación bacteriana y fúngica en las muestras de dECM, lo que indica que el protocolo utilizado para su descelularización y posterior procesamiento fue eficaz en la eliminación de posibles contaminantes biológicos (Tao et al., 2021; Yaldiz et al., 2022).

La eficacia de la esterilización se debe de igual forma a los pasos de lavado con soluciones estériles, además del control riguroso durante la manipulación del material. A pesar de que los resultados no tuvieron presencia de microorganismos, es importante destacar que las pruebas de esterilidad fueron realizadas en condiciones de laboratorio controladas.

Es importante mencionar, que la esterilidad del dECM es esencial no solo para garantizar la seguridad de los cultivos celulares y la diferenciación, sino también para asegurar la fiabilidad de los resultados experimentales. De haber una contaminación la respuesta celular podría verse alterada o simplemente se introducen variables indeseadas al experimento, afectando tanto la reproducibilidad como la interpretación de los datos. Este estudio demuestra que el proceso utilizado garantiza un ambiente óptimo para las células, lo cual es un aspecto crítico para aplicaciones futuras en ingeniería de tejidos y regeneración neuronal.

2. Modulación *in vitro* de la diferenciación celular

Este estudio se centró en los factores neurotróficos NGF y BDNF en el modelo celular PC-12, debido a su capacidad para inducir la diferenciación celular. Además, se evaluó la administración de dECM como factor soluble en este linaje celular. La estimulación de las células PC-12 con los factores neurotróficos NGF y BDNF, demostraron diferencias significativas en cuanto a la respuesta celular, particularmente en el crecimiento neurítico. Estos resultados nos indican la importancia del desempeño de estas moléculas en la diferenciación y el crecimiento neuronal (Xiao & Le, 2015).

Los resultados obtenidos indicaron que las neuritas de las células tratadas con NGF alcanzaron una mayor longitud promedio y diferenciación celular, superior a las de las células control. Este resultado es consistente con diversos estudios cuyos parámetros son comparables a los de la presente investigación. Chaurasiya et al. (2017), cuantificaron el crecimiento neurítico en células PC-12 bajo distintas concentraciones de NGF, observando que aquellas estimuladas con 50 ng/mL presentaron una longitud

neurítica promedio de 45 μm . De manera similar, Harrill & Mundy, (2011), reportaron un promedio de aproximadamente 50 μm en células PC-12 tratadas con NGF. Además, Das et al., (2004), reportaron que la diferenciación celular en células PC-12 supera el 45% tras la estimulación con NGF. Estos valores son comparables a los obtenidos en el presente estudio, con una longitud neurítica promedio de 50.79 μm y una diferenciación celular superior al 45%. A partir de este dato, se demuestra que el NGF es muy efectivo en la promoción del crecimiento y la diferenciación neuronal en células PC-12, información que concuerda en la literatura donde se describe al NGF como un factor clave en el desarrollo y la regeneración de neuronas sensoriales y simpáticas (Greene & Tischler, 1976).

Por otro lado, a pesar de que el BDNF también promovió el crecimiento de las neuritas, su efecto en las células fue significativamente menor en comparación con el NGF. Aunque este factor tiene un efecto positivo al promover el crecimiento neuronal, su capacidad para inducir elongación neurítica en las células PC-12 es inferior.

Estos resultados concuerdan con estudios que evalúan el efecto del BDNF en el crecimiento neurítico. Srinivasan et al., (2014), demostraron que la presencia de BDNF promueve una longitud neurítica promedio de 15 μm en neuronas corticales, un valor comparable al obtenido en el presente estudio (12.44 μm). Esto se debe, a que las vías de señalización activadas por estos factores neurotróficos, son diferentes. Por una parte, el NGF actúa principalmente a través del receptor TrkA, que está fuertemente asociado con la promoción del crecimiento neurítico en este tipo de células (Karlner & Merry, 2023b), mientras que el BDNF se une al receptor TrkB, que desencadena otros procesos neuronales principales, como la supervivencia celular (Binder & Scharfman, 2004; Merighi, 2024).

Las diferencias entre NGF y BDNF nos indican que, aunque ambos factores promueven la diferenciación neuronal y el crecimiento neurítico, sus roles se encuentran especializados y dependen del contexto fisiológico o de las necesidades específicas de las células (S. Skaper, 2008). En el caso de las células PC-12, el NGF parece ser el factor más eficiente para promover la elongación neurítica, lo que va acorde con su rol descrito en la literatura en la promoción del crecimiento axonal. Por el contrario, el BDNF tiene efectos en otros aspectos de la funcionalidad neuronal, como la plasticidad sináptica (Chakrapani et al., 2020), aspectos que no fueron evaluados en este estudio, sin embargo Hartmann et al., (2001), probó que la activación de alta frecuencia de las sinapsis glutamatérgicas induce la liberación de BDNF desde gránulos secretores ubicados en la región sináptica, lo que favorece el concepto de que el BDNF es un mensajero sináptico de la plasticidad sináptica. Esta diferencia de funciones entre NGF y BDNF es importante para entender la especificidad de las vías de señalización que regulan el crecimiento y la maduración neuronal, y que son claves para el desarrollo de distintos tratamientos involucrados en la regeneración a nivel del sistema nervioso central.

Por otra parte, la estimulación de células PC-12 con matriz extracelular descelularizada (dECM) de diferentes áreas cerebrales (cerebelo, corteza y tronco) demostró que induce un crecimiento neurítico significativo, esto se debe a que las moléculas presentes en la dECM conservaron elementos funcionales de la matriz extracelular nativa que inducen la diferenciación celular (Nie & Wang, 2018). De hecho, estudios realizados por (Fujii et al., 1982; Vlodavsky et al., 1982) demuestran que la matriz extracelular de distintas fuentes promueve el crecimiento de neuritas en células PC12

en ausencia de NGF. Por otra parte, Crapo et al., (2012) observó que los andamios de matriz extracelular del sistema nervioso central retienen proteínas neuronales y factores de crecimiento, los cuales, al ser evaluados *in vitro* en células PC-12, demostraron citocompatibilidad y promovieron la migración, proliferación y diferenciación celular. A diferencia de estudios previos, este trabajo se centró en el uso de la matriz extracelular descelularizada (dECM) como factor soluble, en contraste con la literatura existente, donde suele emplearse como componente de sustratos celulares, andamios o hidrogeles para promover la migración celular.

La retención de los componentes bioactivos y señales, actúan regulando el comportamiento celular, incluida la proliferación y diferenciación celular (Brown et al., 2022), de hecho, se observó que el mayor crecimiento neurítico fue específicamente de las áreas de corteza y tronco, esto nos sugiere que la dECM contiene moléculas que activan rutas de diferenciación similares o complementarias a las que son activadas por los factores neurotróficos (Crapo et al., 2014). Los resultados apoyan estudios previos que indican que la dECM no solo actúa como soporte estructural, sino que también promueve la señalización celular para procesos de crecimiento, diferenciación y reparación neuronal (Crapo et al., 2012; Yaldiz et al., 2022).

De igual forma, las diferentes regiones cerebrales mostraron variaciones en cuanto a la capacidad de promover el crecimiento neurítico, estos resultados concuerdan con los realizados por Reginensi et al., (2020) donde al utilizar dECM de tres regiones del cerebro porcino en forma soluble, observaron que su administración en células PC-12 inducía diferenciación, evidenciando variaciones en la maduración neuronal según la región cerebral de origen. Las diferencias de longitudes están atribuidas a la composición específica de cada dECM regional, varía en términos de proteínas de la

matriz, glicosaminoglicanos y factores de crecimiento residentes (Agmon & Christman, 2016; Reginensi et al., 2020a). Por ejemplo, una región importante para la conectividad neuronal y soporte vital es el tronco encefálico (Basinger & Hogg, 2023), este podría poseer una mayor densidad de componentes bioactivos responsables de inducir respuestas de diferenciación más pronunciadas en las células PC-12.

De esta forma los resultados sugieren que la dECM podría ser un candidato prometedor para terapias de regeneración neural. El hecho de que la dECM por sí sola fue capaz de inducir la diferenciación neuronal sin la necesidad de factores neurotróficos adicionales como NGF, ofrece ventajas significativas para crear estrategias de reparación o regeneración de tejido nervioso dañado. Además, la diferencia observada en la respuesta de las células a la dECM derivada de distintas regiones cerebrales subraya la importancia de seleccionar la fuente adecuada de dECM para maximizar su potencial bioactivo en contextos terapéuticos.

Para evaluar la capacidad de diferenciación celular y validar la interacción proteína-receptor, se utilizaron inhibidores específicos de los receptores de NGF y BDNF. Este enfoque permite determinar la selectividad de las proteínas hacia sus receptores. A partir de los resultados obtenidos de inhibición de los receptores TrkA y TrkB para los factores neurotróficos NGF y BDNF, respectivamente, nos amplían la información sobre los mecanismos moleculares que están involucrados en la diferenciación neuronal. Cuando inhibes estas vías de señalización, se puede observar cómo la respuesta celular a los factores neurotróficos se ve significativamente afectada, este dato simplemente nos confirma el rol crucial de los receptores Trk y como la unión a

sus moléculas específicas provocan el crecimiento neurítico, como respuesta celular (Yan et al., 2019).

Uno de los resultados más significativos se dio tras la inhibición del receptor TrkA mediante el compuesto GW441756, la reducción drástica del porcentaje de diferenciación celular y disminución de la longitud de las neuritas en las células PC-12 estimuladas con NGF son consistentes con estudios como el de Di Donato et al., (2015) , que emplearon este inhibidor para evaluar el papel de TrkA en la regulación del crecimiento neurítico en células PC-12. En dicho estudio, el porcentaje de diferenciación celular, caracterizado por el crecimiento de neuritas fue aproximadamente del 12%. La proximidad de los valores obtenidos y los descritos en previas investigaciones entonces nos demuestran que la activación del receptor TrkA es esencial para el crecimiento neurítico. Además, uno de los aspectos clave en este estudio fue la determinación de la concentración óptima del inhibidor. Se observó que a 20 μM se alcanzó un mayor grado de inhibición sin afectar significativamente la supervivencia celular. Estos resultados son consistentes con el estudio de Bapat et al., (2016), que evaluó la función de la vía de señalización del NGF en la migración de células cancerosas pancreáticas, donde concentraciones entre 10-25 μM mantuvieron una alta viabilidad celular. Además, la inhibición de TrkA con GW441756 también redujo la migración celular hacia los ganglios de la raíz dorsal.

Cabe destacar que la inhibición no fue completa, dado que se observó un porcentaje de diferenciación celular. Se sugiere que el porcentaje de diferenciación registrado está relacionado con la variabilidad en el comportamiento celular. Además, la reducción en la longitud neurítica indica la posible activación de mecanismos

secundarios que permiten una señalización residual, como la interacción del factor NGF con el receptor p75. Este receptor interactúa con NGF con una afinidad relativamente baja. No obstante, su coexpresión con TrkA genera sitios de unión de alta afinidad, modificando la señalización. Además, se ha demostrado que p75 aumenta la afinidad y especificidad de unión del NGF a TrkA (Toni et al., 2014).

El inhibidor ANA-12 demostró tener un impacto en la inhibición de TrkB, donde indujo la disminución de la longitud, sin embargo, no tan notorio como el de NGF. La capacidad inhibidora de ANA-12 observada en este estudio es consistente con los resultados de Cazorla et al., (2011), quienes demostraron que su administración reduce significativamente la diferenciación celular, con una afinidad del 20% y un porcentaje de diferenciación del 40%. Estos valores son comparables con los obtenidos en el presente estudio (10.52%), considerando que Cazorla et al., (2011), emplearon una concentración de 1 μ M en células PC-12, mientras que en este estudio se utilizó una concentración de 5 μ M. Sin embargo, esto nos indica que el BDNF podría activar otras vías de señalización más allá de TrkB, como la vía p75, lo que permite a las células en cierto grado tener crecimiento neurítico (Huang & Reichardt, 2003). De igual forma, el efecto menos pronunciado de ANA-12 podría deberse también a que el BDNF principalmente participa en otras funciones celulares, como la plasticidad sináptica y la supervivencia celular, que no dependen exclusivamente de la elongación neurítica (Bathina & Das, 2015; Colucci-D'amato et al., 2020)

Es claro como la inhibición mediada por GW441756 y ANA-12 refuerza como las vías de señalización que son activadas mediante los receptores TrkA y TrkB desempeñan roles distintos en las células PC-12. Por una parte, la inhibición de TrkA mostró una

reducción drástica del crecimiento neurítico, mientras que la inhibición de TrkB no mostró un impacto tan drástico en la longitud de las neuritas. Este resultado concuerda con estudios previos donde NGF y BDNF, a pesar de pertenecer a la misma familia de neurotrofinas, cada una cuenta con funciones específicas y activan vías moleculares distintas en las neuronas. Mientras que NGF, a través de TrkA, está más relacionado con la diferenciación neuronal y el crecimiento axonal y BDNF, a través de TrkB, podría estar más involucrado en la modulación de la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal (Bathina & Das, 2015; Huang & Reichardt, 2001a).

Una cuestión clave en este estudio, relevante para el desarrollo de terapias de regeneración del SNC, es la presencia de factores neurotróficos como NGF y BDNF entre las proteínas residuales en la dECM. Este estudio sugiere que su administración como factor soluble podría activar los receptores Trk, desencadenando respuestas celulares como la diferenciación neuronal. De esta forma, para evaluar la capacidad de la dECM de activar estos receptores, se emplearon inhibidores específicos de TrkA y TrkB. Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha reportado la inhibición de estos receptores seguida de la estimulación con dECM como factor soluble, lo que resalta la originalidad y relevancia de este enfoque experimental. Los resultados obtenidos tras la inhibición de los receptores TrkA y TrkB en células PC-12 estimuladas con dECM de áreas cerebrales como la corteza, cerebelo y tronco nos muestran interesantes interacciones entre la matriz extracelular descelularizada (dECM) y las vías de señalización mediadas por factores neurotróficos.

Los hallazgos tras la inhibición de TrkA mostraron una diferenciación celular y longitud neurítica similares a las células estimuladas, sugiriendo la ausencia del factor

neurotrófico NGF que cause la diferenciación celular, debido a que no hubo una inhibición significativa al administrar GW441756 dirigido para TrkA, sin embargo, no se descarta que la activación de TrkA continúa siendo esencial para impulsar el crecimiento neurítico. La inhibición del receptor TrkB mediante ANA-12, tuvo los resultados más significativos en comparación con la inhibición de TrkA. Las células que fueron inhibidas con ANA-12 y luego estimuladas con el factor soluble de dECM tuvieron una disminución en el porcentaje de diferenciación celular y la longitud de las neuritas. Este suceso sugiere que puede haber BDNF en la dECM interactuando con los receptores TrkB de las células PC-12, provocando el crecimiento neurítico. No obstante, debido a la variabilidad del comportamiento celular, la inhibición no fue total, lo que nos sugiere que los otros elementos en la dECM pueden interactuar sinérgicamente con TrkB o provocan la diferenciación neuronal mediante rutas alternativas (Hosomi et al., 2003).

La comparación entre la inhibición de TrkA (activada por NGF) y TrkB (activada por BDNF) en células estimuladas con dECM, se observó que la inhibición de TrkA (mediante GW441756) no afectó significativamente la longitud neurítica en comparación con las células estimuladas con dECM. En cambio, la inhibición de TrkB (mediante ANA-12) resultó en una disminución significativa en la longitud de las neuritas, lo que nos sugiere que los efectos de la dECM sobre la diferenciación neuronal podrán estar más influenciada por la señalización mediada por TrkB que por TrkA. Este dato es interesante, ya que indica que las señales presentes en la dECM podrían interactuar preferentemente con las rutas de señalización activadas por BDNF,

proteína descrita por la literatura como uno de los elementos fundamentales en la matriz extracelular cerebral (Akhtar et al., 2018)

Incluso en la presencia de inhibidores la capacidad de la dECM para estimular el crecimiento neuronal estuvo evidenciada. Esto puede ser debido a que la dECM actúa no solo a través de NGF y BDNF, sino también mediante otras moléculas o vías de señalización presentes en la matriz, como lamininas, colágenos o glicoproteínas que también influyen en el crecimiento y diferenciación neuronal (Edgar, 1985; Turan Sorhun et al., 2023). Esto simplemente, exalta lo complejo que son las interacciones entre las células y su entorno extracelular, y demuestra que la dECM brinda un entorno favorable para la regeneración neuronal, resaltando la importancia de TrkA y TrkB en estos procesos.

Es importante destacar que la modulación de la diferenciación celular en este estudio se evaluó exclusivamente para los factores neurotróficos NGF y BDNF. La exploración de otros factores neurotróficos, como NT-3 y NT-4, junto con la inhibición de sus receptores específicos e incluso la evaluación del receptor de baja afinidad p75, permitiría una comprensión más profunda de las interacciones complejas dentro de la matriz extracelular y, por lo tanto, el desarrollo de terapias específicas de regeneración.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una matriz extracelular descelularizada citocompatible con PC-12.
- Se obtuvieron cultivos viables del linaje celular PC-12 como modelo unidireccional de estudio.
- La estimulación con NGF y BDNF en células PC-12 promueve la diferenciación a linaje tipo neurona.
- La estimulación con matriz extracelular descelularizada (Corteza, Cerebelo y Tronco), promueve la diferenciación y crecimiento neurítico en PC-12.
- La inhibición de receptores Trk, GW441756 y ANA-12, reducen la diferenciación en PC-12, tras la administración de NGF y BDNF respectivamente.
- La inhibición de receptores Trk, modulan la actividad de las PC-12 tras la administración de dECM influyendo en procesos clave como la diferenciación celular.
- Se debe realizar análisis de las proteínas residuales en dECM para evaluar la influencia de las mismas en la diferenciación celular.
- La comprensión de los mecanismos e interacción de los factores neurotróficos y ECM, es la base para el desarrollo de terapias y tratamientos en enfermedades y lesiones en el SNC.

RECOMENDACIONES

- Evaluar y explorar el uso de combinaciones de inhibidores o la manipulación genética para bloquear rutas compensatorias, con el fin de entender mejor los mecanismos subyacentes, luego de la inhibición de los receptores. Por otro lado, estudios adicionales podrían utilizar modelos primarios de neuronas para verificar si los resultados son consistentes con las observaciones realizadas en las células PC-12.
- Aunque la dECM mostró un claro efecto bioactivo, sería necesario realizar más estudios para determinar los componentes específicos responsables de este efecto. La caracterización más detallada de las moléculas bioactivas, como proteínas, péptidos o glicosaminoglicanos presentes en la dECM, sería clave para entender sus mecanismos de acción. Además, estudios adicionales que analicen los cambios en las rutas de señalización intracelular en respuesta a la dECM permitirían definir mejor cómo este material influye en la diferenciación neuronal. Experimentos en modelos *in vivo* también serían cruciales para evaluar dECM como modulador en el proceso de regeneración en estudios de lesiones nerviosas reales.
- Realizar análisis para detectar y cuantificar el nivel de NGF y BDNF luego de la estimulación con dECM de las áreas cerebelo, corteza y tronco. Explorar otras moléculas con efectos similares que puedan modular los receptores Trk.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abcam. (2023). *Immunocytochemistry and immunofluorescence staining protocol*. Immunocytochemistry and immunofluorescence staining protocol. <https://www.abcam.com/protocols/immunocytochemistry-immunofluorescence-protocol>
- Abe, K. (2000). Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. En *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 20, Número 10, pp. 1393–1408). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/00004647-200010000-00001>
- Agmon, G., & Christman, K. L. (2016). Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds. En *Current Opinion in Solid State and Materials Science* (Vol. 20, Número 4, pp. 193–201). Curr Opin Solid State Mater Sci. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2016.02.001>
- Akhtar, M. H., Hussain, K. K., Gurudatt, N. G., Chandra, P., & Shim, Y. B. (2018). Ultrasensitive dual probe immunosensor for the monitoring of nicotine induced-brain derived neurotrophic factor released from cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 116, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.049>
- Alastra, G., Aloe, L., Baldassarro, V. A., Calzà, L., Cescatti, M., Duskey, J. T., Focarete, M. L., Giacomini, D., Giardino, L., Giraldi, V., Lorenzini, L., Moretti, M., Parmeggiani, I., Sannia, M., & Tosi, G. (2021). Nerve Growth Factor Biodelivery: A Limiting Step in Moving Toward Extensive Clinical Application? En *Frontiers in*

Neuroscience (Vol. 15, p. 695592). Frontiers Media SA.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.695592>

Albaugh, P., Fan, Y., Mi, Y., Sun, F., Adrian, F., Li, N., Jia, Y., Sarkisova, Y., Kreusch, A., Hood, T., Lu, M., Liu, G., Huang, S., Liu, Z., Loren, J., Tuntland, T., Karanewsky, D. S., Seidel, H. M., & Molteni, V. (2012). Discovery of GNF-5837, a selective TRK inhibitor with efficacy in rodent cancer tumor models. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 140–145. <https://doi.org/10.1021/ml200261d>

Alfonsetti, M., D'Angelo, M., & Castelli, V. (2023). Neurotrophic factor-based pharmacological approaches in neurological disorders. En *Neural Regeneration Research* (Vol. 18, Número 6, pp. 1220–1228). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.358619>

Aloe, L., Rocco, M. L., Balzamino, B. O., & Micera, A. (2015). Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. *Current Neuropharmacology*, 13, 294–303.

Alovskaya, A., Alekseeva, T., Phillips, J. B., King, V., & Brown, R. (2007). Fibronectin, Collagen, Fibrin-Components of Extracellular Matrix for Nerve regeneration. *Topics in Tissue Engineering*, 3, 1–27.
http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol3/abstracts/alovskaya_chapter_01.pdf

Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., Bencardino, K., Pizzutilo, E. G., Tosi, F., & Siena, S. (2019). Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer. *Annals of Oncology*, 30(Supplement 8), VIII5–VIII15.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdz383>

- Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., & Siena, S. (2016). NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. En *ESMO Open* (Vol. 1, Número 2). ESMO Open. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2015-000023>
- Ando, E., Higashi, S., Mizokami, A., Watanabe, S., Hirata, M., & Takeuchi, H. (2021). Osteocalcin promotes proliferation, differentiation, and survival of PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *557*, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.146>
- Baiguera, S., Del Gaudio, C., Lucatelli, E., Kuevda, E., Boieri, M., Mazzanti, B., Bianco, A., & Macchiarini, P. (2014). Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. *Biomaterials*, *35*(4), 1205–1214. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.060>
- Balon, K., & Wiatrak, B. (2021). PC12 and THP-1 Cell Lines as Neuronal and Microglia Model in Neurobiological Research. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 3729, *11*(9), 3729. <https://doi.org/10.3390/APP11093729>
- Bapat, A. A., Munoz, R. M., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2016a). Blocking nerve growth factor signaling reduces the neural invasion potential of pancreatic cancer cells. *PLoS ONE*, *11*(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165586>
- Bapat, A. A., Munoz, R. M., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2016b). Blocking nerve growth factor signaling reduces the neural invasion potential of pancreatic cancer cells. *PLoS ONE*, *11*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165586>

- Barbacid, M. (1995). Structural and Functional Properties of the TRK Family of Neurotrophin Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 766(1), 442–458. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb26693.x>
- Barbacid, M., Lamballe, F., Pulido, D., & Klein, R. (1991). The trk family of tyrosine protein kinase receptors. En *BBA - Reviews on Cancer* (Vol. 1072, Números 2–3, pp. 115–127). *Biochim Biophys Acta*. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(91\)90010-I](https://doi.org/10.1016/0304-419X(91)90010-I)
- Barbakadze, T., Kvergelidze, E., Bátor, J., Szeberényi, J., & Mikeladze, D. (2023). 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine Regulates Actin Cytoskeleton Dynamic in The Differentiated PC-12 Cells during Hypoxia through An $\alpha v \beta 3$ Integrin. *Cell Journal*, 25(4), 247–254. <https://doi.org/10.22074/CELLJ.2022.557501.1059>
- Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal*, 1(5), 549–553. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x>
- Basinger, H., & Hogg, J. P. (2023). Neuroanatomy, Brainstem. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544297/>
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical Implications. En *Archives of Medical Science* (Vol. 11, Número 6, pp. 1164–1178). Termedia Publishing. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
- Benarroch, E. E. (2015). Brain-derived neurotrophic factor. *Neurology*, 84(16), 1693–1704. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001507>

- Berg, K. A., & Clarke, W. P. (2018). Making sense of pharmacology: Inverse agonism and functional selectivity. En *International Journal of Neuropsychopharmacology* (Vol. 21, Número 10, pp. 962–977). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy071>
- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. En *Growth Factors* (Vol. 22, Número 3, pp. 123–131). Growth Factors. <https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
- Bondarenko, O., & Saarma, M. (2021). Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: Clinical Trials, Open Challenges and Nanoparticle-Mediated Delivery to the Brain. En *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 15, p. 682597). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.682597>
- Bonneh-Barkay, D., & Wiley, C. A. (2009). Brain extracellular matrix in neurodegeneration. En *Brain Pathology* (Vol. 19, Número 4, pp. 573–585). Brain Pathol. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00195.x>
- Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. En *Journal of Pathology* (Vol. 200, Número 4, pp. 423–428). J Pathol. <https://doi.org/10.1002/path.1437>
- Brown, M., Li, J., Moraes, C., Tabrizian, M., & Li-Jessen, N. Y. K. (2022). Decellularized extracellular matrix: New promising and challenging biomaterials for regenerative medicine. En *Biomaterials* (Vol. 289). Biomaterials. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121786>

- Cazorla, M., Prémont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C., & Rognan, D. (2011). Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(5), 1846–1857. <https://doi.org/10.1172/JCI43992>
- Chakrapani, S., Eskander, N., De Los Santos, L. A., Omisore, B. A., & Mostafa, J. A. (2020). Neuroplasticity and the Biological Role of Brain Derived Neurotrophic Factor in the Pathophysiology and Management of Depression. *Cureus*, *12*(11), e11396. <https://doi.org/10.7759/cureus.11396>
- Chaurasiya, N. D., Shukla, S., & Tekwani, B. L. (2017). A Combined In Vitro Assay for Evaluation of Neurotrophic Activity and Cytotoxicity. *SLAS Discovery*, *22*(6), 667–675. <https://doi.org/10.1177/2472555217698677>
- Chelyshev, Y. A., Kabdesh, I. M., & Mukhamedshina, Y. O. (2022). Extracellular Matrix in Neural Plasticity and Regeneration. En *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 42, Número 3, pp. 647–664). Cell Mol Neurobiol. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00986-0>
- Cocco, E., Scaltriti, M., & Drilon, A. (2018). NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. En *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 15, Número 12, pp. 731–747). Nat Rev Clin Oncol. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0113-0>
- Collection, A. T. C. (2022). *PC-12 - CRL-1721 | ATCC*. <https://www.atcc.org/products/crl-1721>
- Colucci-D'amato, L., Speranza, L., & Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration

and brain cancer. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 20, pp. 1–29). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21207777>

Cowan, W. M. (2001). Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: The path to the discovery of nerve growth factor. En *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 24, pp. 551–600). Annu Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.551>

Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. En *Biomaterials* (Vol. 32, Número 12, pp. 3233–3243). Biomaterials. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>

Crapo, P. M., Medberry, C. J., Reing, J. E., Tottey, S., van der Merwe, Y., Jones, K. E., & Badylak, S. F. (2012). Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(13), 3539–3547. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.044>

Crapo, P. M., Tottey, S., Slivka, P. F., & Badylak, S. F. (2014). Effects of biologic scaffolds on human stem cells and implications for CNS tissue engineering. *Tissue Engineering - Part A*, 20(1–2), 313–323. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0186>

Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., McMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D., & Phillips, H. S. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*, 76(6), 1001–1011. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90378-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90378-6)

- Cunningham, M. E., & Greene, L. A. (1998). A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO Journal*, 17(24), 7282–7293.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7282>
- Das, K. P., Freudenrich, T. M., & Mundy, W. R. (2004). Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: A comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(3), 397–406.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.02.006>
- Deinhardt, K., & Chao, M. V. (2014). Trk receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 220, 103–119. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_5
- Dequach, J. A., Yuan, S. H., Goldstein, L. S. B., & Christman, K. L. (2011). Decellularized porcine brain matrix for cell culture and tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering - Part A*, 17(21–22), 2583–2592.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0724>
- Di Donato, M., Bilancio, A., D'Amato, L., Claudiani, P., Oliviero, M. A., Barone, M. V., Auricchio, A., Appella, E., Migliaccio, A., Auricchio, F., & Castoria, G. (2015). Cross-talk between androgen receptor/filamin A and TrkA regulates neurite outgrowth in PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 26(15), 2858–2872.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E14-09-1352>
- Dityatev, A., & Schachner, M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(6), 456–468.
<https://doi.org/10.1038/nrn1115>

- Edgar, D. (1985). Nerve growth factors and molecules of the extracellular matrix in neuronal development. *Journal of Cell Science*, SUPPL. 3(Supplement_3), 107–113. https://doi.org/10.1242/jcs.1985.supplement_3.11
- Fan, H., Duan, H., Hao, P., Gao, Y., Zhao, W., Hao, F., Li, X., & Yang, Z. (2022). Cellular regeneration treatments for traumatic brain injury. En *Medicine in Novel Technology and Devices* (Vol. 16, p. 100182). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100182>
- Fariñas, I., Yoshida, C. K., Backus, C., & Reichardt, L. F. (1996). Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron*, 17(6), 1065–1078. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80240-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80240-8)
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195. <https://doi.org/10.1242/JCS.023820>
- Fujii, D. K., Massaglia, S. L., Savion, N., & Gospodarowicz, D. (1982). Neurite outgrowth and protein synthesis by PC12 cells as a function of substratum and nerve growth factor. *Journal of Neuroscience*, 2(8), 1157–1175. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.02-08-01157.1982>
- Fujita, K., Lazarovici, P., & Guroff, G. (1989). Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. En *Environmental Health Perspectives* (Vol. 80, pp. 127–142). <https://doi.org/10.1289/ehp.8980127>
- Fursa, G. A., Andretsova, S. S., Shishkina, V. S., Voronova, A. D., Karsuntseva, E. K., Chadin, A. V., Reshetov, I. V., Stepanova, O. V., & Chekhonin, V. P. (2024). The

Use of Neurotrophic Factors as a Promising Strategy for the Treatment of Neurodegenerative Diseases (Review). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 177(4), 517–527. <https://doi.org/10.1007/s10517-024-06218-5>

Gilpin, A., & Yang, Y. (2017). Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. En *BioMed Research International* (Vol. 2017, p. 9831534). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>

Golebiowska, A. A., Intravaia, J. T., Sathe, V. M., Kumbar, S. G., & Nukavarapu, S. P. (2024). Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects. En *Bioactive Materials* (Vol. 32, pp. 98–123). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.09.017>

Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2013). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 15, 117–136. https://doi.org/10.1007/7854_2012_231

Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2424–2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>

Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1982). PC12 Pheochromocytoma Cultures in *Neurobiological Research* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-008303-9.50016-5>

- Gupta, A., Galletti, J. G., Yu, Z., Burgess, K., & de Paiva, C. S. (2022). A, B, C's of Trk Receptors and Their Ligands in Ocular Repair. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 22, p. 14069). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232214069>
- Han, F., Wang, J., Ding, L., Hu, Y., Li, W., Yuan, Z., Guo, Q., Zhu, C., Yu, L., Wang, H., Zhao, Z., Jia, L., Li, J., Yu, Y., Zhang, W., Chu, G., Chen, S., & Li, B. (2020). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. En *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8, p. 83). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083>
- Han, S. Y. (2021). Trk inhibitors: Tissue-agnostic anti-cancer drugs. En *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Número 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ph14070632>
- Harrill, J. A., & Mundy, W. R. (2011). Quantitative assessment of neurite outgrowth in PC12 cells. *Methods in Molecular Biology*, 758, 331–348. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3_23
- Hartmann, M., Heumann, R., & Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO Journal*, 20(21), 5887–5897. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5887>
- Hastings, J. F., Skhinas, J. N., Fey, D., Croucher, D. R., & Cox, T. R. (2019). The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. En *British Journal of Pharmacology* (Vol. 176, Número 1, pp. 82–92). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.14195>

Herculano-Houzel, S. (2012). The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 109, Número SUPPL.1, pp. 10661–10668). National Academy of Sciences.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1201895109>

Hernández-Echeagaray, E. (2020). Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission. En *Vitamins and Hormones* (Vol. 114, pp. 71–89). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.04.008>

Hinson, J., Raven, P., & Chew, S. (2010). RECEPTORS AND HORMONE ACTION. En *The Endocrine System* (pp. 15–26). Churchill Livingstone.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-3372-8.00002-1>

Hoshiba, T., Chen, G., Endo, C., Maruyama, H., Wakui, M., Nemoto, E., Kawazoe, N., & Tanaka, M. (2016). Decellularized extracellular matrix as an in vitro model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. En *Stem Cells International* (Vol. 2016, Número 1, p. 6397820). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1155/2016/6397820>

Hosomi, S., Yamashita, T., Aoki, M., & Tohyama, M. (2003). The p75 receptor is required for BDNF-induced differentiation of neural precursor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(4), 1011–1015.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00077-9)

- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001a). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001b). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. En *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 24, pp. 677–736). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 72, pp. 609–642). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Ibáñez, C. F. (1995). Neurotrophic factors: From structure-function studies to designing effective therapeutics. En *Trends in Biotechnology* (Vol. 13, Número 6, pp. 217–227). [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88949-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88949-0)
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1897, pp. 299–311). NIH Public Access. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Javed, K., & Lui, F. (2018). Neuroanatomy, Cerebral Cortex. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537247/>
- Jiang, L., Su, H., Keogh, J. M., Chen, Z., Henning, E., Wilkinson, P., Goodyer, I., Sadaf Farooqi, I., & Rui, L. (2018). Neural deletion of *Sh2b1* results in brain growth retardation and reactive aggression. *FASEB Journal*, 32(4), 1830–1840. <https://doi.org/10.1096/fj.201700831R>

- Jimshelishvili, S., & Dididze, M. (2019). Neuroanatomy, Cerebellum. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538167/>
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., Vynios, D. H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C. E. H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N. A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V., & Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS Journal*, *288*(24), 6850–6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>
- Karliner, J., & Merry, D. E. (2023a). Differentiating PC12 cells to evaluate neurite densities through live-cell imaging. *STAR Protocols*, *4*(1), 101993. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101993>
- Karliner, J., & Merry, D. E. (2023b). Differentiating PC12 cells to evaluate neurite densities through live-cell imaging. *STAR Protocols*, *4*(1), 101993. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101993>
- Kassas, N., Tryoen-Tóth, P., Corrotte, M., Thahouly, T., Bader, M. F., Grant, N. J., & Vitale, N. (2012). Genetically Encoded Probes for Phosphatidic Acid. En *Methods in Cell Biology* (Vol. 108). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386487-1.00020-1>
- Kim, S. H., Turnbull, J., & Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. En *Journal of Endocrinology* (Vol. 209, Número 2, pp. 139–151). J Endocrinol. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>

- Kirkpatrick, C. A., Dimitroff, B. D., Rawson, J. M., & Selleck, S. B. (2004). Spatial regulation of wingless morphogen distribution and signaling by Dally-like protein. *Developmental Cell*, 7(4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.004>
- Kjellén, L., & Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: Structures and interactions. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 60, pp. 443–475). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.002303>
- Kresse, H., & Schnherr, E. (2001). Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. En *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 189, Número 3, pp. 266–274). J Cell Physiol. <https://doi.org/10.1002/jcp.10030>
- Kreuger, J., Perez, L., Giraldez, A. J., & Cohen, S. M. (2004). Opposing activities of Dally-like glypican at high and low levels of wingless morphogen activity. *Developmental Cell*, 7(4), 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.005>
- Lam, D., Enright, H. A., Cadena, J., Peters, S. K. G., Sales, A. P., Osburn, J. J., Soccia, D. A., Kulp, K. S., Wheeler, E. K., & Fischer, N. O. (2019). Tissue-specific extracellular matrix accelerates the formation of neural networks and communities in a neuron-glia co-culture on a multi-electrode array. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40128-1>
- Lee, F. S., Kim, A. H., Khursigara, G., & Chao, M. V. (2001). The uniqueness of being a neurotrophin receptor. En *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 11, Número 3, pp. 281–286). Curr Opin Neurobiol. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00209-9)

- Levy, Y. S., Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2012). Therapeutic potential of neurotrophic factors in neurodegenerative diseases. En *BioDrugs* (Vol. 19, Número 2, pp. 97–127). Springer. <https://doi.org/10.2165/00063030-200519020-00003>
- Li, J., Sun, K., Muroi, M., Gao, L., Chang, Y. T., Osada, H., Xiang, L., & Qi, J. (2019). Cucurbitacin B induces neurogenesis in PC12 cells and protects memory in APP/PS1 mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(9), 6283–6294. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14514>
- Lindholm, P., Voutilainen, M. H., Laurén, J., Peränen, J., Leppänen, V. M., Andressoo, J. O., Lindahl, M., Janhunen, S., Kalkkinen, N., Timmusk, T., Tuominen, R. K., & Saarna, M. (2007). Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature*, 448(7149), 73–77. <https://doi.org/10.1038/nature05957>
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. En *Journal of Cell Biology* (Vol. 196, Número 4, pp. 395–406). J Cell Biol. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>
- Ludwig, P. E., & Varacallo, M. (2023). Neuroanatomy, Neurons. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441977/>
- Maisonpierre, P., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N., Furth, M., Lindsay, R., & Yancopoulos, G. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, 247(4949), 1446–1451. <https://doi.org/10.1126/science.247.4949.1446>

- Maldonado, K. A., & Alsayouri, K. (2023). Physiology, Brain. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551718/>
- Manou, D., Caon, I., Bouris, P., Triantaphyllidou, I. E., Giaroni, C., Passi, A., Karamanos, N. K., Vigetti, D., & Theocharis, A. D. (2019). The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues. *Methods in Molecular Biology*, 1952, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9133-4_1
- Martin, T. F. J., & Grishanin, R. N. (2003). PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods in Cell Biology*, 2003(71), 267–286. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(03\)01012-4](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(03)01012-4)
- Merighi, A. (2024). Brain-Derived Neurotrophic Factor, Nociception, and Pain. En *Biomolecules* (Vol. 14, Número 5, p. 539). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biom14050539>
- Moszczynski, A. J., Volkening, K., & Strong, M. J. (2020). Neurofilament Immunohistochemistry Followed by Luxol Fast Blue, for Staining Axons and Myelin in the Same Paraffin Section of Spinal Cord. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 28(7), 562–565. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000814>
- Mungenast, L., Nieminen, R., Gaiser, C., Faia-Torres, A. B., Rühle, J., & Suter-Dick, L. (2023). Electrospun decellularized extracellular matrix scaffolds promote the regeneration of injured neurons. *Biomaterials and Biosystems*, 11, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2023.100081>

- Naidu, M. (2009). The role of cells, neurotrophins, extracellular matrix and cell surface molecules in peripheral nerve regeneration. *The Malaysian journal of medical sciences* : *MJMS*, *16*(2), 10–14. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3336171/>
- Nakagawara, A., Liu, X. G., Ikegaki, N., White, P. S., Yamashiro, D. J., Nycum, L. M., Biegel, J. A., & Brodeur, G. M. (1995). Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics*, *25*(2), 538–546. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80055-Q](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80055-Q)
- Nakamura, N., Kimura, T., & Kishida, A. (2017). Overview of the Development, Applications, and Future Perspectives of Decellularized Tissues and Organs. En *ACS Biomaterials Science and Engineering* (Vol. 3, Número 7, pp. 1236–1244). ACS Biomater Sci Eng. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00506>
- Neishabouri, A., Soltani Khaboushan, A., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A. M., & Majidi Zolbin, M. (2022). Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. En *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 10, p. 805299). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299>
- Nicholson, C., & Syková, E. (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences*, *21*(5), 207–215. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01261-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01261-2)
- Nie, X., & Wang, D. A. (2018). Decellularized orthopaedic tissue-engineered grafts: Biomaterial scaffolds synthesised by therapeutic cells. En *Biomaterials Science*

(Vol. 6, Número 11, pp. 2798–2811). *Biomater Sci.*
<https://doi.org/10.1039/c8bm00772a>

Paris, A. J., Hayer, K. E., Oved, J. H., Avgousti, D. C., Toulmin, S. A., Zepp, J. A., Zacharias, W. J., Katzen, J. B., Basil, M. C., Kremp, M. M., Slamowitz, A. R., Jayachandran, S., Sivakumar, A., Dai, N., Wang, P., Frank, D. B., Eisenlohr, L. C., Cantu, E., Beers, M. F., ... Worthen, G. S. (2020). STAT3–BDNF–TrkB signalling promotes alveolar epithelial regeneration after lung injury. *Nature Cell Biology*, 22(10), 1197–1210. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0569-x>

Patapoutian A, & Reichardt LF. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action
Patapoutian and Reichardt 273 Trk-mediated signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 272–280.

Rauch, U. (2007). Brain matrix: Structure, turnover and necessity. *Biochemical Society Transactions*, 35(4), 656–660. <https://doi.org/10.1042/BST0350656>

Razavi, S., Nazem, G., Mardani, M., Esfandiari, E., Salehi, H., & Esfahani, S. Z. (2015). Neurotrophic factors and their effects in the treatment of multiple sclerosis. *Advanced Biomedical Research*, 4(1), 53. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.151570>

Reginensi, D., Ortiz, D., Pravia, A., Burillo, A., Morales, F., Morgan, C., Jimenez, L., Dave, K. R., Perez-Pinzon, M. A., & Gittens, R. A. (2020a). Role of Region-Specific Brain Decellularized Extracellular Matrix on in Vitro Neuronal Maturation. *Tissue Engineering - Part A*, 26(17–18), 964–978. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0277>

- Reginensi, D., Ortiz, D., Pravia, A., Burillo, A., Morales, F., Morgan, C., Jimenez, L., Dave, K. R., Perez-Pinzon, M. A., & Gittens, R. A. (2020b). Role of Region-Specific Brain Decellularized Extracellular Matrix on in Vitro Neuronal Maturation. *Tissue Engineering - Part A*, 26(17–18), 964–978. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0277>
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. En *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 361, Número 1473, pp. 1545–1564). The Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Rike, W. A., & Stern, S. (2023). Proteins and Transcriptional Dysregulation of the Brain Extracellular Matrix in Parkinson’s Disease: A Systematic Review. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Número 8, p. 7435). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24087435>
- Rogdakis, T., Charou, D., Latorrata, A., Papadimitriou, E., Tsengenes, A., Athanasiou, C., Papadopoulou, M., Chalikiopoulou, C., Katsila, T., Ramos, I., Prousis, K. C., Wade, R. C., Sidiropoulou, K., Calogeropoulou, T., Gravanis, A., & Charalampopoulos, I. (2022). Development and Biological Characterization of a Novel Selective TrkA Agonist with Neuroprotective Properties against Amyloid Toxicity. *Biomedicines*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030614>
- Ruoslahti, E. (1996). Brain extracellular matrix. En *Glycobiology* (Vol. 6, Número 5, pp. 489–492). Glycobiology. <https://doi.org/10.1093/glycob/6.5.489>

- Sanes, J. (1989). Extracellular Matrix Molecules That Influence Neural Development. *Annual Review of Neuroscience*, 12(1), 491–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.12.1.491>
- Shanmuganathan, B., Suryanarayanan, V., Sathya, S., Narenkumar, M., Singh, S. K., Ruckmani, K., & Pandima Devi, K. (2018). Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic effect of α -bisabolol against A β induced neurotoxicity in PC12 cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1196–1207. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.017>
- Siebert, J. R., & Osterhout, D. J. (2021). Select neurotrophins promote oligodendrocyte progenitor cell process outgrowth in the presence of chondroitin sulfate proteoglycans. *Journal of Neuroscience Research*, 99(4), 1009–1023. <https://doi.org/10.1002/jnr.24780>
- Simsa, R., Rothenbücher, T., Gürbüz, H., Ghosheh, N., Emneus, J., Jenndahl, L., Kaplan, D. L., Bergh, N., Serrano, A. M., & Fogelstrand, P. (2021). Brain organoid formation on decellularized porcine brain ECM hydrogels. *PLoS ONE*, 16(1), e0245685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245685>
- Skaper, S. (2008). The Biology of Neurotrophins, Signalling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7(1), 46–62. <https://doi.org/10.2174/187152708783885174>

- Skaper, S. D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: An Overview. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 846, pp. 1–12). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_1
- Skaper, S. D. (2018). Neurotrophic factors: An overview. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1727, pp. 1–17). *Methods Mol Biol.* https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_1
- Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S. A., & Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature*, *368*(6468), 246–249. <https://doi.org/10.1038/368246a0>
- Soles, A., Selimovic, A., Sbrocco, K., Ghannoum, F., Hamel, K., Moncada, E. L., Gilliat, S., & Cvetanovic, M. (2023). Extracellular Matrix Regulation in Physiology and in Brain Disease. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Número 8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087049>
- Srinivasan, P., Zervantonakis, I. K., & Kothapalli, C. R. (2014). Synergistic effects of 3D ECM and chemogradients on neurite outgrowth and guidance: A simple modeling and microfluidic framework. *PLoS ONE*, *9*(6), e99640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099640>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. En *Neuropsychology Review* (Vol. 20, Número 4, pp. 327–348). *Neuropsychol Rev.* <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>

- Sultan, N., Amin, L. E., Zaher, A. R., Grawish, M. E., & Scheven, B. A. (2021). Dental pulp stem cells stimulate neuronal differentiation of PC12 cells. *Neural Regeneration Research*, 16(9), 1821–1828. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.306089>
- Tao, M., Ao, T., Mao, X., Yan, X., Javed, R., Hou, W., Wang, Y., Sun, C., Lin, S., Yu, T., & Ao, Q. (2021). Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. En *Bioactive Materials* (Vol. 6, Número 9, pp. 2927–2945). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.010>
- Theocharis, A. D., Gialeli, C., Bouris, P., Giannopoulou, E., Skandalis, S. S., Aletras, A. J., Iozzo, R. V., & Karamanos, N. K. (2014). Cell-matrix interactions: Focus on proteoglycan-proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer. En *FEBS Journal* (Vol. 281, Número 22, pp. 5023–5042). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/febs.12927>
- Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2019). Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. En *Matrix Biology* (Vols. 75–76, pp. 220–259). Matrix Biol. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.10.008>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 97, pp. 4–27). Adv Drug Deliv Rev. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>

- Theocharis, A., Gialeli, C., Hascall, V., & Karamanos, N. K. (2012). Extracellular matrix: A functional scaffold. *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, 3–19. <https://doi.org/10.1515/9783110258776.3>
- Thress, K., MacIntyre, T., Wang, H., Whitston, D., Liu, Z. Y., Hoffmann, E., Wang, T., Brown, J. L., Webster, K., Omer, C., Zage, P. E., Zeng, L., & Zweidler-McKay, P. A. (2009). Identification and preclinical characterization of AZ-23, a novel, selective, and orally bioavailable inhibitor of the Trk kinase pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(7), 1818–1827. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0036>
- Toni, T., Dua, P., & Van Der Graaf, P. H. (2014). Systems pharmacology of the NGF signaling through p75 and TrkA receptors. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, 3(12), e150. <https://doi.org/10.1038/psp.2014.48>
- Toti, P., Ciarmela, P., Florio, P., Volpi, N., Occhini, R., & Petraglia, F. (2006). Human placenta and fetal membranes express nerve growth factor mRNA and protein. *Journal of Endocrinological Investigation*, 29(4), 337–341. <https://doi.org/10.1007/BF03344105>
- Turan Sorhun, D., Kuşoğlu, A., & Öztürk, E. (2023). Developing Bovine Brain-Derived Extracellular Matrix Hydrogels: a Screen of Decellularization Methods for Their Impact on Biochemical and Mechanical Properties. *ACS Omega*, 8(40), 36933–36947. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04064>
- Ultsch, M. H., Wiesmann, C., Simmons, L. C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D., Bass, S. H., & De Vos, A. M. (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding

domain of TrkA, TrkB and TrkC. *Journal of Molecular Biology*, 290(1), 149–159.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2816>

Valent, A., Danglot, G., & Bernheim, A. (1997). Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC (NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization. *European Journal of Human Genetics*, 5(2), 102–104. <https://doi.org/10.1159/000484742>

Vera, C., Tapia, V., Vega, M., & Romero, C. (2014). Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. En *Journal of Ovarian Research* (Vol. 7, Número 1, pp. 1–8). BMC. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0082-6>

Vlodavsky, I., Levi, A., Lax, I., Fuks, Z., & Schlessinger, J. (1982). Induction of cell attachment and morphological differentiation in a pheochromocytoma cell line and embryonal sensory cells by the extracellular matrix. *Developmental Biology*, 93(2), 285–300. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90118-X)

Wang, H., Wang, R., Thrimawithana, T., Little, P. J., Xu, J., Feng, Z. P., & Zheng, W. (2014). The Nerve Growth Factor Signaling and Its Potential as Therapeutic Target for Glaucoma. En *BioMed Research International* (Vol. 2014). Biomed Res Int. <https://doi.org/10.1155/2014/759473>

Weier, H. U. G., Rhein, A. P., Shadravan, F., Collins, C., & Polikoff, D. (1995). Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21-q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization

- (FISH), and computer-assisted microscopy. *Genomics*, 26(2), 390–393.
[https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80226-C](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80226-C)
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., & Barg, E. (2020a). PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040958>
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., & Barg, E. (2020b). PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040958>
- Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H., & De Vos, A. M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*, 401(6749), 184–188. <https://doi.org/10.1038/43705>
- Wood, E. R., Kuyper, L., Petrov, K. G., Hunter, R. N., Harris, P. A., & Lackey, K. (2004). Discovery and in vitro evaluation of potent TrkA kinase inhibitors: Oxindole and aza-oxindoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(4), 953–957. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.12.002>
- Xiao, N., & Le, Q. T. (2015). Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. En *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Vol. 64, Número 2, pp. 89–99). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0376-4>
- Xie, D., Deng, T., Zhai, Z., Sun, T., & Xu, Y. (2023). The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. En *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 15, p. 1016559). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1016559>

- Yaldiz, B., Saglam-Metiner, P., & Yesil-Celiktas, O. (2022). Decellularised extracellular matrix-based biomaterials for repair and regeneration of central nervous system. En *Expert Reviews in Molecular Medicine* (Vol. 23). Expert Rev Mol Med. <https://doi.org/10.1017/erm.2021.22>
- Yan, W., Lakkaniga, N. R., Carlomagno, F., Santoro, M., McDonald, N. Q., Lv, F., Gunaganti, N., Frett, B., & Li, H. Y. (2019). Insights into Current Tropomyosin Receptor Kinase (TRK) Inhibitors: Development and Clinical Application. En *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 62, Número 4, pp. 1731–1760). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01092>
- Yilmaz, C., Rogdakis, T., Latorrata, A., Thanou, E., Karadima, E., Papadimitriou, E., Siapi, E., Li, K. W., Katsila, T., Calogeropoulou, T., Charalampopoulos, I., & Alexaki, V. I. (2022). ENT-A010, a Novel Steroid Derivative, Displays Neuroprotective Functions and Modulates Microglial Responses. *Biomolecules*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/biom12030424>
- Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., & Liu, C. (2022). Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. En *Bioactive Materials* (Vol. 10, pp. 15–31). Bioact Mater. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.014>