



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA.**

**TESIS:**

**“Exploración Microfluídica: Un Modelo Mimético para el Análisis de Daño Cerebral y Recuperación con Matrices Extracelulares Descelularizadas”**

**SOLANGEL L. CASTILLO FUENTES**

**4-779-1288**

**ASESOR:**

**DR. DIEGO A. REGINENSI**

**SUMISIÓN DE TESIS COMO PRINCIPAL REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DE LA MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE PANAMÁ.**

**PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ**

**2023**

# AGRADECIMIENTO

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento al Departamento de Biología y Genética Molecular por permitirme ser parte de la Convocatoria para el programa de Maestría en Biología Molecular de la Universidad de Panamá del 2021, y por proveer generosamente el financiamiento para mis estudios, como también, el estipendio de la Convocatoria de los Fondos de Investigación de investigación anual CUF1-2022 por otorgarme financiamiento con la propuesta N° CUF1-2022-CNET-EP-004. Además, quisiera extender mi agradecimiento a la SENACYT por aceptar mi propuesta y otorgarme para la realización de mi investigación y la presentación de mi tesis en la Convocatoria de Nuevos Investigadores 2022 (APY-NI-2022-01).

Quiero aprovechar esta oportunidad para expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor de tesis, Dr. Diego Reginensi, por haber aceptado guiarme a lo largo de mi tesis, a pesar de mi falta de conocimientos iniciales en el campo. Su apoyo y orientación han sido fundamentales en mi desarrollo académico y, sobre todo, personal. Cuando ingresé a su laboratorio, admito que me sentía abrumada y un tanto perdida. Sin embargo, gracias a su paciencia, dedicación y experiencia, he aprendido a ser disciplinada y resiliente en mi trabajo. Sus enseñanzas me han demostrado que, aunque uno pueda enfrentar obstáculos y fracasos en el camino, la clave está en no lamentarse, sino en encontrar la forma de superarlos y así, alcanzar mis objetivos. Su capacidad para transmitir conocimientos y su habilidad para motivarme han sido invaluable. Gracias a usted, he crecido no solo como estudiante, sino también como persona. Aprecio profundamente su compromiso con mi éxito y su disposición para ayudarme a superar los desafíos que he enfrentado a lo largo de esta travesía académica.

Finalmente deseo agradecer a Dios, a mis padres y familiares que siempre están pendiente y dándome palabras de aliento para salir adelante. Los amo

mucho y me siento muy afortunada de ser parte de la familia. Sobre todo, a mi papá Ladislao y mi mamá Bertha, que siempre me llamaban para aconsejarme y decirme que nada es fácil en la vida, que hay que luchar y ser valiente. Que hay que resistir y buscar la forma de resolver sin dañar a nadie. Los amo del cielo a la tierra.

Y a mis compañeros de laboratorio por siempre sacarme una sonrisa, reduciendo el estrés del trabajo. En especial, Andrea Aparicio y Andrea Revete por su ayuda en los procesos de disección y descélularización cerebrales porcinas para la culminación de mi trabajo de grado.

*Solangel Castillo Fuentes*

## DEDICATORIA

**A Dios y familia.**

*“Si no puedes volar entonces corre, si no puedes correr entonces camina, si no puedes caminar entonces arrástrate, pero sea lo que hagas, sigue moviéndote hacia adelante.”*

*Martin Luther King*

# ÍNDICE

## Contenido

|   |      |
|---|------|
| <b>AGRADECIMIENTO</b> .....   | ii   |
| <b>DEDICATORIA</b> .....  | iv   |
| <b>ÍNDICE GENERAL</b> .....   | v    |
| <b>LISTA DE GRÁFICAS Y FIGURAS</b> .....  | viii |
| <b>LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS</b> .....  | xiii |
| <b>RESUMEN</b> .....  | 1    |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 2    |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 3    |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....   | 5    |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....   | 5    |
| 1.1. Antecedentes .....   | 6    |
| 1.1.2. Principio de la Microfluídica .....  | 6    |
| 1.1.3. Sistemas de Microfluídica en Estudios Neuronales .....                               | 10   |
| 1.1.4. Tipos de Sistemas de Microfluídica para estudios en diferentes tipos celulares ..... | 12   |
| 1.1.5. Aplicaciones de los Sistemas de Microfluídica en Daño Cerebrales ..                  | 14   |
| 1.2. Aplicaciones regenerativas cerebrales: Matrices Cerebrales descclularizadas .....      | 19   |
| 1.2.1. Matrices Descclularizadas: Tejidos Cerebrales .....                                  | 19   |
| 1.2.2. Función de las matrices Descclularizadas en la Plasticidad Neuronal .....            | 21   |
| <b>CAPÍTULO II</b> .....  | 25   |
| <b>PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....                | 25   |
| 2.1. Planteamiento del Problema y Justificación .....                                       | 26   |
| 2.1.1. La incapacidad del Sistema Nervioso Central en Regenerarse .....                     | 26   |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1.2. Impacto Social y Económico de los Daños Cerebrales y enfermedades Neurodegenerativas a Nivel Mundial y en Panamá.....   | 28        |
| 2.1.3. Biomateriales de Matrices extracelulares como respuesta ante daños cerebrales.....  | 29        |
| 2.2. Hipótesis de trabajo .....  | 31        |
| 2.3. Objetivo General y Específicos .....  | 32        |
| 2.3.1. Objetivo General .....  | 32        |
| 2.3.2. Objetivos Específicos: .....  | 32        |
| <b>CAPÍTULO III.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>MARCO TEÓRICO Y REFERENCIAL .....</b>   | <b>34</b> |
| 3.1. Los sistemas de microfluídica son aplicaciones biomédicas para estudios neuronales (soma y axón) y modelos de daños cerebrales a baja densidad celular in vitro ..... | 35        |
| 3.2. Los sistemas de Microfluídica influyen en estudios relacionados a interacción celular en co-cultivos neuronales y gradientes bioquímicos .....                        | 36        |
| 3.3. Las matrices extracelulares cerebrales son consideradas fundamentales para el desarrollo de la actividad sináptica neuronal. 38                                       |           |
| 3.4. El funcionamiento de la matriz extracelular y de la cicatriz glial en enfermedades neurodegenerativas como derrame, traumas cerebrales e Isquemia.....                | 39        |
| <b>CAPÍTULO IV.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>   | <b>42</b> |
| 3.1. Cultivo celular en suspensión y adherencia con la línea celular PC12: .....   | 43        |
| 3.1. Establecimiento de Sistemas Compartimentalizados de Microfluídica en condiciones de cultivo: .....  | 44        |
| 3.1. Caracterización de Membrana Extracelular Cerebral Descelularizada: Corteza, Cerebro y Áreas Remanentes:.....  | 45        |
| 3.1.1. Cuantificación de ADN.....  | 46        |
| 3.1.2. Análisis Microbiológico de Matriz Cerebral Descelularizada:.....  | 47        |
| 3.1.3. Análisis de Proteínas:.....   | 48        |
| 3.1.4. Análisis de glucosaminoglicanos (GAG) y los proteoglicanos: .....   | 48        |

|   |    |
|---|----|
| <b>3.1.5. Western Blot:</b> .....   | 48 |
| <b>3.1.6. Análisis Histológico:</b> .....   | 49 |
| <b>3.1. Modelo de Deprivación de Oxígeno y Glucosa (OGD) para estudio de efecto de recuperación de la Matriz cerebrales en células estimuladas PC12:</b> .....  | 50 |
| <b>3.2. Evaluación de Viabilidad Celular: Estimulación con Matrices Extracelulares Cerebrales descelularizadas y su efecto en recuperación axonal</b> .....   | 51 |
| <b>3.3. Análisis Estadísticos:</b> .....  | 52 |
| <b>Capítulo V</b> .....   | 53 |
| <b>Resultados y Discusión</b> .....   | 53 |
| <b>5.1. Los Sistemas Compartimentalizados de Microfluídica son capaces de mimetizar el ambiente neuronal en co-cultivos y a baja densidad celular.</b> .....  | 54 |
| <b>5.2. Cultivos Celulares De Línea PC12 De feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata: Línea celular para modelos de biomimetismo de daño cerebral con los Sistemas de Microfluídica.</b> ..... | 59 |
| <b>5.3. La Matriz descelularizada del Cerebro porcino: Evaluación morfológica y bioquímica de los procesos de descelularización.</b> .....  | 65 |
| <b>5.3.1. Evaluación Bioquímica:</b> .....  | 65 |
| <b>5.4. Modelo de Daño Cerebrales in vitro: Efecto de la Matriz Cerebral Descelularizada en daño Cerebral.</b> .....  | 73 |
| <b>CAPÍTULO VI</b> .....  | 80 |
| <b>Futuras direcciones de la Investigación</b> .....  | 80 |
| <b>1. Diseño experimental para la Privación de Oxígeno y Glucosa con Células Primarias Neuronales de forma química dentro de los sistemas tripartitos de Microfluídica.</b> .....                     | 81 |
| <b>2. Re-mielinización mediante co-cultivos con precursores de oligodendrocitos durante isquemia química</b> .....  | 81 |
| <b>3. Optimizar un modelo de isquémica con organoides cerebrales para estudio u producción de oligodendrocitos mielinizantes maduros. .</b> ..  | 83 |
| <b>Conclusiones</b> .....   | 84 |
| <b>Referencias Bibliográficas</b> .....   | 86 |

## LISTA DE GRÁFICAS Y FIGURAS

1. **Diagrama A.** Cultivo celular de PC12 en suspensión y en adherencia para prueba en placas de 12 y 96 pocillos y para disociación en caso de cultivos dentro de los sistemas compartimentalizados de microfluídica.
2. **Diagrama B.** Descripción completa del Sistema Compartimentalizado de Microfluídica por parte del distribuidor XONA@chips
3. **Diagrama C.** Esquema completo de flujo de trabajo para la implementación de las matrices celulares descelularizadas porcinas para estimulación celular en condiciones de laboratorio.
4. **Diagrama D.** Evaluación de Privación de Oxígeno y Glucosa (OGD) en células tratadas previamente con el factor NGF (100 ng/ml) y su período de recuperación en intervalos de 8,12,24,48 horas de estimulación con factores neurotróficos y solubles provenientes de matriz extracelular descelularizada cerebral.
5. **Figura 1.** Dispositivos pre-ensablados de XONACHips para estudios neuronales. A) Diseño X150 con doble compartimiento. B) Transparencia y Traslucides del microchip XC150 para tomas microscópicas fluorescentes.
6. **Figura 2.** Sistemas Compartimentalizados de Microfluídica con una longitud de X150 um en los microcanales. A) Diagramas y medidas de las áreas relevantes del microchip: Microcanal (Área de cruce de los axones), Compartimiento axonal de estimulación y compartimiento somal y axonal. B) Compartimientos A y B del microchip (soma y axón) para entendimiento compartimientos principales para estimulaciones futuras.
7. **Figura 3.** Inducción de cultivo de fibroblastos epiteliales (A) dentro de los compartimientos del microchip y mantenimiento como método de viabilidad celular. B) Cuarto día de mantenimiento celular dentro del microchip.
8. **Figura 4.** Crecimiento y mantenimiento de cultivo PC12 A) en suspensión y B) en adhesión con PDL (Con. 0.5 mg/ml). Medio de Cultivo DEMEM/F12, 1% Antibiótico, 15% DHS y 10% FBS.

9. **Figura 5.** Inducción a Diferenciación celular de PC12 con **factor NGF** (Concentración 100 ng/ml). **A)** Tercer día de estimulación con NGF. **B)** Quinto día de estimulación dentro del compartimiento A del microchip.
10. **Figura 6.** Diferenciación a morfología Neuronal con PC12 dentro de los compartimientos somales del Microchip XC150. Para lograr el efecto de cruce de las neuritas en los microcanales, se estimuló con 10 ul de el compartimiento B para el cruce de los axones. **A)** Día 3 de estimulación en compartimiento A. **B)** Día 4 de estimulación en compartimiento A Y B (10 ul de NFG). **C)** Día 5 de estimulación con factor NGF en el compartimiento A. **D)** Día elongación de los axones en la barrera central. **E-F)** Migración celular de neuritas en microcanales.
11. **Figura 7.** Culminación de procesos de Descelularización de la Matriz extracelular cerebral descclularizada porcina. **A)** Partes del cerebro porcino estimadas para el estudio de descclularización de matrices extracelulares: Corteza, Cerebelo y áreas remanentes SIN liofilizar. Resultados por sección NATIVOS: **A)** Corteza, **B)** Cerebelo y **C)** Áreas Remanentes. **DESCELULARIZADOS:** **D)** Corteza, **E)** Cerebelo y **F)** Áreas Remanentes.
12. **Figura 8.** Caracterización y Solubilización de matriz extracelular cerebral descclularizada porcina. **A)** Partes del cerebro porcino estimadas para el estudio de descclularización de matrices extracelulares: Corteza, Cerebelo y áreas remanentes liofilizados. **B)** Preparación de tejidos en medio de cultivo para evaluación microbiológica. **C)** Prueba control Negativo **D)** Resultados de Áreas Remanentes **E)** Corteza **F)** Cerebelo.
13. **Figura 9.** Cuantificación de ADN y Proteínas como método de verificación de procesos de descclularización para estandarización. A) Cuantificación de ADN ( ug/mg) de las tres secciones cerebrales: Corteza, Cerebelo, Áreas Remanentes. Escalera Molecular desde 2500 bp, 1000 bp, 500 bp. B) Cuantificación de proteínas de las subregiones del cerebro. C) Electroforesis genómica a 0.8%. D) Western blot. Análisis de los anticuerpos NeuN. El panel muestra los Descclularizados 1 (Corteza), 2( Cerebelo),3 (Areas Remanentes)

- y los nativos 4 (Corteza), 5 (Cerebelo) y 6 (Áreas Remanentes). Los controles positivos de estos experimentos son las muestras nativas de los tejidos. Los valores de  $p$  significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*) y  $p > 0.001$  (\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis.
- 14. Figura 10.** Evaluación de presencia de los proteoglicanos y GAGs. A) Cuantificación de GAGs (ug/ml). Se tomó como control el tejido nativo para comparación con el tejido descelularizado. **B) Tinciones con Alcian Blue y H&E:** A) Corteza Nativa. B) Corteza Descelularizada, C) Cerebelo Nativo. D) Cerebelo Descelularizado. E) Áreas Remanente Nativa. F) Áreas Remanentes Descelularizadas. Los valores de  $p$  significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis.
- 15. Figura 11.** Histología de Tejidos nativos de matriz extracelular: Nativa y Descelularizada. Tinciones con Hematoxilina & Eosina: A-B) Corteza Nativa, C) Corteza Descelularizada. D-E) Cerebelo Nativo, F) Cerebelo Descelularizado. G-H) Áreas Remanentes. I) Áreas Remanentes Descelularizadas. Tinciones con Azul de Coomassie: J-K) Corteza Nativa. L) Corteza Descelularizada. M-N) Cerebelo Nativo. O) Cerebelo Descelularizado. P-Q) Áreas Remanentes Nativas. R) Áreas Remanentes Descelularizadas. Escala 200  $\mu\text{m}$ .
- 16. Figura 12.** Histología de Tejidos nativos de matriz extracelular: Nativa y Descelularizada. Tinciones con Luxol Fast Blue: A-B) Corteza Nativa, C) Corteza Descelularizada. D-E) Cerebelo Nativo, F) Cerebelo Descelularizado. G-H) Áreas Remanentes. I) Áreas Remanentes Descelularizadas. Tinciones PAS (Periodic Acid-Schiff): J-K) Corteza Nativa. L) Corteza Descelularizada. M-N) Cerebelo Nativo. O) Cerebelo Descelularizado. P-Q) Áreas Remanentes Nativas. R) Áreas Remanentes Descelularizadas. Escala 200  $\mu\text{m}$ .
- 17. Figura 13.** Evaluación de viabilidad celular con la línea PC12. A) Gráfico de barras con Control (Cultivo en Normoxia con PC12 tratadas con NGF) y las tres subregiones evaluadas: Corteza, Cerebelo y Áreas Remanentes (Sólo

- tejidos descelularizados). B) Control: PC12 tratadas con NGF (después de 48 horas).C) PC12 tratadas con Corteza descelularizada. D) PC12 tratadas con Cerebelo descelularizado. E) PC12 tratadas con áreas remanentes descelularizadas. El registro fotográfico fue tomado después de la incubación con MECd en 48 horas. Los valores de p significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis. *Participación en figura 9 del artículo “Exploring region-specific brain decellularized scaffold and their role in oxygen and glucose deprivation recovery”, con el autor principal Dr. Diego Reginensi.*
18. **Figura 14.** Evaluación de viabilidad celular después de daño cerebral en modelo celular PC12. A) Diagrama completo de diseño experimenta en normoxia y en hipoxia. B) Gráfico de barras con Controles, DOG (6 horas) y los resultados de la recuperación evaluando: Factores neurotróficos ( NGF y BDNF) y factures de matriz descelularizada cerebral ( Corteza, Cerebelo y áreas remanentes del cerebro). Los valores de p significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis. *Participación en figura 9 del artículo “Exploring region-specific brain decellularized scaffold and their role in oxygen and glucose deprivation recovery”, con el autor principal Dr. Diego Reginensi.*
19. **Figura 15.** Evaluación de recuperación en viabilidad celular después de daño cerebral en modelo celular PC12. A) Diagrama completo de diseño experimenta en normoxia y en hipoxia. B) Gráfico de barras con Controles, DOG (6 horas) y los resultados de la recuperación evaluando: Factores neurotróficos ( NGF y BDNF) y factures de matriz descelularizada cerebral ( Corteza, Cerebelo y áreas remanentes del cerebro). Los valores de p significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis. *Participación en figura 9 del artículo “Exploring region-specific brain decellularized scaffold and their role in oxygen and glucose deprivation recovery”, con el autor principal Dr. Diego Reginensi.*

20. **Figura 16.** Diferenciación de Células Mesenquimales Umbilicales humanas con estimulación de 6 días con Matriz extracelular de corteza Descelularizados (**Figura A**) comparando con una diferenciación con factores neurotróficos (**Figura B-C**) : NGF/BDNF.

## LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

|  |   |
|--|---|
| <b><u>2D</u></b>                       | Dimensional                                     |
| <b><u>3D</u></b>                       | Tridimensional                                  |
| <b><u>ANOVA</u></b>                    | Análisis de Varianza                            |
| <b><u>BSA</u></b>                      | Serum Albumina Bovina                           |
| <b><u>BDNF</u></b>                     | Factor de crecimiento derivado del cerebro      |
| <b><u>DOG</u></b>                      | Deprivación de Oxígeno y Glucosa                |
| <b><u>DOG/R</u></b>                    | Deprivación de Oxígeno y Glucosa/ Reperfusión   |
| <b><u>DOG/RO</u></b>                   | Deprivación de Oxígeno y Glucosa/ Reoxigenación |
| <b><u>H&amp;E</u></b>                  | tinción con hematoxilina y eosina               |
| <b><u>MCF</u></b>                      | Microfluídos                                    |
| <b><u>MEC</u></b>                      | Matriz Extracelular                             |
| <b><u>MECd</u></b>                     | Matriz Extracelular Descelularizada             |
| <b><u>MSC</u></b>                      | Células Madre Mesenquimales                     |
| <b><u>NGF</u></b>                      | El factor de crecimiento nervioso               |
| <b><u>NSC</u></b>                      | Células Madre Nerviosas                         |
| <b><u>RLO</u></b>                      | Radicales libre de Oxígeno                      |
| <b><u>OPCs</u></b>                     | Progenitores celulares de Oligodendrocitos      |
| <b><u>PDGFR<math>\alpha</math></u></b> | Platelet-derived growth factor receptor alpha   |
| <b><u>PAS</u></b>                      | Tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff)           |
| <b><u>PC12 Células</u></b>             | feocromocitoma                                  |
| <b><u>SNC</u></b>                      | Sistema Nervioso Central                        |
| <b><u>SNP</u></b>                      | Sistema Nerviosos Periféricos                   |
| <b><u>SC</u></b>                       | Stem Cells                                      |
| <b><u>LTC</u></b>                      | Lesiones Traumáticas cerebrales                 |

## RESUMEN

El estudio se basa en explorar el potencial de las matrices extracelulares descelularizadas cerebrales en sistemas compartimentalizados de microfluídica en condiciones *in vitro* con un modelo celular de PC12. El objetivo principal es establecer una plataforma *in vitro* capaz de mimetizar in *in vitro* el daño cerebral, específicamente, la privación de oxígeno y glucosa durante un período crítico de 6 horas. La microfluídica permite la creación de entornos experimentales altamente controlados que imitan las condiciones fisiológicas del cerebro. Esta tecnología proporciona una plataforma valiosa para estudiar cómo las matrices extracelulares descelularizadas cerebrales interactúan con las células neuronales y cómo pueden utilizarse en aplicaciones clínicas futuras.

A la vez, se analizó el efecto reparador de los matices extracelulares cerebrales descelularizadas. En la última década, las matrices extracelulares han sido abarcadas como un biomaterial nuevo para la creación de hidrogeles, encapsulamiento de fármacos, bioimpresión 2D y 3D y, además, empleados en la diferenciación celular de las células madre porque proporcionan un entorno propicio para la regeneración y el crecimiento celular, lo que sugiere un potencial terapéutico prometedor en el tratamiento de lesiones cerebrales.

Nuestro enfoque es integral para comprender y utilizar las matrices extracelulares descelularizadas cerebrales en la recuperación después de daños cerebrales, con un énfasis en la microfluídica como una herramienta fundamental para la investigación en el sistema nervioso central. Los hallazgos de este estudio tienen el potencial de abrir nuevas perspectivas en el campo de la neurociencia y la terapia de lesiones cerebrales.

**Palabras claves:** Sistemas de Microfluídica Compartimentalizados, Privación de Oxígeno-Glucosa, Daño cerebral, Células PC12, Proceso de Descelularización y Matrices Extracelulares Cerebrales.

## ABSTRACT

The study is based on exploring the potential of decellularized brain extracellular matrices in compartmentalized microfluidic systems under in vitro conditions using a PC12 cell model. The main objective is to establish an in vitro platform capable of mimicking brain damage, specifically oxygen and glucose deprivation during a critical 6-hour period. Microfluidics allows the creation of highly controlled experimental environments that mimic the physiological conditions of the brain. This technology provides a valuable platform for studying how decellularized brain extracellular matrices interact with neuronal cells and how they can be used in future clinical applications.

Simultaneously, the repairing effect of decellularized brain extracellular matrices will be analyzed. Over the past decade, extracellular matrices have been explored as a novel biomaterial for creating hydrogels, drug encapsulation, 2D and 3D bio-printing, and have also been employed in the differentiation of stem cells because they provide a conducive environment for cellular regeneration and growth, suggesting promising therapeutic potential in the treatment of brain injuries.

Our approach is comprehensive in understanding and utilizing decellularized brain extracellular matrices in brain injury recovery, with an emphasis on microfluidics as a fundamental tool for research in the central nervous system. The findings of this study have the potential to open new perspectives in the field of neuroscience and brain injury therapy.

**Keywords:** Compartmentalized System of Microfluidics, Oxygen-Glucose Deprivation, PC12 cells, decellularization Process, Brain injury and Extracellular matrix.

## INTRODUCCIÓN

En Panamá, se ha dado un incremento de un 66% de enfermedades neurológicas tanto en las poblaciones rurales, urbanas según los registros del ENSPA del 2019, lo que despierta una inquietud en el área de salud. Por lo general, no hay curas, tratamientos clínicos o investigaciones enfocadas a estas enfermedades del Sistema Nervioso Central que contribuyan a la disminución de sus afectos, y así, mejorar y prolongar la existencia de los/as panameños que padecen de las mismas. *El principal problema radica en la dificultad de biomimetizar el ambiente neuronal del cerebro in vitro* para su estudio y replicación. A lo largo de la ciencia médica, la utilización de los modelos animales ha sido de gran beneficio para estudios preclínicos in vitro e in vivo y la resolución de terapias. A pesar de todo, estos modelos de experimentación Animal presentan limitaciones ya que No todos los resultados obtenidos en la experimentación con animales son extrapolables al mundo humano, atentan contra los derechos animales universales, costes elevados y lentitud en el desarrollo. Pero como la tecnología ha avanzado a lo largo de los años, han surgido dispositivos Biomédicos que tienen la eficiencia de simular ambientes celulares para estudios profundos de mecanismos y creación de fármacos para contrarrestar los efectos de estas enfermedades neurológicas del SNC. *Siendo así el objetivo primordial en esta investigación utilizar plataformas de sistemas compartimentalizados de microfluídica para el estudio del biomimetismo de daño neuronal y el efecto regenerativo de biomateriales provenientes de matrices extracelulares descelularizadas.* Los Dispositivos de Microfluídica (MCFs) utilizan técnicas de microfabricación, como polímeros de polidimetilsiloxano, para producir microdispositivos con canales capaces de manipular volúmenes pequeños de fluidos con precisión en el rango de 0.1  $\mu\text{m}$  - 1 mm. Estos dispositivos de microfluídos son ampliamente empleados por sus ventajas en biocompatibilidad, bajo costo, transparencia óptica, escalabilidad práctica, permeabilidad del gas y

fácil fabricación en las investigaciones in vitro. En el campo de la neurociencia, los dispositivos de microfluidos se han utilizado cada vez más para lograr el control espacio-temporal de microambientes celulares como los del axón y el soma para investigar la elongación del axón, eventos de señalización local, así como interacciones con otras células como oligodendroglía, astrocitos y microglía. En este proyecto se establecerá primeramente un dispositivo de microfluídica compartimentalizado (soma y axón) introducir métodos de regeneración neuronal del SNC y, monitoreo mediante las técnicas de Microscopía e Inmunocitoquímica.

Definitivamente, el uso de estos dispositivos ayudará a impulsar las ciencias tecnológicas en la investigación de una nueva rama de regeneración médica en Panamá e impulsar a nuevos investigadores a la exploración de nuevas herramientas y dispositivos de trabajo.

# **CAPÍTULO I**

# **ANTECEDENTES**

## **1.1. Antecedentes**

### **1.1.2. Principio de la Microfluídica**

Un dispositivo microfluídico se caracteriza principalmente por contar con uno o más canales, de los cuales al menos una dimensión es menor a 1 mm. Estos canales están diseñados para manejar una variedad de fluidos comúnmente encontrados en aplicaciones microfluídicas, como muestras de sangre completa, suspensiones de células bacterianas, soluciones de proteínas o anticuerpos y diversos agentes amortiguadores. “Los dispositivos microfluídicos sirven como herramientas versátiles para llevar a cabo una amplia gama de mediciones, que incluyen la determinación de coeficientes de difusión molecular” (Evans et al., 2014), “viscosidad del fluido” (Zheng et al., 2020), “niveles de pH, coeficientes de química interfacial y cinética de reacciones enzimáticas”. (Lukyanenko et al., 2017).

Más allá de estas mediciones fundamentales establecidas a nivel global, los dispositivos microfluídicos encuentran aplicaciones en una amplia variedad de campos científicos, como la electroforesis capilar (Huang et al. 2008), la focalización isoelectrica (Cui et al., 2005; Das et al., 2006), inmunoensayos (Krauz et al., 2021), citometría de flujo (Gong et al., 2019), inyección de muestras de proteínas para análisis de espectrometría de masas (Ji., et al., 2017), amplificación de PCR (YAMAMOTO et al., 2020), análisis de ADN (Serra et al., 2020), manipulación de células (Li., et al 2021), separación de células (Herrmann et al., 2019), patrones de células (Kashani., et al 2021) y el establecimiento de gradientes químicos (Coluccio et al., 2019). Muchas de estas aplicaciones prometen particularmente en el ámbito del diagnóstico clínico lo que es conveniente para la aprobación de fármacos, particularmente, en humanos.

La utilización de dispositivos microfluídicos en investigaciones biomédicas y en el desarrollo de tecnologías clínicas ofrece varias ventajas distintivas. En

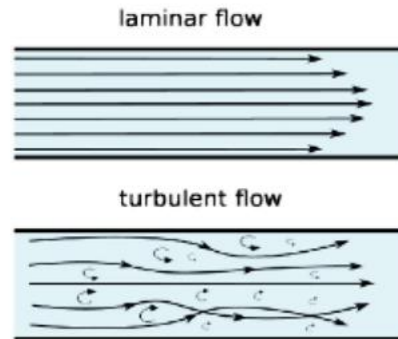
primer lugar, los reducidos volúmenes de fluido dentro de estos canales, generalmente del orden de unos pocos nanolitros, implican un consumo mínimo de reactivos y analitos, lo que es especialmente ventajoso al tratar con materiales costosos. Además, las técnicas de fabricación empleadas en la producción de dispositivos microfluídicos, como se detallará posteriormente, son rentables y adecuadas tanto para la fabricación de dispositivos complejos multiplexados como para la producción a gran escala. Siguiendo principios similares a los de la microelectrónica, la tecnología de microfluídica permite la creación de dispositivos altamente integrados capaces de realizar una multitud de funciones en un solo sustrato de chip.

Una aspiración por la que se emplea tanto la microfluídica a aplicaciones biomédicas es por su ser una herramienta poderosa para el desarrollo de dispositivos clínicos de diagnóstico integrados y portátiles adecuados para su uso en el hogar y en la cabecera, lo que en última instancia agilizaría los laboriosos procedimientos analíticos comúnmente realizados en entornos de laboratorio tradicionales.

El Principio básico de la microfluidica se establece por la caracterización del flujo de un fluido a través de los microcanales, y esta es identificada bajo los números de Reynolds:

$$Re = \frac{LV_{avg}\rho}{\mu}$$

Dentro del contexto de la dinámica de los fluidos en microcanales, existen varios factores clave que influyen en el comportamiento general del flujo. Específicamente, hay elementos como  $L$ , que representa la escala de longitud más adecuada;  $\mu$ , que denota la viscosidad del fluido;  $\rho$ , que representa su densidad; y  $V_{avg}$ , que es la velocidad promedio del flujo. Estos parámetros son extremadamente importantes para comprender cómo se mueve el flujo en los microcanales. En el caso de muchos microcanales, podemos expresar  $L$  como  $4A/P$ , donde  $A$  es el área de la sección transversal del canal y  $P$  es su perímetro mojado.



**Diagrama 1.** Diferencias entre el flujo laminar y el flujo turbulento (Cheng et al., 2022)

Esta relación es un factor crucial que afecta directamente a la dinámica del flujo en estos microcanales. Debido al tamaño reducido de los microcanales, es común que el número de Reynolds ( $Re$ ) sea muy bajo, generalmente por debajo de 100 e incluso a veces inferior a 1. En este rango específico de números de Reynolds, el flujo se caracteriza por ser uniforme y prácticamente no presenta turbulencias. La transición hacia un flujo turbulento suele ocurrir cuando el número de Reynolds supera los 2000. El flujo laminar en los microcanales ofrece una forma predecible para transportar moléculas. Es necesario resaltar, sin embargo, que incluso cuando los valores de Reynolds son menores a 100, algunos fenómenos relacionados con el impulso, como la separación del flujo, pueden seguir ocurriendo, lo cual destaca las complicaciones de la dinámica del flujo en microcanales.

Tradicionalmente, el flujo microfluídico se lleva a cabo en canales cerrados con dimensiones transversales del orden de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ , utilizando diferentes técnicas para mantener un flujo fluido robusto. Sin embargo, alrededor de 2005, surgió la microfluídica abierta como una alternativa, superando al menos una limitación del sistema cerrado convencional al exponer el líquido al entorno circundante, ya sea al aire o a otra interfaz líquida. La microfluídica abierta presenta varios beneficios, como la facilidad de intervención, una mayor área

interfacial entre gas y líquido, una reducción en la formación de burbujas y una integración fluida con el flujo impulsado por la tensión superficial. Esto elimina la necesidad de métodos externos de bombeo. La fabricación de dispositivos para microfluídica abierta es relativamente sencilla y económica, utilizando técnicas como fresado, termocompresión y termograbado. Existen ejemplos específicos de microfluídica abierta que incluyen canales abiertos, rieles fluidos en miniatura e incluso aplicaciones en papel y alambres. No obstante, los sistemas abiertos presentan desafíos como evaporación del líquido, contaminación y limitaciones en los caudales de flujo.

Por otro lado, la microfluídica de flujo continuo (Xuan et al., 2019) se centra en el control preciso del flujo fluido en estado estacionario a través de canales estrechos o medios porosos. Esto se logra mediante diferentes métodos de actuación, como fuentes externas de presión, bombas mecánicas, microbombas integradas, fuerzas capilares y mecanismos electrocinéticos. Los dispositivos de flujo continuo son útiles en aplicaciones bioquímicas simples y bien definidas, así como en separaciones químicas. Sin embargo, su adaptabilidad para manipulaciones complejas de fluidos puede ser limitada debido a los desafíos que enfrentan en términos de integración y escalabilidad. Estos sistemas con canales cerrados tienen parámetros variables a lo largo del flujo, lo que restringe su capacidad para reconfigurarse y tolerar fallos.

Por otro lado, la microfluídica basada en gotas o Droplet (Matuta et al., 2020) permite controlar volúmenes discretos de fluidos en fases inmiscibles con números bajos de Reynolds y regímenes laminares. Este subcampo ha generado un gran interés debido a sus ventajas como la manipulación conveniente de pequeños volúmenes, una mejor capacidad para mezclar sustancias, encapsular muestras o clasificarlas, así como detectarlas adecuadamente y ser apta para experimentos altamente eficientes. Para tener éxito en esta área es necesario comprender profundamente la generación y las diversas operaciones lógicas relacionadas con las gotas como su manipulación, clasificación o fusión/ruptura.

La microfluídica digital (Naderi et al., 2019) es una alternativa adicional que implica controlar gotas individuales de volumen unitario de forma independiente. Este enfoque permite crear sistemas flexibles y escalables con una gran capacidad para tolerar fallos. Los métodos utilizados para actuar en la microfluídica digital incluyen el electrowetting sobre dieléctricos, fuerzas magnéticas, ondas acústicas superficiales, optoelectrowetting y actuación mecánica. Es importante destacar que la microfluídica digital se puede aplicar tanto en configuraciones de chips abiertos como cerrados.

### **1.1.3. Sistemas de Microfluídica en Estudios Neuronales.**

Las neuronas son células muy complejas que tienen características electroquímicas y estructurales detalladas que influyen en su funcionamiento. El cuerpo celular de las neuronas tiene ramificaciones extensas que alcanzan diferentes objetivos celulares y tejidos con propiedades químicas y físicas distintas (Millet y Gillette, 2012). Comprender cómo las señales moleculares y físicas afectan la dinámica de las células nerviosas es un desafío debido a la dificultad de reproducir el entorno microscópico in vivo en el laboratorio. A lo largo de los años, se han desarrollado diversas técnicas in vitro para cultivar neuronas con el objetivo de imitar los entornos naturales del organismo. Robert Campenot fue un pionero en esta área, permitiendo estudiar, controlar y cultivar neuronas bajo condiciones más precisas (Campenot, 1977). En los dispositivos desarrollados por Campenot, las neuronas cultivadas en una cámara extienden sus axones hacia una segunda cámara, lo que permite controlar diferentes regiones neurales (Campenot, 1977; Kimpinski et al., 1997). Este avance en el cultivo neuronal ha permitido a los investigadores llevar a cabo análisis bioquímicos precisos y aplicar tratamientos fisicoquímicos específicos en las fracciones aisladas de los axones. De hecho, utilizando estos dispositivos se descubrió por primera vez el potencial del factor de crecimiento nervioso para promover el crecimiento local de las ramificaciones nerviosas (Campenot, 1977; Kimpinski et al., 1997).

La combinación de la idea original de Campenot con las ciencias físicas y las microtecnologías en desarrollo ha tenido un impacto revolucionario en el diseño de estos dispositivos, lo que ha permitido la creación de dispositivos complejos, integrados y altamente controlables (Millet y Gillette, 2012).

Inicialmente, los primeros dispositivos microfluídicos compartimentados (CMD), basados en la tecnología microelectrónica, se usaban principalmente para estudios a pequeña escala en los campos de la química y la física (Whitesides, 2006; Young y Beebe, 2010; Md Yunus, 2013). Fue solo a finales de la década de 1990 cuando estos dispositivos comenzaron a aplicarse en las ciencias de la vida: primero para el análisis biológico en genética (por ejemplo, dimensionalización y clasificación de fragmentos de ADN) (Chou et al., 1999) y proteómica. Más tarde se combinó el cultivo celular con tecnologías microfabricadas como objetivo para desarrollar dispositivos miniaturizados (Md Yunus, 2013). Los primeros estudios que enfocaron las tecnologías microfluídicas, micropaternidad y microfabricación hacia preguntas neurobiológicas aparecieron en 2003 por Anne M. Taylor del laboratorio Noo Li Jeon (Taylor et al., 2003). Por primera vez se describió un dispositivo fabricado a escala micro para el cultivo neuronal con dos compartimentos que permitían separar espacialmente los somas neuronales de los axones (Park et al., 2006).

Este diseño simple pero innovador se ha convertido en una referencia fundamental para muchos otros investigadores y laboratorios en todo el mundo, y ha sentado las bases de los dispositivos comerciales disponibles hoy en día. El éxito de las plataformas microfluídicas en estudios biológicos se debe principalmente a características como el uso económico de materiales de fabricación y la manipulación sencilla. Mediante la rápida creación de prototipos y la litografía suave, una tecnología ampliamente utilizada para desarrollar moldes flexibles geoméricamente ahora es posible crear diseños microfluídicos originales (Whitesides, 2006). Además, la capacidad para manipular pequeñas cantidades de reactivos y/o células, su portabilidad mejorada y alta reproducibilidad han demostrado ser mejoras significativas en comparación con los sistemas

tradicionales de cultivo, lo que permite a los investigadores llevar a cabo análisis de alto rendimiento (Young y Beebe, 2010; Gao et al., 2012; Tehranirokh et al., 2013; Xiong et al., 2014). En conjunto, estas características han permitido que la tecnología microfluídica se extienda rápidamente a una amplia gama de áreas de investigación, brindando a ingenieros y biólogos flexibilidad en cuanto al sistema experimental y el diseño gracias a las numerosas opciones disponibles para la fabricación.

Además, la tecnología microfluídica ha logrado replicar de manera efectiva fenómenos biológicos como las condiciones de flujo presentes en los capilares in vivo (McDonald et al., 2000; Gao et al., 2012; Sackmann et al., 2014) y gradientes químicos. Esta innovadora aproximación está brindando nuevas perspectivas sobre eventos neurobiológicos que antes eran inalcanzables mediante las técnicas tradicionales de biología celular (Park et al., 2013). Desde el enfoque minimalista de célula única hasta la complejidad del formato "humano en un chip", hoy en día se fabrica una amplia variedad de dispositivos microfluídicos en laboratorios de todo el mundo.

#### **1.1.4. Tipos de Sistemas de Microfluídica para estudios en diferentes tipos celulares.**

La investigación actual se centra en dirigir la diferenciación de células madre hacia tipos específicos de células neuronales con funciones deseadas, especialmente para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como el Parkinson. Lucumi Moreno y su equipo han desarrollado un método de diferenciación que dura 30 días utilizando un sistema de microfluidos que combina cultivo celular tridimensional y estimulación química. Para lograr esto, utilizaron sustancias como ácido ascórbico, CHIR, acetato de miristato de forbol, AMP cíclico dibutirilo y factores de crecimiento (BDNF, GDNF, TGF $\beta$ 3), así como Matrigel para crear un entorno celular tridimensional. Además, emplearon dos biorreactores de microfluidos (uno bidimensional y otro tridimensional).

Los resultados obtenidos mostraron una expresión significativa de tubulina  $\beta$ III, lo cual confirma la diferenciación neuronal exitosa; también se observó una disminución en la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), lo que indica una efectiva diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas.

La eficiencia alcanzada fue del 19% en el biorreactor bidimensional y del 11% en el biorreactor tridimensional. Esto sugiere la hipótesis de que la menor eficiencia en el sistema tridimensional podría deberse a una mayor dilución de factores paracrinos. Se ha propuesto ajustar la tasa media del flujo para mejorar la eficiencia del proceso (Moreno et al. 2015).

En 2015, Yang y su equipo llevaron a cabo investigaciones relacionadas con la diferenciación neuronal, específicamente la diferenciación de células madre neurales humanas (hNSC) en células dopaminérgicas. Para lograr esto, utilizaron una estrategia de cultivo conjunto con células madre mesenquimales humanas (hMSC) que expresan GDNF como una señalización paracrina imitadora ( Yang et al., 2015) Integraron esta plataforma de microfluidos con un sistema tridimensional de cultivo celular en microcanales. Después de 5 días de cultivo, observaron una mayor expresión de marcadores neuronales (Tuj1 y MAP2) y una disminución en los marcadores del linaje glial.

La liberación controlada del factor GDNF por parte de las hMSC modificadas genéticamente facilitó la diferenciación exitosa de las hNSC en neuronas dopaminérgicas dentro del entorno tridimensional proporcionado por la matriz extracelular. Aunque se logró la diferenciación dopaminérgica en ambos experimentos, el método de cultivo conjunto demostró ser más rápido en comparación con el protocolo basado en moléculas pequeñas utilizado por Moreno et al. Además, Choi et al. presentaron un dispositivo tridimensional sin gel para el cultivo celular utilizando microfluidos para inducir la diferenciación neuronal a partir de células madre derivadas del tejido adiposo humano (hATSC), obteniendo resultados positivos para las neuronas que producen ácido gamma-aminobutírico (GABA) bajo condiciones hipóxicas. Este estudio mostró un mayor crecimiento y desarrollo de agregados celulares (neuronas) dentro de los

microcanales, con la presencia de neuritas largas positivas para Tuj o NF160 en comparación con las células de control. También, se descubrió que el sistema de microfluídos produjo un aumento en los niveles de neuronas GABA positivas, las cuales representan aproximadamente el 60% de las células. Estas células también se insertaron en la lesión de la médula espinal de ratones para su evaluación en vivo. Después de un mes desde la cirugía, las células madre hATSC diferenciadas neuronalmente se convirtieron significativamente en neuronas motoras positivas para NF160. El análisis CHIP/PCR demostró que la expresión baja de oxígeno induce la expresión de HIF1a, lo que a su vez provoca un aumento en la expresión de Wnt5A/ $\beta$ -catenina y Oct4 mediante una unión directa del HIF1a a sus regiones reguladoras en el núcleo celular y activando así al HIF1a. La vía de señalización con catenina en hATSC conduce a la autorrenovación y diferenciación hacia neuronas. Por lo tanto, se puede concluir razonablemente que incorporar factores de señalización como la proteína Wnt5 puede ser una opción más segura y sencilla para diferenciar células madre, evitando así técnicas genéticas (Choi et al., 2015).

#### **1.1.5. Aplicaciones de los Sistemas de Microfluídica en Daño Cerebrales.**

Las lesiones traumáticas, ya sea en el Sistema Nervioso Central (SNC) o en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), tienen el potencial de causar daño a largo plazo y afectar la función del cuerpo. Al estudiar cómo ocurren estos procesos, podemos obtener conocimientos sobre los mecanismos que controlan la regeneración y degeneración de los nervios. Este conocimiento puede ayudarnos a desarrollar estrategias y terapias efectivas (Wang et al., 2009; Foad et al., 2009). Los modelos animales utilizados en experimentos vivos que simulan diferentes tipos de trauma, como lesiones por impacto o cortes de nervios, han sido fundamentales para comprender los diversos factores que influyen en los resultados conductuales y la efectividad de los tratamientos. Sin embargo, estos modelos animales son complejos y presentan desafíos en términos de

reproducibilidad. Además, requieren mucho tiempo y esfuerzo. Una limitación importante es que no pueden monitorear el proceso de regeneración en tiempo real ni estudiarlo a un nivel celular detallado necesario para una comprensión precisa del mecanismo involucrado (Schmith, 2003).

Por otro lado, los modelos in vitro ofrecen un sistema experimental donde se pueden explorar las vías bioquímicas, patrones de expresión génica y cambios fenotípicos a nivel individual del axón. Esto es particularmente relevante cuando se investigan lesiones.

El uso de técnicas de microfabricación, como la fotolitografía, el grabado y la deposición, ha hecho posible la creación de dispositivos llamados Lab on a Chip (LOC). Estos dispositivos se fabrican utilizando materiales como vidrio, silicio o poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y proporcionan una plataforma para investigar y modelar lesiones en los axones (Fitch et al., 2007).

Un campo donde las plataformas microfluídicas han ganado atención es en los estudios, especialmente con sistemas LOC compartimentados que utilizan litografía blanda con PDMS. El PDMS es una elección popular para estos estudios debido a su bajo costo, flexibilidad, facilidad de fabricación, biocompatibilidad y transparencia óptica (Kim et al., 2012). Estas plataformas cuentan con compartimentos que separan los axones del cuerpo celular, lo que permite controlar el microentorno. Esto simula escenarios del mundo real y facilita la investigación sobre mielinización, crecimiento de neuritas, evaluación de medicamentos, vías de señalización y estudios de redes en diferentes niveles de organización biológica (Taylor et al., 2005).

Las plataformas microfluídicas son compatibles con dos tipos principales de modelos de lesiones: lesiones químicas/físicas y replicación del entorno regenerativo. Al incorporar estas plataformas en sistemas de cultivo experimental, los investigadores pueden manipular independientemente las respuestas tanto en los axones como en el cuerpo celular. Como las plataformas para simular y

estudiar problemas neurológicos provocados por traumas cerebrales o isquémicas las cuales generan una cadena de problemas de salud hasta la muerte.

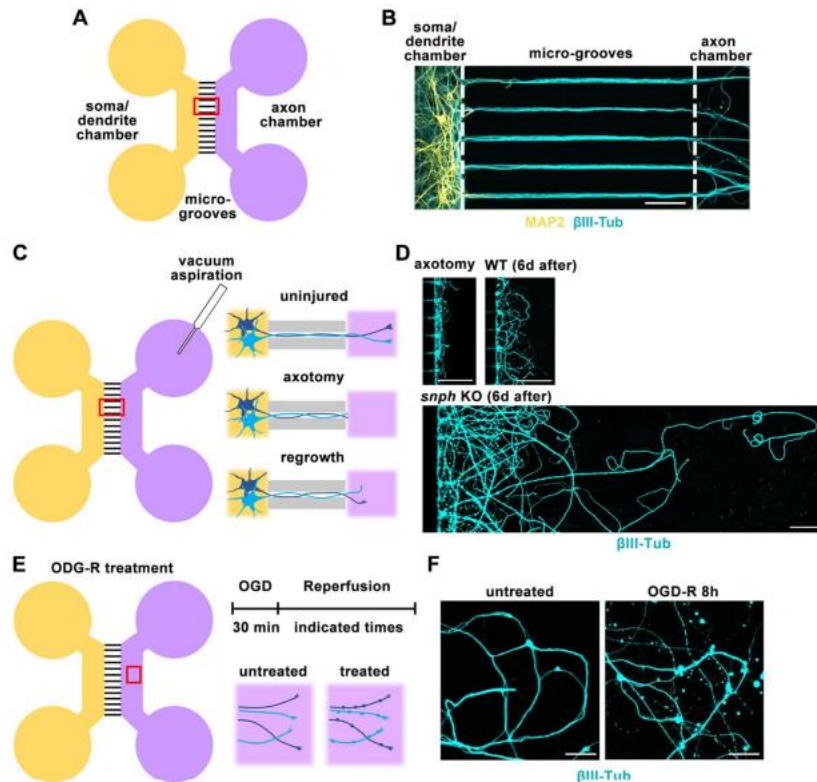
Los dispositivos de microcámara microfluídica son una herramienta poderosa para separar físicamente y de manera fluida los axones de los cuerpos celulares y dendritas neuronales (Zhou et al., 2012). Después de sembrar estas microcámaras en el soma neuronal, los cuerpos celulares y las dendritas quedan confinados en la cámara, mientras que los axones se extienden hacia la cámara terminal a través de surcos estrechos (de aproximadamente 450  $\mu\text{m}$  de longitud) (Zhou et al., 2016) (Fig. 1A, B). Para crear un modelo in vitro de lesión y regeneración de axones del sistema nervioso central, utilizamos aspiración al vacío para eliminar los axones de las neuronas corticales de ratón después de 14 días en cultivo (DIV14), como se ha descrito previamente (Fig. 1C) (Taylor et al., 2005). La tinción inmunológica confirma que este método de axotomía por aspiración corta efectivamente todos los axones en la entrada a la cámara terminal, y los axones lesionados muestran una capacidad limitada para regenerarse seis días después de la lesión (Fig. 1D). Sin embargo, cuando se elimina la proteína sintafilina anclada a las mitocondrias (SNPH), se promueve significativamente la regeneración axonal, como se observa en esta plataforma microfluídica (Fig. 1D) (Huang et al., 2021).

Estos descubrimientos regenerativos están en línea con las observaciones realizadas en ratones knockout (KO) para snph, que muestran una mayor capacidad de regeneración del nervio ciático después de sufrir una lesión por aplastamiento (Zhou et al., 2016), así como una mejora en la regeneración axonal del tracto corticoespinal (CST) y la recuperación de la función motora después de una lesión en la médula espinal (Han et al., 2020). Por lo tanto, tanto los estudios in vitro como in vivo respaldan la idea de que facilitar el transporte mitocondrial axonal contribuye a restablecer el suministro local de energía, promoviendo así la regeneración del sistema nervioso central (ver revisión de Cheng et al., 2022).

Para simular el estrés isquémico y la subsiguiente degeneración axonal en las neuronas del sistema nervioso central, modificamos una condición conocida como isquemia-reperfusión (Zheng et al., 2019). En este experimento, sometimos neuronas corticales maduras (DIV14) a un medio privado de oxígeno y glucosa (OGD: 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 94% N<sub>2</sub>, sin glucosa) durante un período de 30 minutos para luego permitirles recuperarse durante 8 horas con un medio que contenía oxígeno y glucosa (Fig.1E). Las neuronas maduras expuestas al tratamiento OGD-R mostraron características degenerativas distintivas, como axones con forma irregular o fragmentados (Fig.1F).

Huang y colaboradores (2021) concuerda con el fenotipo de degeneración axonal causado por isquemia que se ha observado en neuronas cultivadas y en los tractos de materia blanca del cerebro de ratones después de un episodio isquémico (Cui et al., 2020; Liu et al., 2019). Estas plataformas experimentales, que utilizan dispositivos de microcámara microfluídica, proveen sistemas modelo confiables para estudiar la regeneración de los axones del sistema nervioso central después de lesiones e isquemia.

Esto amplía nuestro conocimiento sobre los mecanismos implicados en los procesos de degeneración y regeneración de los axones. Además, estas plataformas nos permiten analizar las redes de axones y obtener datos sobre la ubicación de las lesiones en relación con las células del cuerpo.



**Figura. 3.** Utilización de dispositivos de microcámaras para modelar la regeneración y degeneración de los axones del SNC después de lesiones e isquemia. A. Esquema de un dispositivo de microcámara que separa física y fluidamente los axones del área soma-dendrítica de las neuronas. Neuronas corticales se cultivaron en la cámara soma-dendrítica (amarilla) en DIV0, y solo los axones crecen en la cámara terminal de axones (morada) a través de las microestrías de 450  $\mu$ m (recuadro rojo). B. La co-inmuntinción valida los compartimentos de axones (etiquetados con  $\beta$ III-tubulina) y los compartimentos soma-dendríticos (etiquetados con MAP2). C, D. Esquema que muestra la axotomía mediante aspiración al vacío dentro de las cámaras de axones (C) e imágenes representativas de las cámaras de axones que muestran la capacidad relativa de regeneración axonal 6 días después de la lesión (D). Neuronas corticales WT o *snph* KO fueron axotomizadas en DIV10 y marcadas con  $\beta$ III-tubulina para la imagen 6 días después de la axotomía. E, F. Esquema que muestra el tratamiento con OGD-R dentro de la cámara axonal (E) e imágenes

representativas de las cámaras de axones que muestran la integridad axonal antes (izquierda) o después (derecha) del tratamiento con OGD-R. Neuronas corticales en DIV14 fueron tratadas con OGD durante 30 minutos y reperusión durante 8 horas, seguido de la inmunotinción con  $\beta$ III-tubulina. Nótese que el estrés isquémico induce axones en forma de cuentas o fragmentados. Barras de escala, 50  $\mu$ m (B), 100  $\mu$ m (D), 20  $\mu$ m (F). La imagen (B) se adaptó de Farfel-Becker et al. 2019 (Derechos de Autor).

## **1.2. Aplicaciones regenerativas cerebrales: Matrices Cerebrales descclularizadas**

### **1.2.1. Matrices Descclularizadas: Tejidos Cerebrales**

La ingeniería de tejidos es un campo que combina medicina regenerativa, ciencia e ingeniería de materiales y biología celular. Su objetivo es mejorar la función corporal y reemplazar tejidos dañados, lo que ha tenido un impacto significativo en el avance de la medicina en las últimas décadas (A-D Brown et al, 2016). En esencia, se basa en la construcción de estructuras tridimensionales complejas utilizando células y biomateriales. Uno de los aspectos más importantes en este campo es lograr que las células respondan a diferentes formas, estructuras y señales. En general, existen tres tipos principales de ingeniería de tejidos: ingeniería celular, sistemas de señalización y andamios (Zang et al., 2022). Los andamios juegan un papel fundamental al proporcionar una matriz extracelular que permite el crecimiento celular en un entorno similar al tejido natural. Por otro lado, los factores de crecimiento se utilizan para guiar y coordinar diversas actividades celulares dentro del tejido. El proceso comienza típicamente con la fabricación de andamios biocompatibles que facilitan la adhesión, proliferación y diferenciación celular para promover la regeneración tisular ( Zang et al., 2022).

Durante este proceso, el andamio proporciona estabilidad mecánica, elasticidad y resistencia, además de crear un entorno favorable para el

crecimiento de las células granulares (T. Rozario et al., 2010). Dada la importancia del entorno biológico circundante en la determinación del crecimiento, absorción, proliferación y función biológica de las células implantadas, las propiedades del andamio son especialmente relevantes. Se han llevado a cabo investigaciones exhaustivas sobre diferentes aspectos relacionados con su composición, estructura, función y técnicas de fabricación debido a su valor en la ingeniería de tejidos (Theocharis et al., 2016). Idealmente, los andamios utilizados en la ingeniería de tejidos deben ser biocompatibles y biodegradables, con una porosidad alta, interconectividad y una buena resistencia mecánica (Zhao et al., 2022). Además, la estructura y forma de los andamios también se pueden utilizar para regular la estructura, tamaño y morfología de los tejidos regenerados.

Los andamios se dividen en categorías naturales y sintéticas. La categoría natural incluye polímeros naturales como colágeno, fibroína de seda y ácido hialurónico; mientras que la categoría sintética incluye polímeros sintéticos como ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y policaprolactona (PCL) (AA, 2020). No obstante, los materiales mencionados anteriormente presentan algunas desventajas e limitaciones. Por ejemplo, el biomimetismo estructural no es suficiente y a menudo los andamios sintéticos no tienen los sitios necesarios para que las células se adhieran. Como una estructura que conecta células y tejidos, los andamios diseñados con tejidos actúan como una matriz extracelular natural que guía el crecimiento del tejido. La matriz extracelular natural (MEC) es un material biomimético ideal para proporcionar soporte a los tejidos.

La MEC ayuda a mantener la estructura celular y regula procesos como el crecimiento, la proliferación, la postura y la diferenciación celular [8]. Además, las señales emitidas por la MEC son importantes para regular procesos de supervivencia, migración, proliferación y diferenciación celular mediante diferentes sustancias bioactivas como factores de crecimiento y citocinas (Cramer et al., 2020). Si consideramos que la ingeniería de tejidos tiene como objetivo

principal imitar la ECM, debemos diseñar andamios que imiten su función y apariencia para promover respuestas celulares. Sin embargo, la ECM natural está compuesta por múltiples componentes complejos como proteínas y glucosaminoglicanos, los cuales tienen proporciones de composición y estructuras espaciales muy complejas (Uhl et al., 2020). Por lo tanto, resulta difícil reconstituir *in vitro* andamios con una composición similar a la ECM utilizando métodos fisicoquímicos convencionales. Además de ser complicado modelar su composición, también resulta desafiante simular *in vitro* su compleja ultraestructura.

En general, existen diferentes métodos utilizados para preparar andamios de matriz extracelular (ECM). Estos incluyen la fabricación de hidrogeles a partir de polímeros naturales, la síntesis de colágeno por autoensamblaje, la impresión tridimensional y la descelularización de tejidos. Sin embargo, todavía es un desafío lograr una imitación precisa del proceso de remodelación de la ECM. Los andamios que utilizan matrices extracelulares descelularizadas (dECM) ofrecen numerosas ventajas debido a su similitud estructural y composición con las ECM presentes en distintos tejidos y órganos del cuerpo. La descelularización tisular se ha establecido como un método eficaz e importante para preparar andamios biomiméticos que imiten las características de la ECM.

### **1.2.2. Función de las matrices Descelularizadas en la Plasticidad Neuronal.**

La investigación en sinaptología ha estado centrada en el estudio de la matriz extracelular (MEC) difusa que rodea las sinapsis durante los últimos diez años. Estudios realizados por Faissner et al. (2010), Senkov et al. (2014), Ferrer-Ferrer y Dityatev (2018) y De Luca et al. (2020) profundizan en cómo la MEC regula la formación de sinapsis, su maduración, así como la función y plasticidad sinápticas. Es importante destacar que las moléculas presentes en la MEC perisináptica afectan la transmisión sináptica al influir en los receptores de

glutamato tipo AMPA (AMPA). Esto se logra mediante la modulación de los AMPAR, facilitando el reemplazo rápido de receptores desensibilizados por aquellos que aún son funcionales. Estos hallazgos discutidos por Heine et al. (2008) demuestran cómo las moléculas perisinápticas influyen en mantener una comunicación sináptica precisa durante estimulaciones rápidas y repetitivas. Revelando finalmente que, las moléculas presentes en la MEC perisináptica juegan un papel crucial para equilibrar tanto la plasticidad como la estabilidad de las sinapsis según lo investigado por (Korotchenko et al. (2014).

Los experimentos *in vitro* que implican el clivaje del ácido hialurónico (AH), por otra parte, han demostrado que los sulfatos de condroitina (SC) con enzimas como la hialuronidasa o la condroitinasa ABC pueden mejorar significativamente el número de puntos sinápticos y reducir al mismo tiempo la amplitud y carga de las corrientes postsinápticas excitatorias en respuesta al glutamato en neuronas hipocampales embrionarias (Pyka et al., 2011). Estos descubrimientos sugieren que la matriz extracelular cerebral (MEC) regula tanto la cantidad de puntos sinápticos como la densidad de receptores de glutamato en la membrana postsináptica a través de diversos mecanismos, aunque aún no se comprenden completamente.

Además, se ha observado que la MEC perisináptica ejerce control sobre las funciones y movilidad de los receptores sinápticos, así como sobre la difusión de neurotransmisores y neuromoduladores en el espacio extracelular. Este complejo vínculo se ilustra en un estudio realizado por Mitlöhner et al. (2020), quienes establecieron una conexión entre la actividad sináptica, la neuromodulación y las reorganizaciones de la MEC mediante el aumento de los niveles de cAMP, activación de receptores NMDA y señalización intracelular del calcio. La descomposición enzimática o deficiencia molecular en la MEC puede restablecer la plasticidad del tejido nervioso según lo demostrado por estudios previos (Pizzorusso et al., 2002; Carulli et al., 2010; Morellini et al., 2010; Happel

et al., 2014), lo que destaca la influencia bidireccional entre la MEC y la función sináptica.

Por otro lado, la regulación de los receptores de neurotransmisores en la sinapsis tiene un impacto en la matriz extracelular (MEC) perisináptica y en la plasticidad sináptica. En las neuronas corticales, cuando se modulan los receptores de dopamina tipo D1, se produce una ruptura de los proteoglicanos aggrecan y brevican mediante las proteasas ADAMTS-4 y 5, lo cual lleva a una reestructuración de la MEC perisináptica (Mittlöhner et al., 2020). Este efecto está mediado por la vía PKA/cAMP y por la activación de la cascada postsináptica que involucra a los receptores NMDA GluN2B y a la quinasa dependiente del calcio/calmodulina II. Los lecticanos presentes en la MEC perisináptica tienen un papel fundamental en el mantenimiento de una potenciación a largo plazo (LTP) como base celular para el almacenamiento de memoria. La ruptura inducida por dopamina de estos lecticanos puede regular la interacción entre formas hebbianas y homeostáticas de plasticidad para mantener la capacidad adaptativa de los circuitos neuronales. A pesar del progreso alcanzado, todavía hay mucho por descubrir acerca del vínculo mecanicista entre la activación sináptica y las modificaciones en la MEC.

Adicionalmente, se han encontrado componentes similares entre las redes perineuronales típicas (PNNs) y la MEC perisináptica, como lectinas, glicoproteínas y proteínas ligantes (Lendvai et al., 2013; Sonntag et al., 2015). Algunos de los componentes clave en la MEC perisináptica identificados por Dityatev y Schachner (2006) incluyen tenascina, trombospondina y pentraxina neuronal. Sin embargo, aún hay dudas sobre si la matriz perisináptica y las PNNs difieren en la composición relativa de sus componentes básicos o en la presencia de moléculas específicas de la MEC en el cerebro. Tanto durante el desarrollo como en las etapas maduras del sistema nervioso central (SNC), los astrocitos liberan varias moléculas de la MEC que influyen en la formación de sinapsis, la actividad neuronal y la plasticidad. Esto resalta el papel crucial de los astrocitos al

regular las señales proteicas de la MEC, el entorno microsináptico y la diversidad sináptica a través de su comunicación con las neuronas (Wiese et al., 2012; Walker et al., 2020). El secreto astrocítico, que contiene moléculas sinaptogénicas como trombospondinas, proteínas ricas en cisteína y proteoglicanos sulfatados heparano, ejerce influencia sobre las neuronas y controla la plasticidad sináptica (Christopherson et al., 2005; Kucukdereli et al., 2011; Allen et al., 2012). Es posible que ciertas moléculas específicas para la MEC perisináptica sean producidas por partes neuronales involucradas en las sinapsis, particularmente los procesos perisinápticos de los astrocitos que forman parte activa de esta relación tripartita.

En resumen, las interacciones multifacéticas entre la MEC y los procesos sinápticos representan una relación compleja y dinámica que requiere un mayor estudio e investigación.

**CAPÍTULO II**  
**PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA,**  
**JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y**  
**OBJETIVOS**

## **2.1. Planteamiento del Problema y Justificación**

### **2.1.1. La incapacidad del Sistema Nervioso Central en Regenerarse**

El problema principal por investigar son los daños cerebrales causados en el Sistema Nervioso Central, el cual no posee capacidades regenerativas autónomas en los adultos mamíferos. El cual es lo contrario al sistema nervioso periférico, ya que los axones se regeneran y permiten la fluidez de las funciones del nervio periférico afectado. Los primeros investigadores en realizar experimentos relevantes en estos temas fueron Aguayo y colegas en 1980, donde demostraron que neuronas del sistema nervioso central poseen la habilidad regenerativa en conjunto con los nervios del sistema nervioso periférico, dando lugar clave a que el ambiente extracelular donde se encuentren las células nerviosas del SNC es de suma importancia para su regeneración (Richardson et al., 1980).

Diversos factores extrínsecos de gran relevancia desempeñan un papel fundamental en la regulación del proceso de regeneración neural. Estos factores incluyen los restos de mielina procedentes de axones lesionados, astrocitos, fibroblastos, componentes de la matriz extracelular (ECM), microglía y células inmunitarias de la sangre, que pueden estar presentes en el lugar de la lesión o infiltrarse en él, lo que conduce a la formación de una cicatriz glial (Brosius Lutz et al., 2017; Kang et al., 2014). Las lesiones en el sistema nervioso central (SNC) se encuentran con una eliminación retrasada de la mielina del SNC, ya que las vainas de mielina que rodean a las neuronas en el SNC están compuestas principalmente por oligodendrocitos. A diferencia de las células de Schwann, los oligodendrocitos no experimentan una reprogramación inducida por la lesión y no son eficientes en la fagocitosis de los restos de mielina de la misma manera que lo son los macrófagos. En consecuencia, las vainas de mielina no se eliminan eficazmente de los sitios de lesión, lo que resulta en un "fantasma" persistente de la trayectoria anterior del axón que puede permanecer durante años después de la lesión (Vargas y Barres, 2007). Esta falta de eliminación de la mielina se convierte en un

obstáculo para la regeneración de los axones a través de áreas dañadas, obstaculizando la restauración de los circuitos neuronales (Filbin, 2003).

Después de una lesión en el SNC se forma la cicatriz glial por la acción de los astrocitos, la microglia, las células de las meninges y los precursores de los oligodendrocitos. La cicatriz restablece la integridad estructural del SNC, pero también constituye uno de los principales obstáculos para el restablecimiento de la integridad funcional, porque constituye una barrera física y química para la extensión y reconexión de los axones mutilados durante la lesión. La cicatriz glial se compone de matriz extracelular y de redes compactas de astrocitos, en donde las moléculas expresadas dinámicamente en tiempo y espacio generan un balance que finalmente favorece la inhibición de la regeneración neurítica.

Los experimentos de las dos últimas décadas han caracterizado bien los inhibidores exógenos del crecimiento neuronal y existen revisiones recientes (Yui, et al 2006) De ellos, las moléculas inhibitoras del crecimiento extrínseco mejor descritas son las siguientes: la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (McKerracher et al, 1994), Nogo (Chen, et al 2000), y la glicoproteína oligodendrocitaria-mielina (OMgp)(Wang et al, 2002). Estas moléculas son sintetizadas por los oligodendrocitos y se distribuyen en el revestimiento de mielina de los axones del SNC. Los tres inhibidores de la mielina se unen al receptor Nogo-66 anclado al glucosilfosfatidilinositol (NgR1), que se expresa en muchas neuronas del SNC (Domeniconi et al, 2002). El tratamiento con el antagonista NgR1 mejoró el crecimiento de las neuritas de las células del GRD en un modelo de cocultivo. También se ha implicado a otros receptores en la mediación del efecto inhibitor, como el NgR2 y el receptor B similar a la inmunoglobulina emparejada (PirB) (Atwal et al, 2008).

Las otras moléculas del grupo principal que inhiben la regeneración neuronal son los inhibidores del proteoglicano de condroitina sulfato (CSPG). Los proteoglicanos de condroitina 6-sulfato son producidos por los astrocitos y se asocian a la cicatriz glial, que desempeña un papel importante en el fracaso

regenerativo tras una lesión del SNC. El neuroglicano 2 (NG2) (Rolls, et al, 2009; Fawcett, et al, 1999), el aggrecan, el brevican, el neurocan, el vesicant y el fosfacán son todos miembros diferentes de la familia CSPG de moléculas de la matriz extracelular. La propiedad inhibitoria de los CSPG se ha atribuido a sus cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG), y se ha demostrado que la eliminación enzimática de las cadenas de GAG mediante la condroitinasa ABC (ChABC) promueve la regeneración de los axones tanto in vitro como in vivo (Shen, et al, 2005). Recientemente, se ha identificado una proteína tirosina fosfatasa transmembrana, la PTP $\sigma$ , como receptor de alta afinidad de la CSPG, que media su efecto inhibitorio. A pesar de los convincentes datos in vitro sobre el papel de estas moléculas inhibitorias del crecimiento, la eliminación de las tres proteínas inhibitorias de la mielina (Lee, et al 2010), o del NgR (Zheng, et al 2005), no ha mejorado la regeneración axonal del tracto corticoespinal. La eliminación enzimática de la CSPG o la supresión genética de la PTP $\sigma$  (Fry, et al, 2010) mejoraron modestamente el crecimiento axonal, aunque no está claro si el crecimiento observado es una regeneración axonal del tracto largo o un brote de los axones preservados. Así pues, aunque las moléculas inhibitorias de la mielina y el proteoglicano desempeñan algún papel en la limitación del crecimiento axonal, es probable que existan limitaciones adicionales en el crecimiento regenerativo axonal.

### **2.1.2. Impacto Social y Económico de los Daños Cerebrales y enfermedades Neurodegenerativas a Nivel Mundial y en Panamá**

Las enfermedades neurodegenerativas y daños cerebrales producen una muerte progresiva de neuronas en diferentes partes o regiones del Sistema Nervioso. Los trastornos del desarrollo y neurológicos son muy prevalentes, y dependientemente, generan una gran carga SOCIAL y ECONÓMICA, no tan solo para el país, sino para sus familiares. De acuerdo con un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2018, las enfermedades

degenerativas del cerebro como el Alzheimer acapara entre un 60% y 70% de los casos de demencia en el mundo. En el caso de Panamá, 47 mil panameños padecerán de esta enfermedad para el 2030, no obstante, en el 2018 ya hay 22 mil panameños sufriendo de esta enfermedad, según estudios de la Caja del Seguro Social de Panamá y la OMS. Estas cifras son preocupantes para un país con menos de 5 millones de habitantes. De aquí nace mi preocupación y como panameña amante de la ciencia, deseo contribuir con mis primeros años de carrera como investigadora a esta rama de biología molecular y neurociencia. Además, en el 2019 más de 40 mil panameños padecen de Demencia Senil a la cual la OMS reconoce como una prioridad de salud pública. De 10% a 15 % de los pacientes mayores de 65 años están sufriendo problemas cognitivos que consecuentemente la mayoría desarrollará la enfermedad del Alzheimer (Espino, 2019).

### **2.1.3. Biomateriales de Matrices extracelulares como respuesta ante daños cerebrales.**

El sistema nervioso central (SNC) humano es un tejido biológico muy complejo, compuesto por neuronas y células de soporte denominadas glía (Silberis et al., 2016). Junto con las neuronas, las células gliales producen y ensamblan una matriz extracelular (MEC) organizada por completo que constituye en un aproximado el 20% del volumen total del SNC adulto (Song et al. 2018; Dzyubenko et al., 2016). La MEC se constituye principalmente de proteoglicanos (aggrecan, brevican, neurocan y versican), glicosaminoglicanos (GAGs) (por ejemplo, hialuronano), glicoproteínas (por ejemplo, tenascina-R y tenascina-C), y niveles relativamente bajos de proteínas fibrosas como el colágeno y la fibronectina (Kong et al., 2022). Actualmente, se sabe que cada componente de la MEC en el Sistema Nervioso Central realiza diversas funciones en el crecimiento de las neuritas, la guía axonal, la migración y diferenciación celular, así como en la sinaptogénesis (DeQuach et al., 2022; Buckenmeyer et al. 2020). El papel de las matrices descelulaizadas cerebrales o MECD en el proceso de

regeneración y reparación de tejidos es de suma importancia. Uno de los primeros estudios sobre descelularización cerebral se centró en la implantación de andamios descelularizados en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo para examinar la respuesta angiogénica inducida por los andamios de dbECM. Tras la implantación, los resultados mostraron que los andamios de dbECM inducían una fuerte respuesta angiogénica, comparable a la del factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), una citoquina angiogénica. Diferentes estudios también mostraron que los andamios de dbECM soportan el crecimiento sostenido ex vivo de diferentes tipos de células como las SC neurales murinas (NSCs) (De Waele et al., 2015) y las células Neuro2a (Granato et al., 2020). Además MEC descelularizada, estos andamios de médula espinal y cerebelo también se han utilizado en aplicaciones de ingeniería tisular. Para ilustrar, se implantaron en ratas andamios descelularizados de médula espinal con estructura y composición 3D preservadas y se analizó mediante análisis inmunohistoquímico la densidad de células CD4+/CD8+, los cuales se infiltraron en los andamios tras la implantación. Los resultados mostraron que las células CD4+ y CD8+ atacaban los MEC descelularizada en una menor cantidad que un injerto de médula espinal alólogo. Existe la posibilidad que es debido a la eficacia del proceso de descelularización que permitía eliminar la mielina y las células que podrían haber iniciado una respuesta inmunitaria tras la implantación (Gou et al., 2010). La mayoría de los andamios, como la matriz a base de colágeno, la gelatina, el Matrigel y la fibrina, mejoran la supervivencia celular y proporcionan una imitación temporal de la matriz extracelular en terapias para lesiones cerebrales traumáticas y accidentes cerebrovasculares (DeQuach et al, 2020). Sin embargo, no crean completamente el microentorno (in vivo o in vitro) de la compleja MEC nativa del cerebro. Esto se debe a que no existen componentes similares con su combinación única de proteínas y proteoglicanos contenidos en la ECM cerebral o en sus regiones específicas (por ejemplo, corteza, cerebelo o áreas restantes). Sin embargo, nunca se ha probado por separado la capacidad de regeneración de la cdECM y sus subregiones para evaluar la regulación de la supervivencia y

diferenciación de las células neuronales madre dentro de sistemas biomiméticos de microfluídica.

## **2.2. Hipótesis de trabajo**

El Sistema Nervioso Central presenta altas limitaciones en la temática de regeneración, a diferencia del sistema nervioso periférico que después de un daño los axones tienden a regenerar. Y esto es debido a que el crecimiento próximo es inhibido por los oligodendrocitos, al igual que la formación de cicatrices glial hace decrecer la actividad de regenerativa del nervio. Los factores intrínsecos inhibidores de proteínas asociadas a mielina juegan un papel de mayor relevancia en la regeneración en un adulto. Por otra parte, hay mucha evidencia que sugieren que la expresión de estas moléculas inhibitoras sean clave en los mecanismos de neurodegeneración en el SNC.

Los modelos animales han sido base primordial en el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los resultados de los estudios realizados en animales muestran ineficiencia, como se puede comprobar y evidenciar por fracasos en medicamentos farmacéuticos. Como respuesta, han surgido desde el 2003 diversas plataformas que se han podido mejorar para simular cultivos 2D y 3D neuronales y que ofrecen una facilidad al operador en manejo a baja densidad celular como lo son los Dispositivos de Microfluídica. Estos son plataformas capaces de albergar moléculas y hasta microorganismos a dimensiones de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  l ya que puede mantener la manipulación de cantidades minúsculas de flúidos en su sistema de microcanales. Aún más, promueven usar estos dispositivos pre-fabricados para estudios de tejidos neuronales o con un cierto aislamiento célula por célula para estudios individuales. Haciéndolo factible y necesario para la realización de este proyecto. Por otra parte teniendo la habilidad de estudiar la estructura neuronal, se ha estipuló en segundo plano la intervención de regeneración usando las matrices descelularizadas cerebrales por región (Corteza, cerebelo y áreas remanentes). Actualmente, han

sido utilizadas para hidrogeles y tipos de bioink para impresiones de tejido en 3D donde presentan una biocompatibilidad con el cuerpo humano alta. Es por esta razón que se desean investigar el uso de las matrices descelularizadas cerebrales no tan solo para estimular a diferenciación celular, sino para observar su rol en la mecánica de regeneración a nivel neuronal.

La presente investigación se desarrolla bajo la siguiente hipótesis:

***“Los sistemas de Microfluídica son una herramienta eficiente para biomimetar un daño cerebral e inducir reparación nivel neurona mediante factores solubles de matriz descelularizadas cerebrales”***

## **2.3. Objetivo General y Específicos**

### **2.3.1. Objetivo General**

El objetivo general que conduce esta tesis es el siguiente:

1. Implementar un modelo mimético, basado en sistemas de microfluídica, para el estudio de procesos de daño cerebrales y recuperación con matrices extracelulares descelularizadas.

### **2.3.2. Objetivos Específicos:**

1. Establecer un sistema Compartimentalizado de Microfluídica capaz de mantener viabilidad y diferenciación celular.
2. Caracterizar las matrices descelularizadas cerebrales extraídas de un porcino, seccionando las regiones principales del cerebro: Corteza, Cerebelo y Áreas remanentes.
3. Mimetizar un daño cerebral mediante un Modelo DOG (Deprivación de oxígeno y glucosa) in vitro con la línea celular PC12.

4. Analizar el efecto recuperar de las matrices descelularizadas cerebrales ante un modelo de daño cerebral en condiciones de laboratorio.

**CAPÍTULO III**  
**MARCO TEÓRICO Y**  
**REFERENCIAL**

### **3.1. Los sistemas de microfluídica son aplicaciones biomédicas para estudios neuronales (soma y axón) y modelos de daños cerebrales a baja densidad celular in vitro**

Aunque las neuronas se han cultivado y estudiado en modelos *in vitro* durante décadas, la idea de los cultivos compartimentados no se generalizó hasta finales de los años setenta. El primer modelo compartimentado de neuronas con segregación del soma y el axón en compartimentos físicamente distintos y químicamente separados fue con el modelo de Campenot (Campenot et al., 1977). Estas cámaras se hicieron en una placa de Petri recubriendo una capa de grasa de grasa en el fondo de la placa y colocando una capa de teflón reutilizable sobre la de silicona existente. La capa de grasa actúa como una barrera hidrófoba que permite el químicamente distintos para el soma y el axón de las neuronas del sistema nervioso periférico. Estos dispositivos se utilizaron con éxito en varios estudios que abarcaban desde el transporte axonal hasta la regeneración. Además, el investigador Ivins y equipo (1998) desarrollaron una cámara compartimentada utilizando cubreobjetos como barrera física en la separación del soma y los axones en cultivo. Estos dispositivos resultaron no ser versátiles para estudios neuronales compartimentados debido a la complejidad de su fabricación y mantenimiento. Sin embargo no cabe duda que estos estudios fueron pioneros en una nueva era de los sistemas de cultivo compartimentados en los campos de neurociencia y neuroingeniería.

En consecuencia, aparecieron más plataformas de estudios neuronales. El desarrollo de un dispositivo de microfluidos de doble cámara para la investigación en neurociencia por Taylor et al. (2005) generó intereses en seguir desarrollando varios tipos de microfluidos para la investigación en neurociencia. Las plataformas y dispositivos de microfluidos para neurociencia se pueden clasificar ampliamente en 1) interfaces eléctricas, 2) interfaces químicas, 3) interfaces físicas y 4) interfaces que integran cualquier combinación de las otras tres interfaces. Estas

plataformas se están aplicando ampliamente para cultivar neuronas, manipular neuronas con la flexibilidad de manipular el cuerpo celular y los axones independientes entre sí, el tallo neuronal, diferenciación celular, neurofarmacología, neuroelectrofisiología, biosensores neuronales y modelos de enfermedades (Kim et al., 2012). Estas plataformas de microfluidos también se utilizan ampliamente en estudios involucrando varios tipos de células de soporte neuronal como células de Schwann, astrocitos, oligodendrocitos e incluso microglía.

Con este impulso se desarrollaron varias plataformas LOC. Los dispositivos LOC ofrecen potentes alternativas a las técnicas in vivo e in vitro existentes en el estudio de las lesiones axonales traumáticas (TAI). Proporcionar plataformas para modelar y estudiar con resoluciones unicelulares con compartimentación y control preciso sobre los microambientes celulares. Pueden automatizarse, requieren una pequeña cantidad de reactivos con posibilidades de multiplexación y un alto rendimiento. Los dispositivos LOC se han desarrollado para aplicaciones de neurociencia que van desde entornos de lesiones que pueden emplearse en neurociencia para modelar y estudiar las lesiones y la regeneración, la conectividad sináptica y las redes neuronales vivas complejas (Reginensi et al., 2013), ya que pueden lograr el aislamiento fluídico de los cuerpos celulares neuronales de sus axones. Se desarrollan varios tipos de dispositivos de microfluidos para aplicaciones en neurociencia (Taylor et al., 2009).

### **3.2. Los sistemas de Microfluídica influyen en estudios relacionados a interacción celular en co-cultivos neuronales y gradientes bioquímicos.**

Majumdar et al. (2011) diseñaron una plataforma de cocultivo de células microfluídicas PDMS que permitió la manipulación individual de varios tipos de células con la colocación de una válvula microfabricada que sirvió como una barrera reversible entre las cámaras. Como resultado, se mantuvieron cocultivos

sanos de neuronas y glía del hipocampo durante varias semanas en condiciones óptimas. En particular, el cocultivo con glía proporcionó medios nutritivos para mantener cultivos neuronales saludables, eliminando la necesidad de suministrar a las neuronas medios de glía precondicionados, mejorando así la eficiencia de transfección de las neuronas en la plataforma. De manera similar, Shi et al. (2013) fabricaron dos sistemas de cultivo de células microfluídicas PDMS, una configuración de capas verticales y una configuración de cuatro cámaras para estudiar la comunicación entre las neuronas y la glía en estrecha proximidad. Las cámaras estaban separadas por barreras de válvulas habilitadas por presión que les permitían controlar la comunicación entre los dos tipos de células. En este estudio, el número y la estabilidad de los contactos sinápticos, así como los niveles secretados de factores solubles, aumentaron en el sistema de cocultivo, confirmando así la importancia de la comunicación entre las neuronas y la glía para el desarrollo de sinapsis estables en plataformas de microfluidos. Robertson et al. (2014) desarrollaron un sistema in vitro para examinar la interacción sináptica entre dos poblaciones interconectadas de cocultivos mixtos de hipocampo primario mediante la integración de microfluidos con técnicas de imágenes de calcio. Además, se verificó un modelo computacional para caracterizar las características fluídicas del sistema y mejorar los protocolos experimentales (evitar la contaminación cruzada de sustancias entre cocultivos). Los resultados revelaron que las neuronas y la glía, en cada una de las cámaras separadas, crecieron dentro de los microcanales donde interactuaron físicamente y formaron sinapsis. Además de esto, la función de la sinapsis entre neurona y glía se confirmó mediante imágenes de calcio. Yang et al. (2012) fabricaron una plataforma de matriz de microfluidos para modular la diferenciación de hNSC en un microambiente ECM 3D utilizando la recapitulación de la acción paracrina de células madre mesenquimales humanas (hMSC) genéticamente modificadas. Las hMSC se diseñaron genéticamente para aumentar la expresión del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) utilizando nanopartículas de polímero catiónico. Un estudio de simulación producido mediante modelado

matemático del GDNF acumulado secretado por hMSC diseñadas confirmó que se podría crear una señalización de factores secretados similar a la in vivo en un hidrogel ECM 3D en el sistema de microfluidos. Específicamente, en los canales centrales del sistema de microfluidos, que se llenaron con un hidrogel ECM 3D, se cultivaron hNSC y se cultivaron hMSC que sobreexpresan GDNF (GDNF-hMSC) en los canales a cada lado del canal central. En el cocultivo de hNSC con GDNF-hMSC en el sistema de microfluidos 3D se observó una diferenciación reducida de hNSC en células gliales y una mayor diferenciación de hNSC en células neuronales, incluidas las neuronas dopaminérgicas. Además, las células neuronales demostraron características electrofisiológicas funcionales similares a las de las neuronas. Finalmente, se utilizó un modelo animal de lesión cerebral hipóxico-isquémica para confirmar la capacidad paracrina mejorada de las GDNF-hMSC. Parque y col. (2020) fabricaron una plataforma de cocultivo de microfluidos circular donde se cocultivaron neuronas embrionarias del SNC y oligodendrocitos (OL) postnatales en dos compartimentos separados que estaban conectados por conjuntos de microcanales que guían los axones. Estos canales de microfluidos permitieron el aislamiento físico de los cuerpos celulares, pero no de los axones, y mantuvieron el aislamiento fluídico. Las neuronas embrionarias del SNC y los progenitores OL posnatales se cultivaron conjuntamente en la plataforma durante hasta cuatro semanas para estudiar la interacción axón-glia y la mielinización.

### **3.3. Las matrices extracelulares cerebrales son consideradas fundamentales para el desarrollo de la actividad sináptica neuronal.**

La matriz extracelular (MEC) juega un papel fundamental en la regulación del entorno que controla el desarrollo y la actividad de las células nerviosas. La MEC se encuentra entre las neuronas y las células gliales, y es influenciada por la liberación de diversas moléculas por parte de estas células, lo que contribuye a su composición. A medida que el sistema nervioso central (SNC) se desarrolla, la MEC experimenta cambios importantes que respaldan procesos como la

formación de nuevas neuronas, células gliales, sinapsis, migración celular, crecimiento axonal y orientación (Bandtlow y Zimmermann, 2000; Faissner et al., 2010). En la edad adulta, la MEC influye en aspectos como la supervivencia celular, plasticidad neuronal, respuesta a daños y regeneración (Meredith et al., 1993; Grimpe y Silver, 2002; Dityatev et al., 2010; Kwok et al., 2011).

Los cambios en el desarrollo de la MEC implican modificaciones tanto en cantidad como en composición. Durante el desarrollo embrionario temprano, hay una alta proporción entre MEC y masa celular que disminuye gradualmente hasta el momento del nacimiento. Al mismo tiempo, durante este período también se producen cambios en las proteínas de la matriz extracelular y los patrones de sulfatación de los proteoglicanos (Miyata et al., 2012).

La composición de la matriz extracelular (MEC) en adultos experimenta un cambio al finalizar el período crítico, momento en el cual se observa una mejora en la plasticidad sináptica tanto a nivel estructural como funcional (Galtrey y Fawcett, 2007; Carulli et al., 2010). En el sistema nervioso central adulto, la MEC se caracteriza por la expresión diferencial de moléculas y la presencia de redes perineuronales (PNN), lo que limita en gran medida la reorganización de procesos y el crecimiento axonal (Bruckner et al., 1993; Dityatev et al., 2007b; Carulli et al., 2010). A pesar de esta restricción, el sistema nervioso central adulto aún mantiene su capacidad para experimentar cambios estructurales, y esta revisión explora cómo manipular la MEC puede contribuir a potenciar dicha plasticidad.

### **3.4. El funcionamiento de la matriz extracelular y de la cicatriz glial en enfermedades neurodegenerativas como derrame, traumas cerebrales e Isquemia.**

Después de sufrir un accidente cerebrovascular isquémico, diferentes moléculas inhibitoras del crecimiento se expresan de manera distinta en la región cercana al área afectada. Específicamente, se observa un aumento significativo de las proteoglicanas de sulfato de condroitina (CSPGs) producidas por la

astrocitos reactiva en una pequeña área adyacente al núcleo del infarto donde ocurre una muerte celular parcial (Katsman et al., 2003). Estas CSPGs reguladas al alza, como el neurocan, fosfacan, brevicano y NG2, son similares a las encontradas en otras lesiones del sistema nervioso central (McKeon et al., 1999; Asher et al., 2000; Jones et al., 2003; Matsumoto et al., 2008). Cabe destacar especialmente el aumento considerable del versicano alrededor del área afectada por parte de las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), que son células asociadas con la formación de cicatrices en el sistema nervioso central (Fawcett y Asher, 1999; Asher et al., 2002; Carmichael et al., 2005).

Curiosamente, en áreas más distantes del área afectada por el infarto, se observa una disminución en la cantidad de CSPGs inhibitoras, especialmente en las redes perineuronales (PNNs), lo cual respalda la idea de que una parte de la región cercana al infarto crea un entorno propicio para el crecimiento axonal después de un accidente cerebrovascular (Katsman et al., 2003; Hobohm et al., 2005a; Karetko-Sysa et al., 2011). Recientemente, se han realizado investigaciones sobre los efectos de manipular las CSPGs mediante el tratamiento con la enzima condroitinasa ABC (ChABC) después de un accidente cerebrovascular in vivo (Hill et al., 2012; Soleman et al., 2012). Inicialmente se demostró en un modelo de accidente cerebrovascular isquémico en ratas ancianas que el tratamiento intrarraquídeo retardado con ChABC promovía la recuperación sensoriomotora de las extremidades anteriores. El tratamiento fomentó la ramificación colateral del tracto corticoespinal desde el hemisferio no afectado y se cree que la mejora funcional se debe a cambios plásticos en el circuito espinal, ya que ChABC no promovió protección neuronal. También se observó que ChABC descomponía las PNNs alrededor de las neuronas en la médula espinal, lo cual potencialmente reactivaría su plasticidad (Soleman et al., 2012).

Se ha observado que la respuesta del cerebro ante lesiones cambia a medida que envejecemos, lo cual afecta la plasticidad y la neurofisiología en personas mayores (Badan et al., 2003; Ward, 2005; Esiri, 2007). Es importante

destacar que estos hallazgos respaldan aún más la idea de que el ChABC puede mejorar la recuperación al aumentar la plasticidad de la médula espinal en un sistema nervioso central envejecido después de un accidente cerebrovascular isquémico. Esto se alinea con investigaciones anteriores que han demostrado cómo el ChABC puede influir en la plasticidad de la médula espinal en adultos (Galtrey et al., 2007; Cafferty et al., 2008; Tom y Houle, 2008). Además, se evaluaron los efectos del ChABC y una proteína estimulante del crecimiento llamada heparan sulfato proteoglicano (HSPG) en la región cercana a un área afectada por un accidente cerebrovascular isquémico (Hill et al., 2012). El tratamiento implicó una infusión directa dentro de esa área y se observó una reducción en el grosor de las cicatrices gliales astrocíticas junto con un aumento en los niveles de una proteína asociada a los microtúbulos. Además, se demostró que tanto el tratamiento con ChABC como con HSPG podían promover mejoras en la recuperación motora, posiblemente relacionadas con cambios en factores de crecimiento y procesos neuritogénicos (Hill et al., 2012).

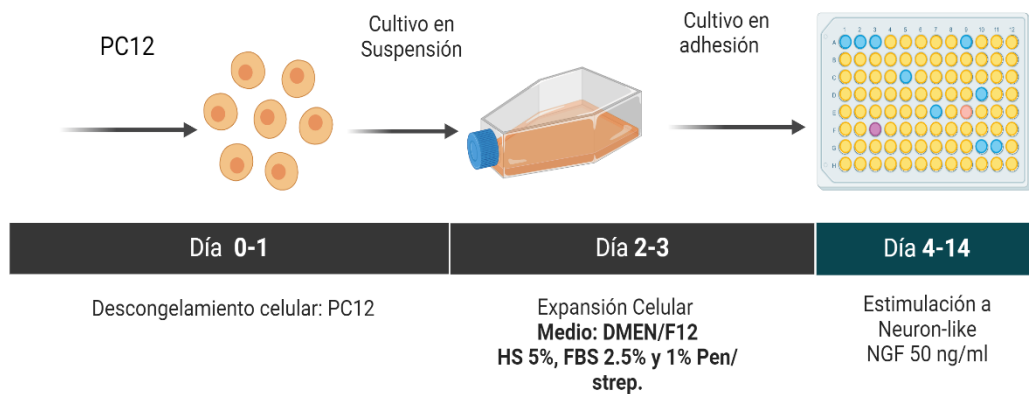
En resumen, estos estudios en conjunto muestran que apuntar a las CSPGs, ya sea cerca del área afectada por el infarto o en otras partes del sistema nervioso central después de un accidente cerebrovascular, puede promover la recuperación funcional. Esto sugiere que ChABC podría ser un candidato terapéutico para tratar el accidente cerebrovascular isquémico.

# **CAPÍTULO IV**

## **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1. Cultivo celular en suspensión y adherencia con la línea celular PC12:

Para el diseño experimental se utilizó la línea celular PC12 (CRL-1721) de la empresa ATCC. Esta línea celular fue mantenidas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 semanas para la realización de pases. El medio de cultivo empleado para su mantenimiento fue el siguiente: DEMEM/F12 suplementado con 10% de suero de caballo, 5% suero fetal bovino y 1% de estreptomicina/penicilina. Los pases 3-7 fueron utilizados para las placas experimentales. Para la adhesión celular, poli-D-lisina (0.5 mg/ml) fue usada para el recubrimiento de la superficie de las placas en todos los experimentos, según las publicaciones científicas más populares (Wiatrak et al., 2020; Mazia et al., 1975). Una vez recubierta las placas, se incubaron por 2 horas a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>, se lavaron 2 veces con PBS y se sembraron las células PC12 a una densidad:  $5 \times 10^4$  células/ml (placas de 24 pocillos) y  $2.5 \times 10^3$  células/ml (placas de 96 pocillos) (Diagrama A).



**Diagrama A.** Cultivo celular de PC12 en suspensión y en adherencia por para prueba en placas de 12 y 96 pocillos y para disociación en caso de cultivos dentro de los sistemas compartimentalizados de microfluídica.

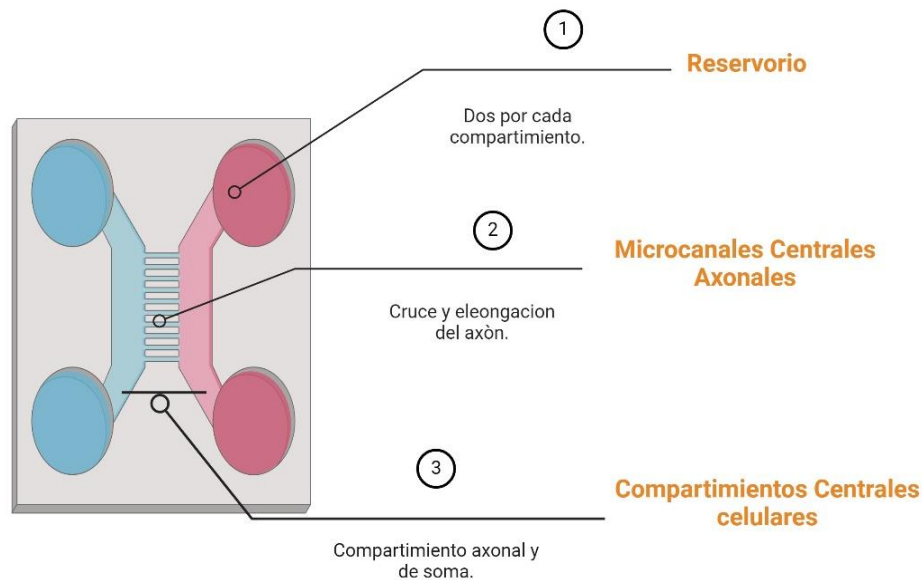
### 3.1. Establecimiento de Sistemas Compartmentalizados de Microfluídica en condiciones de cultivo:

Los sistemas compartmentalizados de Microfluídica fueron comprados a la empresa XONA Microfluidics Inc (<https://xonamicrofluidics.com/>), ya que ellos lo venden preensamblado y se seleccionó el microchip 450X. El cual posee una barrera de microranuras de 450  $\mu\text{m}$  de longitud. Los mismos, están hechos de copolímero de olefina cíclica y están preensamblados y son ópticamente transparentes. Lo que los hace únicos para microscopía confocal o de fluorescencia (**Diagrama B**).

Primeramente, se procedió a explorar el sistema compartmentalizado mediante microscopía confocal. Se tomaron microfotografías de los microcanales para adecuar el enfoque correcto, al igual que los pocillos principales (izquierda y derecha).

Lo segundo que se realizó fue una prueba de evaporación de medio y de sustrato para asegurar la adhesión celular una vez plantadas dentro del compartimiento celular. La prueba se realizó en lapsos consultados previamente en referencias bibliográficas de investigadores que han usado el mismo sistema.

Finalmente, se realizó una prueba con un modelo diferente de cultivo, fibroblastos epiteliales. Se revistió todos los pocillos y microcanales con un sustrato de PDL (0.5 mg/ml) y un segundo sustrato de adhesión celular de matriz extracelular de fibronectina (0.1 mg/ml). Luego de adherirse a los microchips los sustratos, se procedió a lavar los pocillos 3 veces con PBS y por último, se incubó el microchip por una hora a condiciones de cultivo con medio DEMEM/F12 suplementado. Para la siembra, se cultivaron los fibroblastos a una densidad celular de  $2 \times 10^4$  en el compartimiento A del microchip. Después de 20 minutos, los pocillos del microchip fueron rellenados con 125  $\mu\text{l}$  de medios de cultivo suplementado.



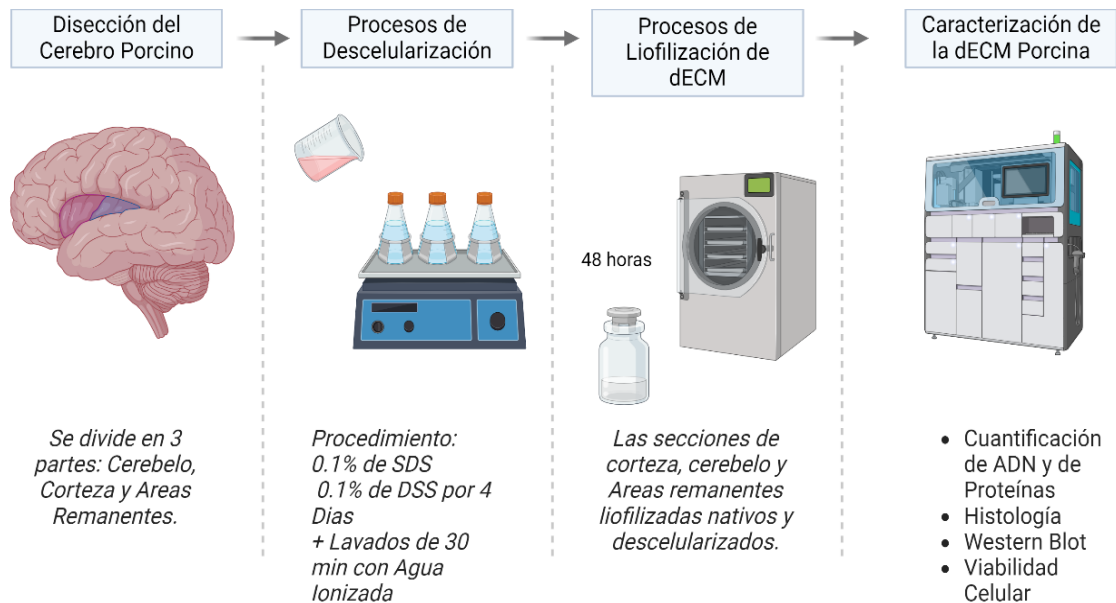
**DIAGRAMA B.** Descripción completa del Sistema Compartmentalizado de Microfluídica por parte del distribuidor XONA@chips.

Para la siembra de las células PC12 en los sistemas compartmentalizados de microfluídica se procedió a disociar los cultivos con jeringas estériles de 21-19 de porosidad, y se sembró una densidad de  $2 \times 10^4$  en 10  $\mu$ l de medio suplementado. Los cambios de medio se realizaron cada 32 horas sin remover el medio de cultivo de los compartimientos A y B, para eliminar el riesgo de producir burbujas en los microcanales.

### 3.1. Caracterización de Membrana Extracelular Cerebral Descelularizada: Corteza, Cerebro y Áreas Remanentes:

El tejido cerebral porcino fue extraído y diseccionado en tres regiones: Corteza, Cerebelo y áreas remanentes cerebrales. El proceso de descclularización fue ejecutado de acuerdo con la literatura consultada previamente (Reginensi et al., 2020; Crapo et al., 2012; DeQuach et al., 2011) (**Diagrama C**) la cual aplican la combinación métodos físicos y químicos que

propician una descelularización exitosa. Finalmente, los tejidos debidamente descelularizados fueron liofilizados y refrigerados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta uso experimental.



**DIAGRAMA C.** Esquema completo de flujo de trabajo para la implementación de las matrices celulares descelularizadas porcinas para estimulación celular en condiciones de laboratorio.

### 3.1.1. Cuantificación de ADN

Para la extracción del ADN de las 3 diferentes regiones cerebrales tanto nativas como descelularizadas se realizaron en base a protocolos publicados (Reginensi et al., 2020; Sambrook, 2001, page 549) con algunas modificaciones. Se pesó 1 mg de tejido liofilizado, y se resuspendió en un buffer de lisado SNET: 20 mM de tri-HCL (pH 8.0), 5 mM de EDTA (pH 8.0), 400 mM de NaCl y 1% (W/v) de SDS y proteinasa K (20 mg/ml). Se incubó el tejido con el amortiguador de lisado por 16 horas a  $55^{\circ}\text{C}$ . Luego, se añadió un valor igual de volumen de fenol:

cloroformo y se mantuvo en agitación por 15 minutos a temperatura estándar. Se centrifugó para separar las fases acuosas por 5 minutos a 14k RPM y se transfirió a otro tubo. Se precipitó el ADN añadiendo isopropanol y se refrigeró a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Finalmente, se precipitó el ADN y se centrifugó por 15 minutos. Se removió el isopropanol por decantación y se lavaron los pellets con etanol al 70% dos veces. Por último, se dejó secar por 15 minutos a temperatura ambiente y se disolvió el ADN en 100  $\mu\text{l}$  de TE (pH 8.0).

Una vez obtenido el ADN de las tres secciones nativas y descelularizadas, se procedió a cuantificar el ADN con un fluorómetro Qubit (Qubit tm 4 Fluorometer with WiFi/ Cat Q33238, ThermoFisher Scientific) usando el reactivo Qubit 1x dsDNA HS assay kit (Cat. No. Q33230/Thermofisher Scientific). Los controles experimentales fueron las regiones nativas cerebrales para comparar el tejido descelularizado.

### **3.1.2. Análisis Microbiológico de Matriz Cerebral Descelularizada:**

Se realizó una prueba microbiológica con agar a las 3 secciones cerebrales descelularizadas para verificar posibles contaminaciones en el cultivo en los experimentos de estimulación celular con matriz. Se tomó una pequeña alícuota de 1 a mg de ECM descelularizada y se diluyó en 0.5 ml de medio de cultivo (sin antibióticos). Se colocó una alícuota de 0.5 ml de cada muestra en sus respectivas placas y se dejaron en una incubadora durante 48 h para el cultivo bacteriano. Se tomaron imágenes de todas las placas en sus respectivos momentos finales para observar cualquier signo de crecimiento de colonias. Con el propósito de descartar alícuotas de tejido liofilizado descelularizado contaminadas.

### **3.1.3. Análisis de Proteínas:**

Para la cuantificación de las proteínas dentro del entorno de las matrices nativas y descelularizadas cerebrales, se usó el kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher N° 23225). En el cual se pesó 0.5 gramos del tejido liofilizado de las tres secciones (Corteza, Cerebelo y Áreas Remanentes) y se sonicó con lisis buffer (TRIS-cloruro de hidrógeno 50 mM, pH 7,4, que contiene cloruro de sodio 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1,2%, desoxicolato de sodio al 0,5% y SDS al 0,1%. ) por 10 minutos y se incubó a 4° C por 12 horas. Por último, se siguieron las indicaciones de fabrica del kit de cuantificación de proteínas, replicando 6 veces cada muestra. Se leyó el plato servido a 580 nm con un espectrofotometro/lector de placas de 96 pocillos (ACCURIS Modelo # MR9600).

### **3.1.4. Análisis de glucosaminoglicanos (GAG) y los proteoglicanos:**

Dentro de este estudio se cuantificaron los glucosaminoglicanos (GAG) y los proteoglicanos que contienen la matriz nativa y descelularizada cerebral porcina porque proporcionan un apoyo biofísico esencial, incluso actuando como andamios y manteniendo la hidratación del cartílago. Además, desempeñan un papel vital en los procesos bioquímicos, incluida la adhesión y la señalización celulares. Este ensayo se realizó con “ Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan (sGAG) Assay Kit” (Biocolor N° B1000) y se siguieron todas las instrucciones del distribuidor. Como control de este ensayo se estipulo los nativos de cada sección.

### **3.1.5. Western Blot:**

El contenido de esta sección experimental fue realizado como los protocolos de literatura realizada previamente revisada (Reginensi et al., 2020; Ha et al., 2023). Con el tejido previamente liofilizado y mantenido a -20° C de la tres

secciones, se procedió a lizarlos con la solución amortiguadora RIPA (Radioinmunoprecipitación), compuesto con TRIS-cloruro de hidrógeno 50 mM, pH 7,4, que contiene cloruro de sodio 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1,2%, desoxicolato de sodio al 0,5% y SDS al 0,1%. Luego, se procedió a sonicar los tubos por 4 minutos, y se incubaron a 4°C por 12 horas. Una vez incubado, se procedió a centrifugarlo a 14,000 RPM por 20 minutos, y se recolectó el sobrenadante guardándose con la solución amortiguadora de carga con bromofenol y  $\beta$ -mercaptoetanol hasta correr las muestras a -20°C. Para la separación de proteína mediante la electroforesis, se escogieron las concentraciones de los geles en un ratio de 4%:12% de bis/acrilamida y con una corrida a 125 V. Para la transferencia, se usó una transferencia semi seca con un Sistema de Trans-Turbo de Transferencia (Bio-Rad # 1704150). Luego, las membranas se bloquearon con solución salina tamponada con Tris con 0,05 % de Tween-20 (TBS-T) y 5 % de leche descremada y se incubaron durante la noche con  $\alpha$ -tubulina monoclonal de ratón (1:3000, T8203, Sigma Aldrich) y Neu monoclonal de ratón. -N (1:1000, MAB377, Sigma Aldrich) y LAMIN A/C monoclonal de ratón (1:500, Biolegend). Las membranas se lavaron en TBS-T y se incubaron durante 2 h con anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:10000, HAF018, R&D System). Como control se usó el anticuerpo b-Actina monoclonal de ratón (1:5000 Abcam) La detección de bandas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA) y con el instrumento C-Digit de **LI-COR** para revelación del bandeo.

### **3.1.6. Análisis Histológico:**

Con tejido fresco y diseccionado en las tres partes principales a evaluar, estos fueron seccionados en cortes de  $2 \times 2 \text{ mm}^2$  y fijados al 10% de formalina por 24 horas, en consecuente, se deshidrataron los tejidos en una serie de etanol a

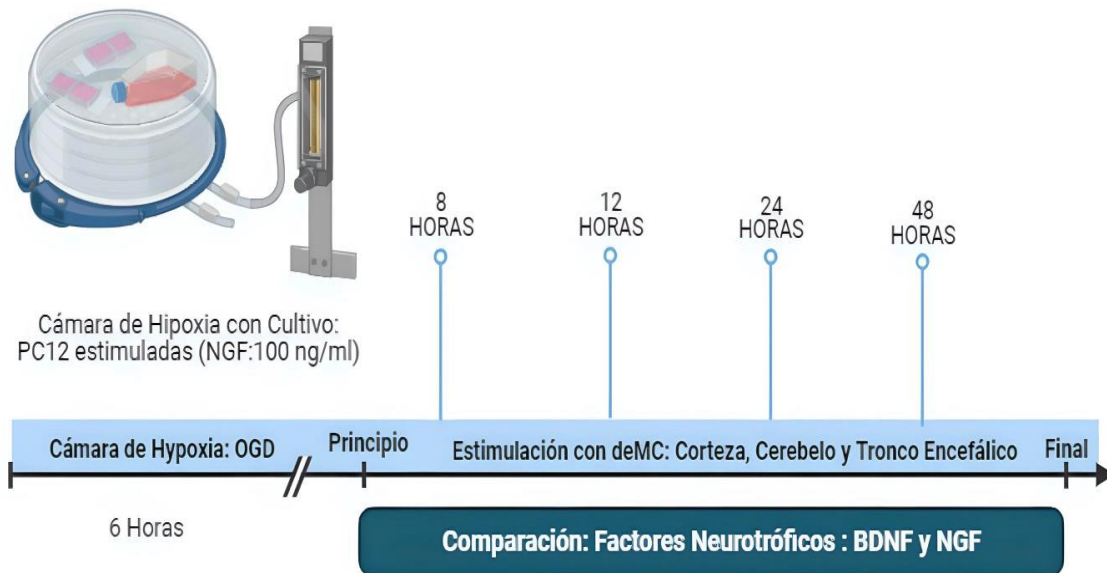
diferentes gradientes dos veces por el período de una hora (70%, 95% y 100%) (Reginensi et al., 2020; Granato et al., 2020). Las muestras deshidratadas se colocaron en xileno dos veces durante 1 h antes de su inclusión y bloqueo en parafina (Leica Paraplast, N° de catálogo 39601006) dos veces durante 2 h. Las muestras se seccionaron en un microtomo (Ted Pella, microtomo rotatorio manual HMT-2260) ajustado a un espesor de 5  $\mu\text{m}$ , se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina y tinción Eosina (H&E), azul de Coomassie, Alcian Blue, Luxol fast Blue y PAS ( Periodic Acid-Shift) siguiendo protocolos estándar para el análisis estructural, como se describió anteriormente (Siegert et al., 2017, Mungenast et al., 2023). Las imágenes se adquirieron utilizando técnicas estándar de campo brillante en un microscopio invertido IM70 (Olympus IM70, microscopio de contraste-fase invertida).

### **3.1. Modelo de Deprivación de Oxígeno y Glucosa (OGD) para estudio de efecto de recuperación de la Matriz cerebrales en células estimuladas PC12:**

En este experimento, las células PC12 se cultivaron en una placa de 96 pocillos hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Luego, se añadió el factor NGF (concentración de 100 ng/ml) a las células y se estimuló hasta observar diferenciación durante 7 días. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con DMEM/F12 y, a continuación, se expusieron a condiciones hipóxicas durante 6 horas: incubación a 37°C con 0,3% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> y 94% de N<sub>2</sub> en una cámara de incubación citocéntrica (controlador ProOx110, Biospherix) (Chua et al., 2021; Singh et al., 2020) y medio condicionado hipóxico: DMEM/F12 suero libre y glucosa (**Diagrama D**). Después de 6 horas, se pesaron 0,1 mg de ECM liofilizada de corteza, cerebelo y áreas restantes y se disolvieron en DMEM/F12 (500  $\mu\text{l}$ ). La matriz descelularizada cerebral de las tres regiones solubles se utilizaron para estimular las células y monitorizar la tasa de recuperación a las 8, 12, 24 y 48 horas. Se tomó como control negativo medio desoxigenado (DEMEN-

libre de suero y glucosa), y como control positivo, células estimuladas con los factores NGF y BDNF (100 ng/ml) para observar el efecto reparador de la MEC descelularizada.

## Plan Experimental: MODELO OGD en Células P12



**Diagrama D.** Evaluación de Privación de Oxígeno y Glucosa (OGD) en células tratadas previamente con el factor NGF (100 ng/ml) y su período de recuperación en intervalos de 8,12,24,48 horas de estimulación con factores neurotróficos y solubles provenientes de matriz extracelular descelularizada cerebral.

### 3.2. Evaluación de Viabilidad Celular: Estimulación con Matrices Extracelulares Cerebrales descelularizadas y su efecto en recuperación axonal.

Durante el experimento, se midió la viabilidad de las células mediante el ensayo de reducción mitocondrial. Para ello se usó el ensayo XTT, conocido como 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida. El principio de este ensayo se basa en que las deshidrogenasas mitocondriales de células viables reducen el XTT (que es amarillo en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) para producir un producto de formazán naranja. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (ATCC, XTT Cell Proliferation Assay Kit/30-1011K). Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C con el reactivo XTT, y se colocaron en un agitador orbital durante 1 minutos antes de medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas Multiskan FC (CAT. 51119000, Thermofisher) para evaluar la cantidad de producto formazán en todas las placas. Los resultados se expresaron en porcentajes de viabilidad (absorbancia medida) y se compararon con los controles en condiciones normales de cultivo, así como con los expuestos a factores neurotróficos (p.ej., NGF, BDNF) y estimulación con ECM de corteza, cerebelo y áreas restantes para observar sus efectos. Se evaluó la viabilidad celular en presencia cdECM de tres regiones diferentes tras condiciones de hipoxia (OGD, durante 6 horas) para análisis posteriores.

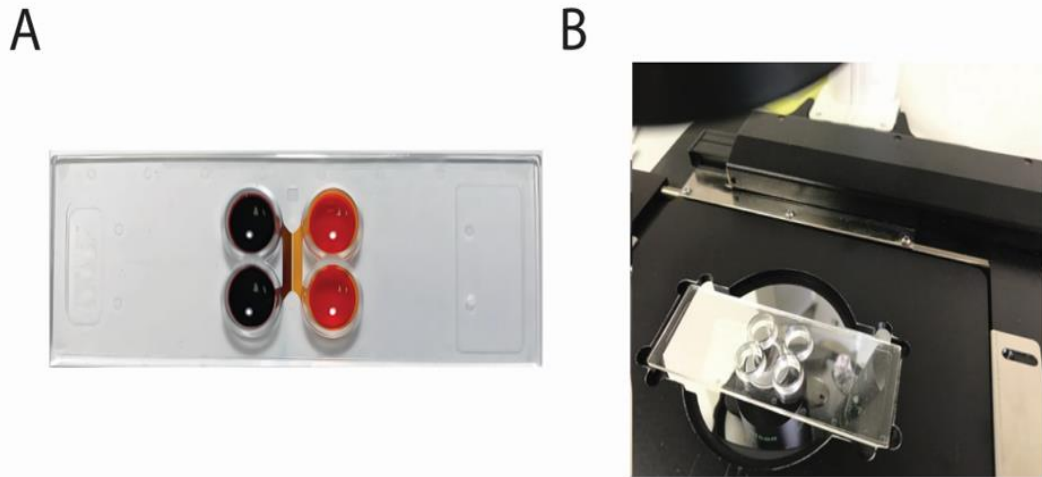
### **3.3. Análisis Estadísticos:**

Los datos obtenidos se analizaron en el programa GraphPad Prism 10.1, igualmente, para la creación de los gráficos y el uso de diferentes pruebas estadísticas como Tukey, t- test, ANOVA de una o dos vías. Se consideró el valor  $p < 0.05$  estadísticamente significativo en todos los experimentos y como  $p < 0.001$ .

# **Capítulo V**

## **Resultados**

**5.1. Los Sistemas Compartimentalizados de Microfluídica son capaces de mimetizar el ambiente neuronal en co-cultivos y a baja densidad celular.**



**Figura 1.** Dispositivos pre-ensablados de XONACHips para estudios neuronales. A) Diseño X150 con doble compartimiento. B) Transparencia y Traslucides del microchip XC150 para tomas microscópicas fluorescentes.

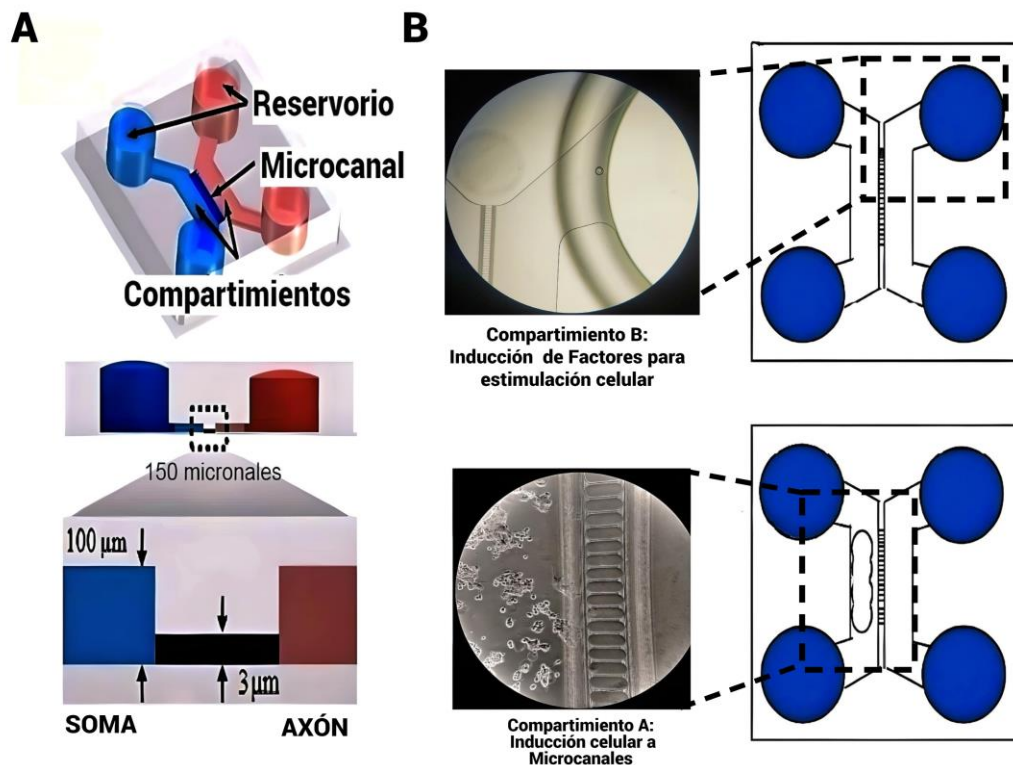
Los sistemas de microfluídos compartimentados son dispositivos o plataformas que utilizan tecnología de microfluídos para crear compartimentos separados y aislados dentro de un solo dispositivo (Taylor, et al 2005). Estos compartimentos permiten estudiar diferentes tipos de células o tejidos de forma independiente mientras mantienen interacciones controladas entre ellos. En el contexto del Sistema Nervioso Central (SNC), estos sistemas han sido particularmente valiosos en el avance de la investigación en neurociencia de varias maneras como el crecimiento de neuronas en cámaras separadas, creando finalmente circuitos neuronales específicos que imitan la arquitectura del SNC con mayor precisión. Además, al cultivar diferentes tipos de neuronas en distintos compartimentos, los investigadores pueden estudiar sus interacciones y comunicación en condiciones controladas (Taylor & Li, 2011). Otra ventaja de los

sistemas compartimentalizados es la observación 2D-3D de las Interacciones axón-dendrita. Las neuronas en el SNC tienen extensiones largas llamadas axones y dendritas que se conectan con otras neuronas o células diana. Los sistemas de microfluidos han sido fundamentales para estudiar la guía y el comportamiento de los axones y las dendritas en entornos aislados, lo que ha llevado a una mejor comprensión del desarrollo y la regeneración neuronal, como también el transporte axonal, la síntesis proteínica de ellos axones, la regeneración axonal y la señalización axón-soma (Nagendran et al., 2018).

Estos sistemas han sido de gran ayuda en estudios neuronales que ahora han sido industrializados y comercialmente vendidos (p.d XonaChips) pre-ensamblados (**Figura 1 A-B**) y hechos de PDMS o plástico, adecuado para la obtención de imágenes de fluorescencia a alta resoluciones. Han sido diseñados con propiedades hidrofílicas permitiendo el ensamblaje de microchip a una capa fina del Copolímero de olefina cíclica (COC) de los canales del microchip en la parte inferior (**Figura 1 B**).

Para el desarrollo de esta investigación se obtuvo el microchip Modelo X150C (**Figura 1 A**), con un tamaño en base de 75 mm y 25 de ancho, debido a la longitud de su barrera de microcanales, la que permite una elongación axonal de 150  $\mu\text{m}$  como estándar. Como se puede observar en la **figura 2(A-B)**, describe en su totalidad el sistema compartimentalizado, constituyéndolo en 4 pocillos de reserva de medio de cultivo (Volumen total de 180  $\mu\text{l}$  cada uno), una barrera central de microcanales (3 $\mu\text{m}$  de anchura) y 2 compartimiento (soma y axón) adecuados para el cultivo de neuronas. Este tipo de dispositivo está diseñado con microsurcos que no solo aíslan los axones, sino que también guía físicamente los axones para que se desarrollen en línea recta, lo que permite una fácil manipulación experimental y análisis cuantitativo automatizado del crecimiento de axones (**Figura 2 B (Compartimiento A)**). Los pocillos reservorios de medio están conectados a dos compartimientos de microchip: se caracterizaron como compartimiento A (soma /lado derecho) y compartimiento B (axón / lado izquierdo).

Ambos sirven para cultivos celulares, depende del experimento que se realice. Este tipo de microchip no posee un flujo constante, sino estable lo que dificulta la inducción de líquidos (p. d medios de cultivo) dentro de los compartimientos. Para lograr que los microcanales de la barrera central y los compartimientos no tuviesen burbujas, se estandarizó un protocolo para realizar los reactivos que proporcionarían la adhesión celular y el medio de cultivo dentro del microchip y se procuró que todos los reactivos estuvieran a temperatura ambiente. Primeramente, se utilizó un pre-sustrato XC para una mejor adhesión de la poli-L-Lisina y fibronectina dentro de los compartimientos. Para la inducción de los sustratos y medios se llenaron los reservorios superiores con 100 ul y se esperaron 6 minutos para que fluyera dentro de ambos compartimientos y traspasara los microcanales de la barrera central. Luego, se llenaron los reservorios inferiores y se esperó 10 minutos para nivelación del flujo en cabina de flujo laminar. Para retirar sustratos y lavados se realizó el mismo procedimiento. Todos los sustratos de adhesión se incubaron a 4° C por 16 horas, especialmente los de sustratos provenientes de la matriz extracelular. Una vez revestido el microchip con los sustratos, se agregó los medios de cultivo de la forma anteriormente descrita y se incubó el microchip a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> por una hora hasta siembra. Se tomó en cuenta que después de la siembra los compartimento A y B no deberían quedar vacíos ya que esto propicia la creación de burbujas en microcanales conllevando a la muerte celular dentro del microchip. Para el mantenimiento y evitar la evaporación de medio de cultivo se calculó que un rango de 20-32 horas se debe rellenar todos los reservorios del microchip.

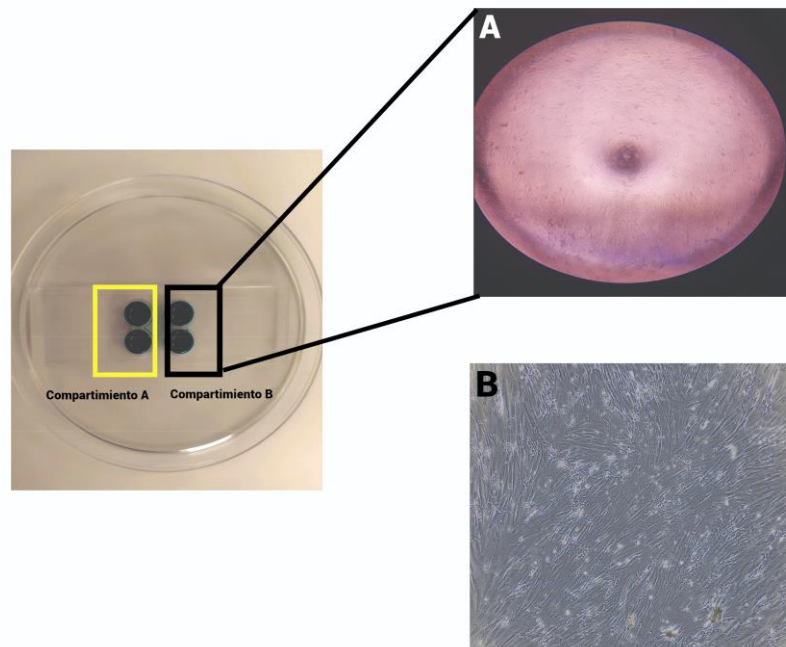


**Figura 2.** Sistemas Compartimentalizados de Microfluídica con una longitud de  $X150 \mu\text{m}$  en los microcanales. A) Diagramas y medidas de las áreas relevantes del microchip: Microcanal (Área de cruce de los axones), Compartimiento axonal de estimulación y compartimiento somal y axonal. B) Compartimientos A y B del microchip (soma y axón) para entendimiento compartimientos principales para estimulaciones futuras.

En el marco de un estudio experimental, se llevó a cabo una siembra de cultivo de prueba utilizando fibroblastos en sistemas Compartimentalizados. Este experimento se extendió durante un período de 32 días para observar la adhesión celular dentro del microchip (**Figura 3 A-B**). Durante el desarrollo del cultivo, se implementó un protocolo riguroso que implicaba cambios regulares de medio de cultivo. Cada 32 horas, se realizaban cambios de medio con el fin de proporcionar a los fibroblastos las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo en los sistemas de microfluídica.

La elección de fibroblastos como tipo celular y la utilización de sistemas compartimentalizados de microfluídica permitieron un control preciso de las condiciones del cultivo y la observación detallada de las interacciones celulares en un entorno microscópico. Estos sistemas proporcionaron ventajas significativas en términos de observación y manipulación celular a nivel microscópico, lo que facilitó la obtención de datos valiosos sobre el comportamiento de los fibroblastos a lo largo del período de 20 días.

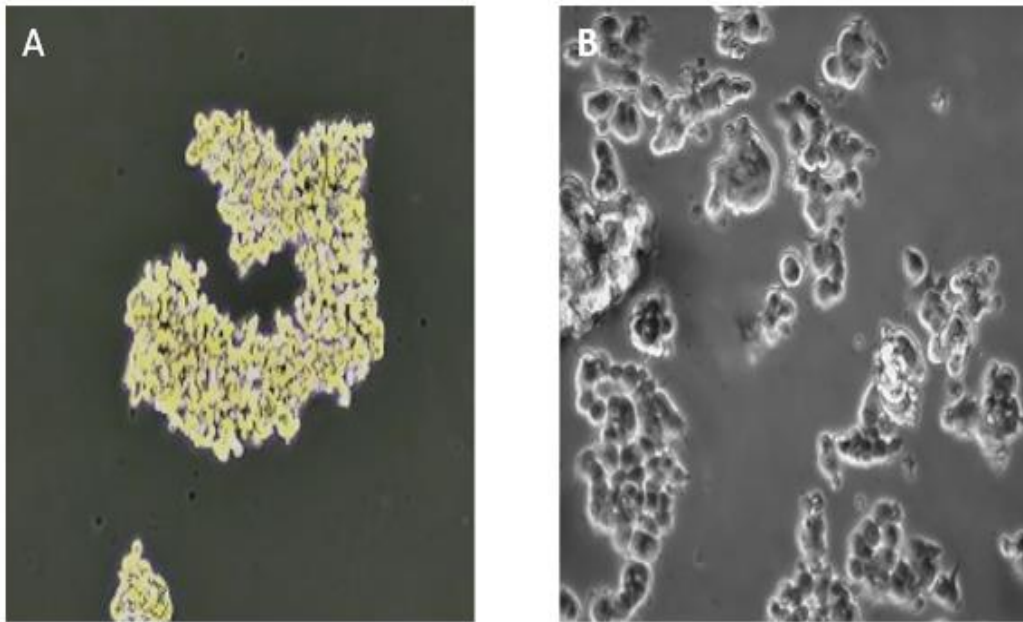
El objetivo final de esta siembra de cultivo de prueba en sistemas compartimentalizados de microfluídica era comprender mejor las dinámicas celulares y las respuestas a los cambios en el entorno celular a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos en este estudio podrían tener aplicaciones importantes en la investigación biomédica y el desarrollo de terapias celulares.



**Figura 3.** Inducción de cultivo de fibroblastos epiteliales (A) dentro de los compartimentos del microchip y mantenimiento como método de viabilidad celular. B) Cuarto día de mantenimiento celular dentro del microchip.

## **5.2. Cultivos Celulares De Línea PC12 De feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata: Línea celular para modelos de biomimetismo de daño cerebral con los Sistemas de Microfluídica.**

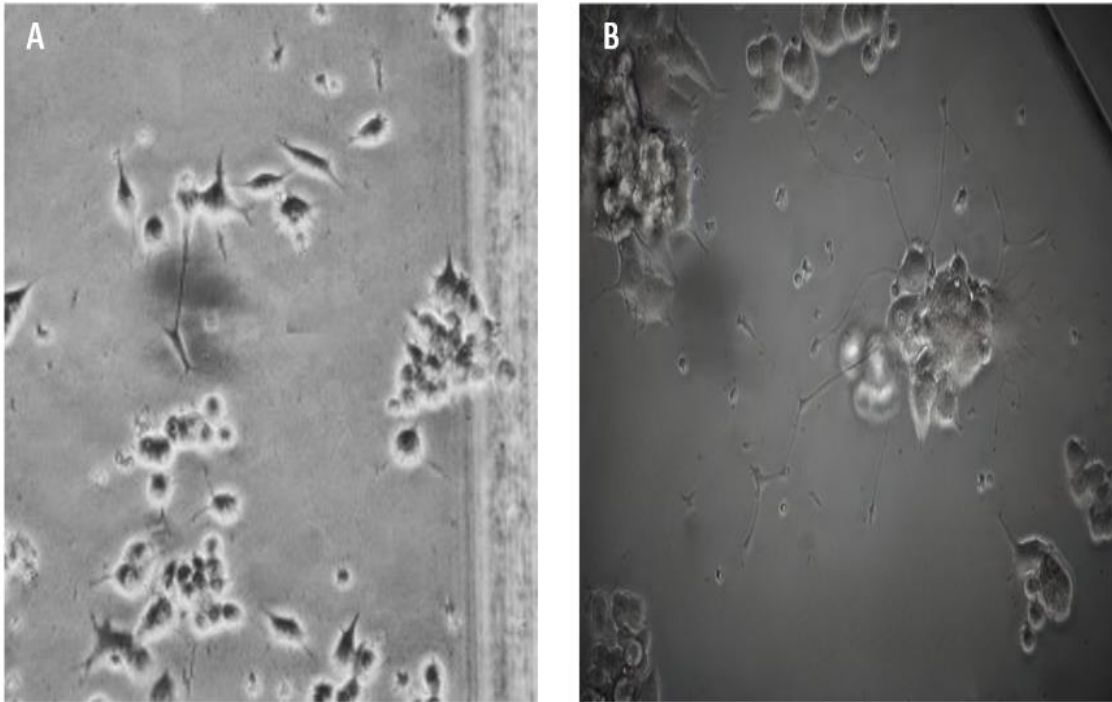
Las células PC12 son una línea celular ampliamente utilizada en la investigación neurocientífica, especialmente para estudiar la diferenciación neuronal y la función de las células nerviosas (**Figura 4 A-B**). Y una de las razones principales de usar PC12 en los modelos de investigación es por la “Semejanza con células neuronales”. Las células PC12 provienen de un tumor de médula suprarrenal de rata y comparten muchas características con las células neuronales. Aunque son de origen tumoral, las PC12 son ampliamente utilizadas como un modelo in vitro para estudiar la diferenciación neuronal y la función de las células nerviosas. El factor de crecimiento Neuronal NGF posee un efecto de no multiplicación celular y extensión de neuritas (Greene, 1978; Soligo et al , 2019) y no conlleva las células a un estado de apoptosis. Además, este factor desempeña un rol esencial para la viabilidad y el mantenimiento de neuronas simpáticas y sensoriales. Su ruta de acción va desde la unión al receptor de tirosina cinasa de alta afinidad, trkA, lo que resulta en la fosforilación del receptor y la activación posterior de las vías PI3K, Akt y GSK3 $\beta$ . Lo bueno es que su activación facilita las reorganizaciones estructurales no morfológicas necesarias en el citoesqueleto de las neuronas y sus extensiones (Hur et al, 2010; Hermida et al., 2017)



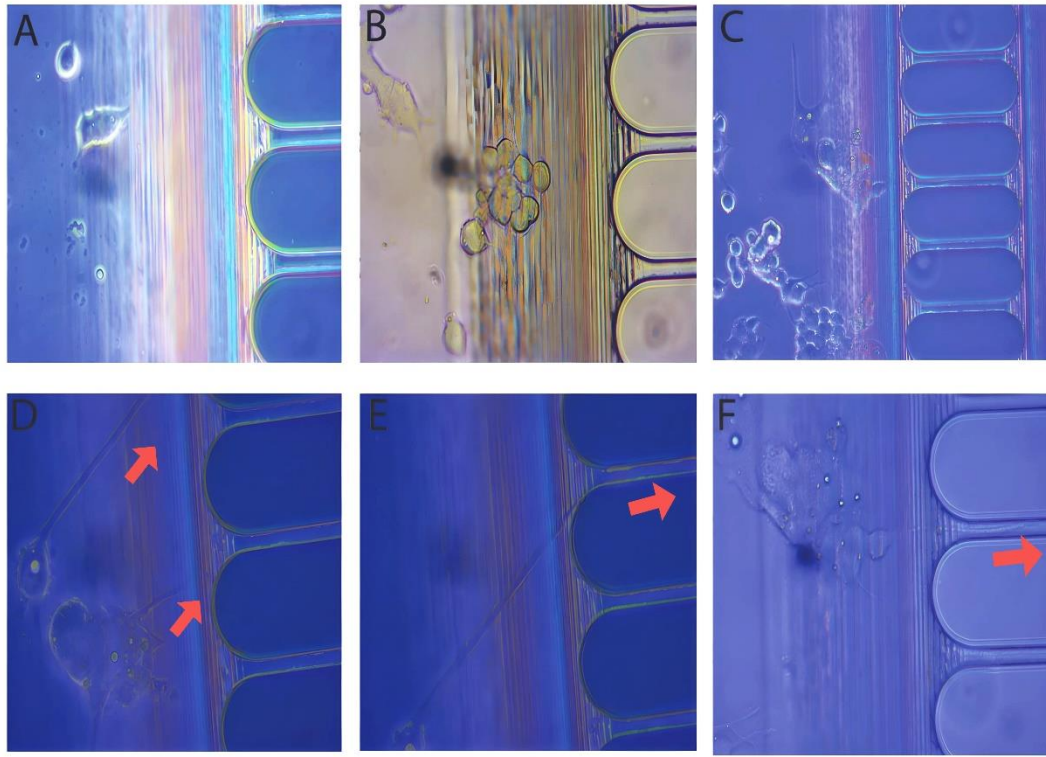
**Figura 4.** Crecimiento y mantenimiento de cultivo PC12 A) en suspensión y B) en adhesión con PDL (Con. 0.5 mg/ml). Medio de Cultivo DEMEM/F12, 1% Antibiótico, 15% DHS y 10% FBS.

En nuestro plan experimental, se estandarizó la siembra celular y su estimulación con el factor de crecimiento neuronal ( NGF a una concentración de 100 ng/ml antes de realizar un cultivo dentro del microchip (**Figura 5 A-B**). En el cual se logró una estimulación estándar y completa al séptimo día de estimulación a la misma concentración 100 ng/ml. No se notó efecto alguno en la elongación de las neuritas después del día 9-12. Se utilizaron jeringas de 21-19 Gauge en tamaño para lograr una disociación celular en unidad y garantizar una estimulación a una morfología parecida a las de las neuronas. Una de las observaciones realizadas en esta parte del proyecto fue la disociación de las células, entre más estén separadas, aún más se observarán elongaciones de axones. Aunque queden en cluster, la diferenciación ocurre, pero al día 14, los cluster con las células diferenciadas empiezan a levantarse. Como también, se observó la migración celular con cluster al estar presente en las cámaras del microchip hacia los microcanales. Ya que se estimuló previamente las células,

antes de privar del factor NGF el compartimiento somal (A) por 4 días y luego, solo se estimuló el compartimiento axonal (B). Las células al día 15 se juntaron el canal y algunos cuerpos celulares cruzaron completamente hasta el otro lado (**figura 6 A-F**). Lo que nos confirma la necesidad de un cambio de línea celular para próximos experimentos.



**Figura 5.** Inducción a Diferenciación celular de PC12 con **factor NGF** (Concentración 100 ng/ml). **A)** Tercer día de estimulación con NGF. **B)** Quinto día de estimulación dentro del compartimiento A del microchip.



**Figura 6.** Diferenciación a morfología Neuronal con PC12 dentro de los compartimientos somales del Microchip XC150. Para lograr el efecto de cruce de las neuritas en los microcanales, se estimuló con 10 ul de el compartimiento B para el cruce de los axones. **A)** Día 3 de estimulación en compartimiento A. **B)** Día 4 de estimulación en compartimiento A Y B (10 ul de NFG). **C)** Día 5 de estimulación con factor NGF en el compartimiento A. **D)** Día elongación de los axones en la barrera central. **E-F)** Migración celular de neuritas en microcanales.

Las PC12 al ser una línea de alta proliferación celular y por su morfología de extensión-neurita ha sido tomada como un modelo en diversos estudios de neuroprotección con fármacos ante traumas cerebrales, derrames, isquemia cerebrales e hipoxia. Desde 1992 en estudios dedicados a la hipoxia e isquemia (Carroll et al., 1992), se han ejecutado los modelos in vitro con la línea celular PC12, empezando con estudios dedicados a los temas de oxidación en la muerte

neuronal por casos de hipoxia ( en ese caso de estudio , una hipoxia química con KCN). Han sido de gran ayuda la PC12 para el desarrollo de nuevos fármacos con investigaciones dedicadas, por ejemplo, a las propiedades y funciones de los péptidos como el VIP ( Péptido Intestinal Vasoactivo) ( Sigalov et al., 2000) para observar el efecto del lipofílico súper activo del VIP (Stearyl-Norleucine17-VIP; SNV) para la neuroprotección del efecto de una hipoxia de corto plazo, donde tuvieron valores estables en la viabilidad celular mediante el test LHD. Por otro lado, en estudios recientes, los modelos de PC12 se han usado para investigaciones in vitro explorando los trastornos neurológicos, especialmente en el contexto de la isquemia y la hipoxia, que pueden llevar a la rigidez de los filamentos de actina, la neurodegeneración y la disminución de la plasticidad sináptica. Barbakadze y su grupo de investigación (2023) trabajo la hipótesis centrada en la posibilidad de que las hormonas tiroideas, actuando a través de la integrina  $\alpha\beta3$ , modulen la reorganización de los filamentos de actina durante la hipoxia y mejoren la supervivencia de las células neuronales. Reportando finalmente que la hormona T3 desencadena una serie de eventos significativos. Conduce a la desfosforilación de la quinasa Fyn a través de la integrina  $\alpha\beta3$  ( $P=0.0010$ ), influye en la proporción de actina G/F ( $P=0.0010$ ) y activa la vía Rac1/NADPH oxidasa/cofilina-1 ( $P=0.0069$ ,  $P=0.0010$ ,  $P=0.0045$ ). En última instancia, T3 demuestra la capacidad de mejorar la viabilidad de las células PC-12 durante condiciones hipóxicas ( $P=0.0050$ ) al involucrar los sistemas reguladores aguas abajo dependientes de la integrina  $\alpha\beta3$ . Dando en conclusión a conocer posibles implicaciones terapéuticas de las hormonas tiroideas en el contexto de los trastornos neurológicos. Sin embargo, la línea celular PC12 es usada comúnmente como modelo celular por su alta multiplicidad celular, es importante resaltar que las PC12 no son células neuronales naturalmente, poseen un fenotipo similar al neuronal y su comportamiento. Si se desean modelos certeros para ser llevados a terapias humanas, es recomendable cambiar el modelo celular o trabajar modelos animales en sí. Otros tipos de células como las células progenitoras neuronales o las células pluripotentes son utilizadas para

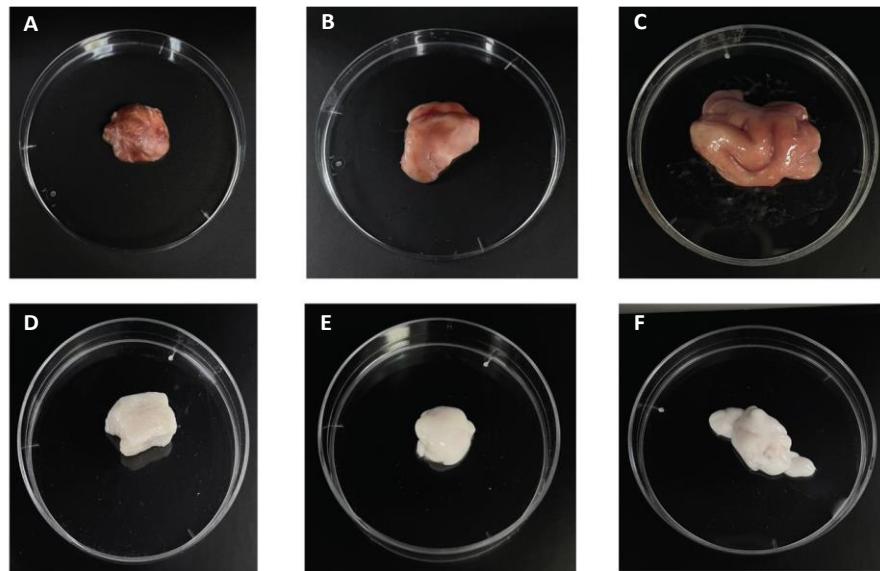
análisis de respuestas específicas humanas antes traumas cerebrales o hipoxia, mimetizando de una mejor forma el ambiente neuronal del cerebro humano. Siendo este el órgano más complejo del cuerpo humano y el cual no posee ciertas características cuando se está en desarrollo (infantes), y unas de las enfermedades que más afecta a los neonatos y sus complicaciones al nacer es la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) (Huang et al., 2022). Este grupo de investigación con el Dr Huang y su grupo de colaboradores (2022) realizó estudios con el objetivo investigar el potencial terapéutico de las células estromales ectomesenquimales derivadas de células madre pluripotentes humanas (hPSC-EMSCs) en un modelo de rata de encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI), una complicación grave en neonatos e infantes. Se compararon las hPSC-EMSCs con las células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical humano (hUC-MSCs) en cuanto a sus efectos neuroprotectores. Los resultados revelaron que las hPSC-EMSCs mostraron una neuroprotección superior, redujeron el daño cerebral, promovieron la neurogénesis y mitigaron las respuestas inflamatorias en comparación con las hUC-MSCs. Además, el medio condicionado (CM) derivado de las hPSC-EMSCs tuvo efectos neurorestauradores, mejorando el crecimiento de las neuritas y la diferenciación neuronal. Este estudio resalta el potencial de las hPSC-EMSCs para el tratamiento de la EHI debido a sus actividades neuromoduladores multifacéticas, lo que sugiere una prometedora vía terapéutica.

En conclusión, la línea celular PC12 es usada por sus características en apariencia y comportamiento similar al neuronal, su alta proliferación celular, bajo costo y por la simpleza de manejo en modificaciones genéticas. A pesar de todos estos puntos a su favor, los modelos aceptados para ensayos clínicos para terapias de enfermedades neurológicas se basan en resultados de células humanas y del mismo linaje. Lo que nos quiere decir que la PC12 son grandiosas para la estandarización de modelos e indicios de hipótesis para desarrollar a futuro modelos adecuados a los objetivos de investigación.

### 5.3. La Matriz descelularizada del Cerebro porcino: Evaluación morfológica y bioquímica de los procesos de descelularización.

#### 5.3.1. Evaluación Bioquímica:

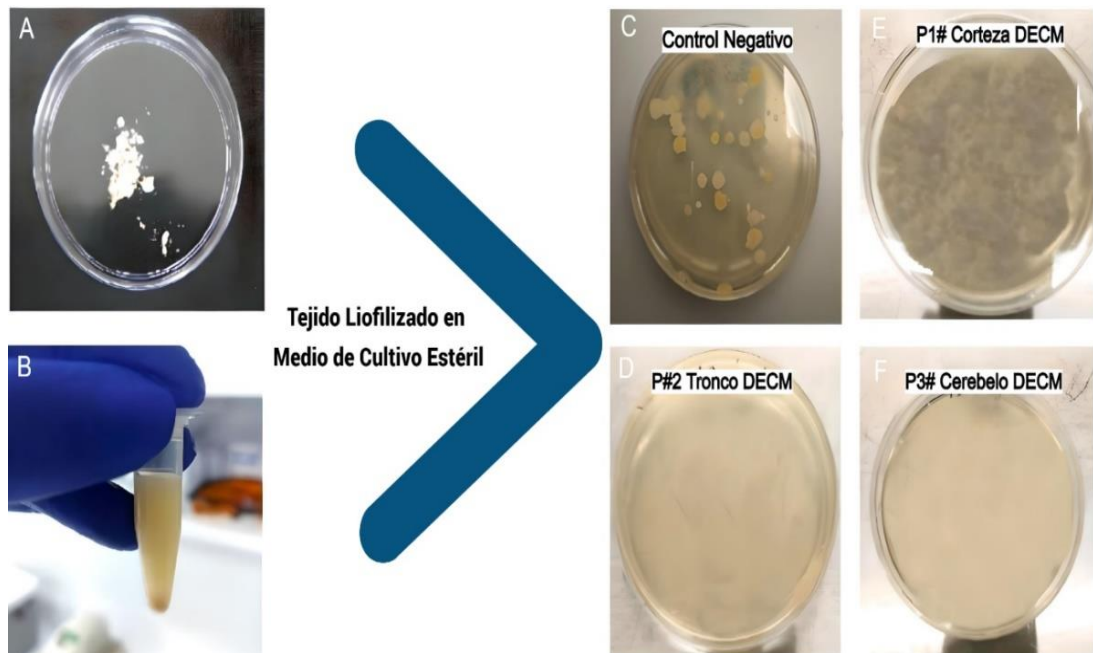
Los procesos de descelularización realizados como los protocolos de fueron exitoso como se presenta en la figura 7, donde los Nativos ( **Figura 7 A-C**) muestras un color rojizo diferente a los de los tejidos descelularizados (**Figura 7 D-F**). Los tejidos descelularizados presentaron una reducción en peso y debilidad. Un vez descelularizados, fueron liofilizados y guardados a -80 C.



**Figura 7.** Culminación de procesos de Descelularización de la Matriz extracelular cerebral descelularizada porcina. **A)** Partes del cerebro porcino estimadas para el estudio de descelularización de matrices extracelulares: Corteza, Cerebelo y áreas remanentes SIN liofilizar. Resultados por sección

**NATIVOS:** **A)** Corteza, **B)** Cerebelo y **C)** Áreas Remanentes.  
**DESCELULARIZADOS:** **D)** Corteza, **E)** Cerebelo y **F)** Áreas Remanentes.

Primeramente, se realizaron las pruebas microbiológicas (**figura 8 A-B**) con la intención de demostrar que las muestras liofilizadas no presentaran ninguna evidencia de crecimiento de colonias tanto en las muestras nativas como descelularizadas (**Figura 7 C-F**). Se enfatizó en la esterilidad del material descelularizado ya que entraría en contacto con los cultivos celulares mediante los medios suplementados para estimulación. El período de la prueba fue de 48 horas el cual no presentaron colonias, dando en un 95% esterilidad para su uso como proteína soluble para cultivos.

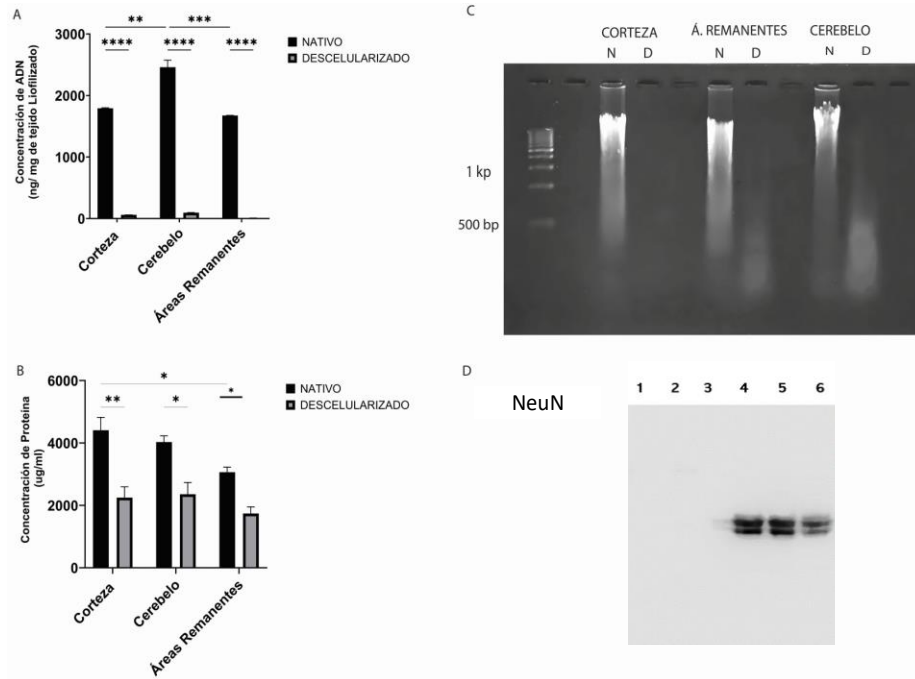


**Figura 8.** Caracterización y Solubilización de matriz extracelular cerebral descelularizada porcina. **A)** Partes del cerebro porcino estimadas para el estudio de descelularización de matrices extracelulares: Corteza, Cerebelo y áreas

remanentes liofilizados. **B)** Preparación de tejidos en medio de cultivo para evaluación microbiológica. **C)** Prueba control Negativo **D)** Resultados de Áreas Remanentes **E)** Corteza **F)** Cerebelo.

Como su nombre indica, una de las propiedades características de la matriz extracelular decelularizada (ECM) es la eliminación del contenido celular en el tejido, que generalmente se mide de forma indirecta a través de la cuantificación de ADN. Tras la disección del cerebro en tres subregiones distintas (es decir, corteza, cerebelo y áreas restantes), las secciones se procesaron de forma independiente y se liofilizaron para su almacenamiento y evaluación biomolecular. La eficacia de nuestro protocolo de decelularización en la eliminación de componentes celulares se confirmó mediante diferentes ensayos. La cuantificación de ADN a través del ensayo de dsDNA QUBIT, después del proceso de decelularización, reveló una considerable disminución en el contenido de ADN. El contenido de ADN en el tejido cerebral nativo varió entre las diferentes subregiones y se redujo considerablemente después de la descclularización (**Figura 9 A**). El cerebelo, que era la subregión del cerebro con mayor contenido celular, mostró la mayor disminución en la concentración de ADN. En cuanto a la corteza nativa disminuyó en un 88%, el cerebelo en un 90% en el cerebelo y del 92% en las áreas restantes después del tratamiento de descclularización. Aunque las condiciones iniciales de las tres subregiones del cerebro fueron variables (es decir, el cerebelo tenía una concentración inicial de ADN mucho mayor), mediante los tratamientos químicos y físicos, se obtuvo menos de 100 ng de ADN/mg. de peso seco, como se puede observar en la electroforesis genómica en la **figura 9 C.**, las bases de pares para las muestras descclularizadas se muestran debajo de 200 como la literatura previamente revisada ( Reginensi et al., 2020) En cuanto a las concentraciones de proteínas obtenidas del ensayo, el tejido corteza (nativo) mantuvo un porcentaje total de 89.3% y su descclularizado 45.9%. En consecuencia, Cerebelo nativo, 88.7% (nativo), y su descclularizado 50.6%. Por último, las áreas remanentes dieron un resultado de 81.3 % y 26%, su descclularizado. El cual es un dato nuevo ya que previamente, el Dr. Granato y

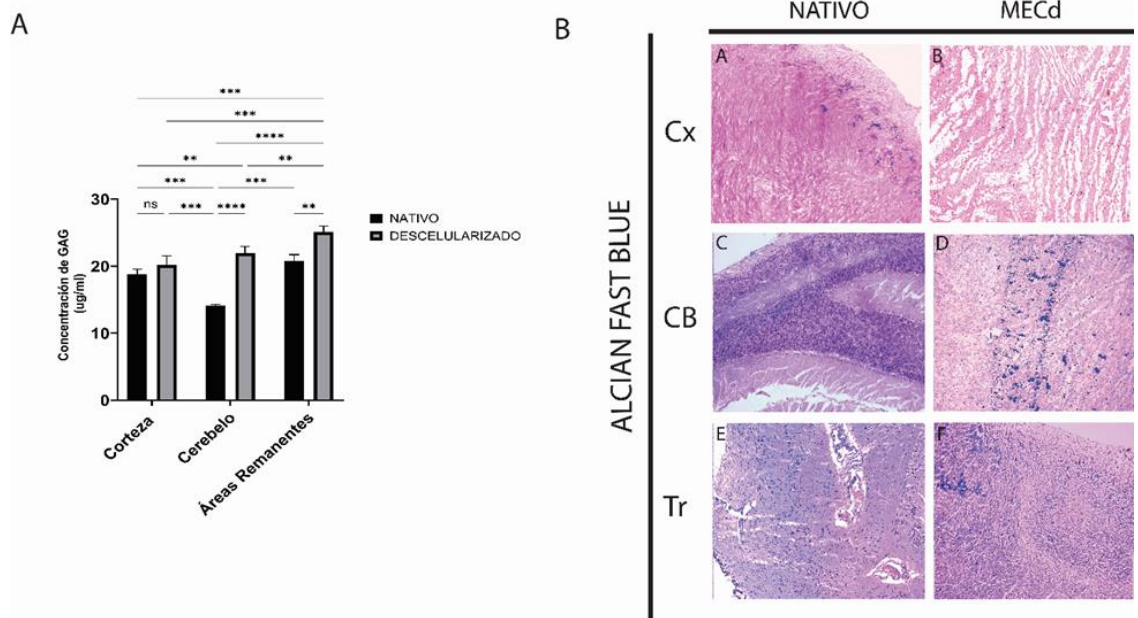
sus colaboradores ( 2011), cuantificaron la totalidad de proteínas de un cerebro de ratón , siendo el nativo el control para comprar sus resultados de descelularización. En este caso se cuantificaron las subregiones cerebrales de un porcino.



**Figura 9.** Cuantificación de ADN y Proteínas como método de verificación de procesos de descelularización para estandarización. A) Cuantificación de ADN ( ug/mg) de las tres secciones cerebrales: Corteza, Cerebelo, Áreas Remanentes. Escalera Molecular desde 2500 bp, 1000 bp, 500 bp. B) Cuantificación de proteínas de las subregiones del cerebro. C) Electroforesis genómica a 0.8%. D) Western blot. Análisis de los anticuerpos NeuN. El panel muestra los Descelularizados 1 (Corteza), 2( Cerebelo),3 (Areas Remanentes) y los nativos 4 (Corteza), 5 ( Cerebelo) y 6 (Areas Remanentes) . Los controles positivos de estos experimentos son las muestras nativas de los tejidos. Los valores de p significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*) y  $p > 0.001$  (\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis.

### 5.3.2. Evaluación Morfológicas de las Matrices Extracelulares Descelularizadas.

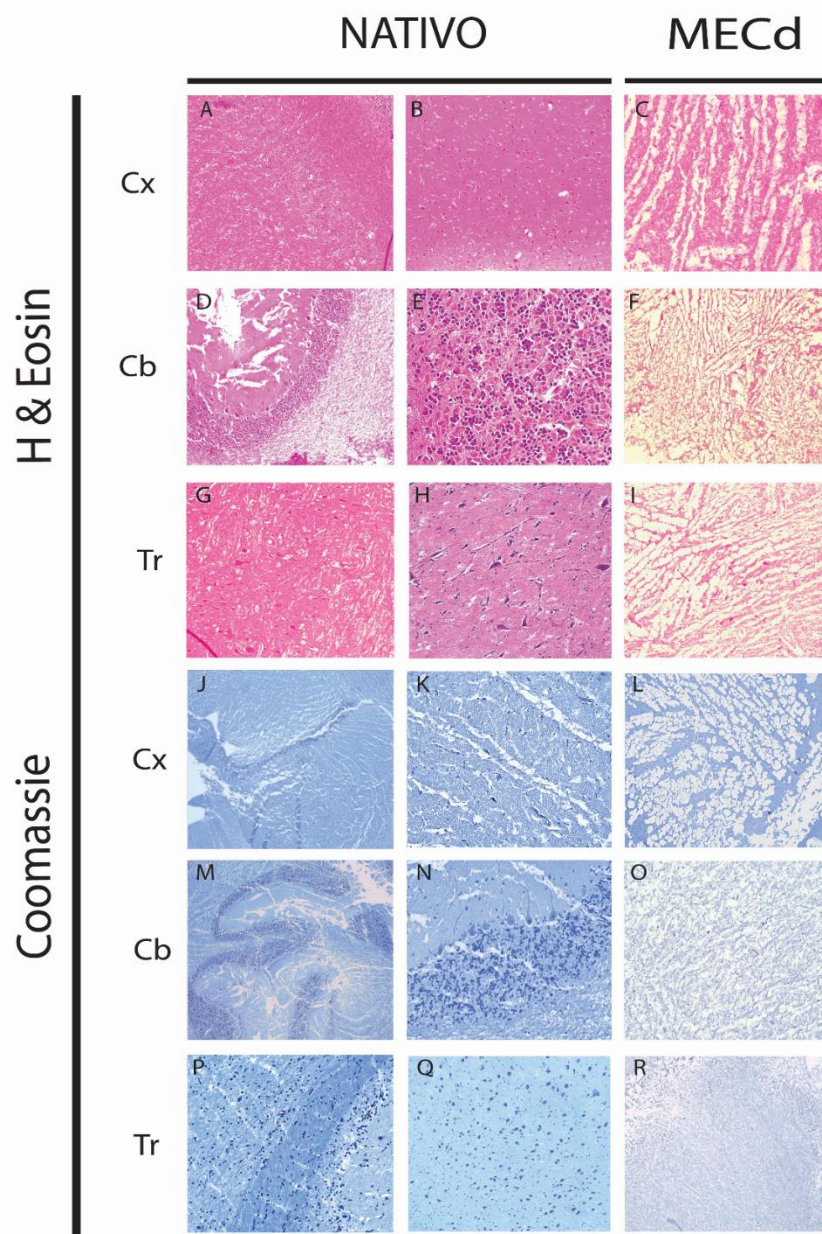
Además, se estudió la morfología estructural del MEC nativa y descelularizadas para entender su capacidad de conservar sus factores de crecimiento. La integridad estructural y bioquímica de los andamios es importante para promover la unión, proliferación y diferenciación celular en el linaje neuronal. La evaluación histológica mediante tinción con azul de Coomassie, utilizada para el etiquetado no específico de proteínas totales, dio como resultado un color azul fuerte y continuo en el tejido nativo que era comparable al del MEC descelularizadas (**Figura 11 J-R**). Todas las secciones histológicas también se tiñeron con hematoxilina & eosina (**Figura 12 A-I**) para resaltar la eficiencia de la eliminación celular después del proceso de descelularización. De esta forma se pudo comparar con otros procesos químicos de descelularización el estado de los tejidos y poder establecer un proceso exitoso para su solubilización en medios de cultivo.



**Figura 10.** Evaluación de presencia de los proteoglicanos y GAGs. **A)** Cuantificación de GAGs ( ug/ml). Se tomó como control el tejido nativo para comparación con el tejido descelularizado. **B) Tinciones con Alcian Blue y H&E:** A) Corteza Nativa. B) Corteza Descelularizada, C) Cerebello Nativo. D) Cerebello

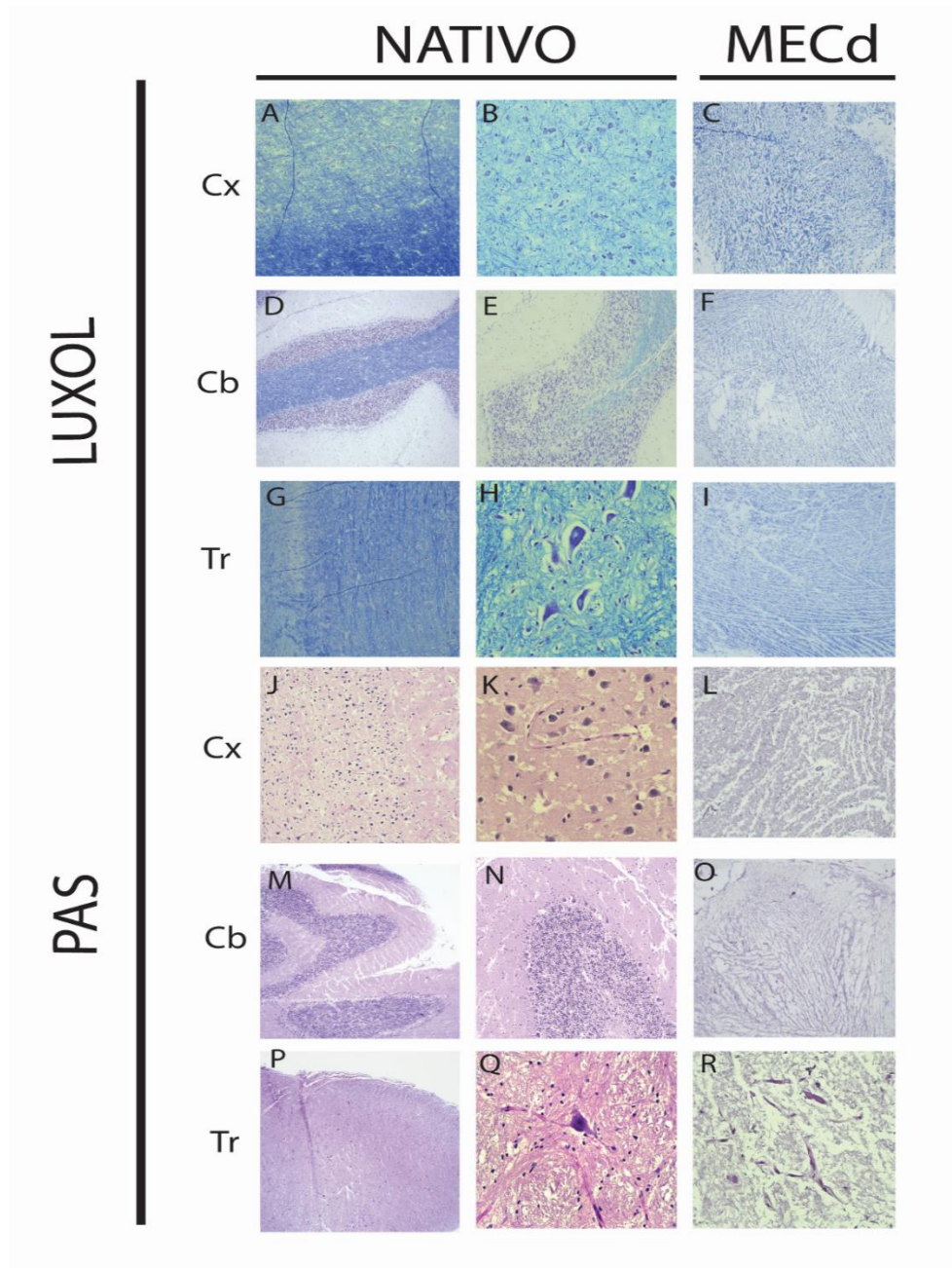
Descelularizado. E) Áreas Remanente Nativa. F) Áreas Remanentes Descelularizadas. Los valores de p significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis.

En términos generales, la matriz extracelular (**ECM**) del cerebro está compuesta principalmente por glicosaminoglicanos (**GAGs**) y proteoglicanos, con cantidades relativamente pequeñas de proteínas fibrosas como el colágeno y la fibronectina. Nuestros resultados indicaron que el material decelularizado contiene componentes proteicos presentes en la ECM nativa del cerebro, y también conserva **GAGs** sulfatados (**Figura 10 A-B**). A pesar del uso de SDS, el proceso de decelularización pudo retener GAGs sulfatados y se observó que tenía uno de los contenidos de GAG más altos en comparación con otros tejidos reportados que han sido decelularizados. En cuanto, la corteza nativa obtuvo una concentración final de 19.08 ug/ml y su decelularizado, 20.16 ug/ml; Cerebelo con 14.12 ug/ml y su decelularizado, 21.93; y finalmente, 20.73 ug/ml, y su decelularizado 25.05 ug/ml. Se ha demostrado que los GAGs tienen un efecto en el comportamiento celular, ya sea solos o en asociación con otras moléculas. Si bien es probable que nuestro protocolo de decelularización reduzca el contenido proteico y de GAG en relación con el tejido nativo, todavía somos capaces de retener muchos de los componentes al eliminar más del 95% del ADN. La presencia de los proteoglicanos y GAGs puede ser un mediador importante del comportamiento celular observado en nuestros estudios. Aunque queda una pequeña cantidad de ADN en nuestra matriz cerebral, un estudio reciente demostró que varios andamios de ECM decelularizados disponibles comercialmente, a pesar de contener cantidades medibles de ADN, todavía se pueden utilizar con éxito en la clínica (Yaldiz et al., 2022). Esto podría indicar que existe un umbral de niveles de ADN para evitar una respuesta inmunitaria negativa, o que los detergentes pueden alterar la estructura del ADN de manera que no se desencadene la respuesta inmunitaria.



**Figura 11.** Histología de Tejidos nativos de matriz extracelular: Nativa y Descelularizada. Tinciones con Hematoxilina & Eosina: A-B) Corteza Nativa, C) Corteza Descelularizada. D-E) Cerebelo Nativo, F) Cerebelo Descelularizado. G-H) Áreas Remanentes. I) Áreas Remanentes Descelularizadas. Tinciones con Azul de Coomassie: J-K) Corteza Nativa. L) Corteza Descelularizada. M-N)

Cerebelo Nativo. O) Cerebelo Descelularizado. P-Q) Áreas Remanentes Nativas.  
R) Áreas Remanentes Descelularizadas. Escala 200  $\mu$ m.

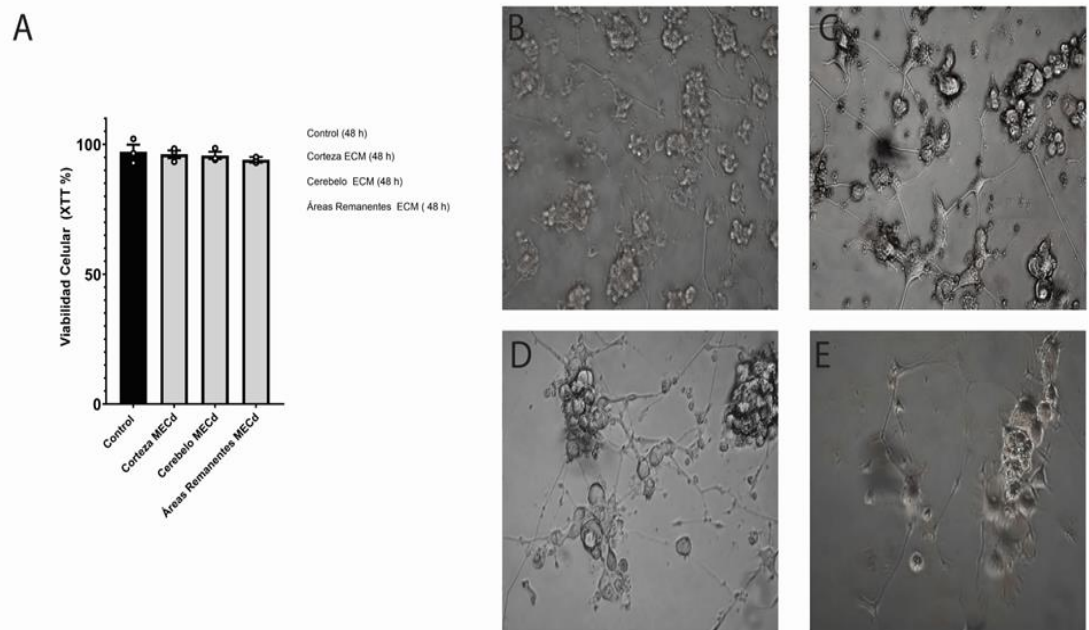


**Figura 12.** Histología de Tejidos nativos de matriz extracelular: Nativa y Descelularizada. Tinciones con Luxol Fast Blue: A-B) Corteza Nativa, C) Corteza Descelularizada. D-E) Cerebelo Nativo, F) Cerebelo Descelularizado. G-H) Áreas

Remanentes. I) Áreas Remanentes Descelularizadas. Tinciones PAS (Periodic Acid-Schiff): J-K) Corteza Nativa. L) Corteza Descelularizada. M-N) Cerebelo Nativo. O) Cerebelo Descelularizado. P-Q) Áreas Remanentes Nativas. R) Áreas Remanentes Descelularizadas. Escala 200  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4. Modelo de Daño Cerebrales in vitro: Efecto de la Matriz Cerebral Descelularizada en daño Cerebral.

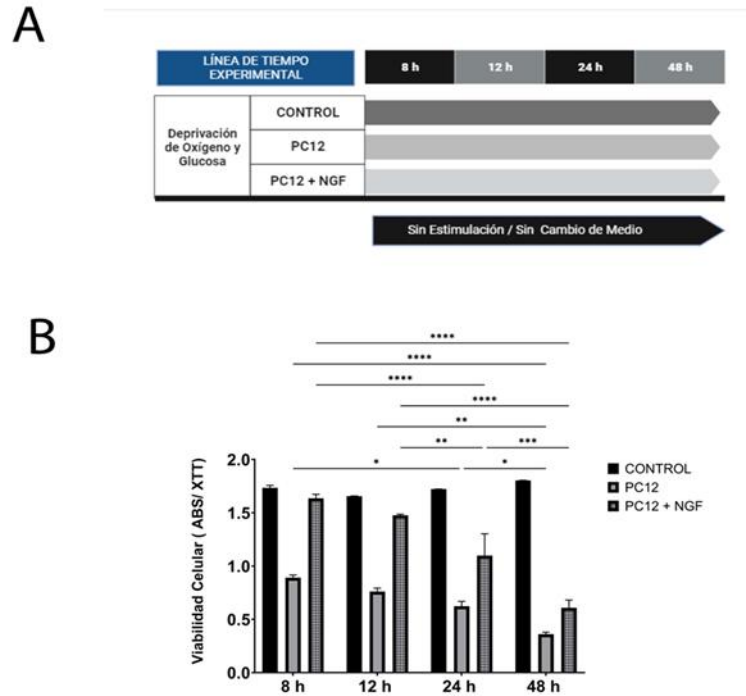
La actividad mitocondrial también se midió en este estudio utilizando un ensayo XTT para analizar la viabilidad celular en células PC12 con cdECM de las tres regiones diferentes en un período de 48 horas. No se encontró un valor diferencial significativo entre las células estimuladas con solución vehículo (control negativo). NGF (control positivo) y tratamiento experimental con cdECM: ECM de corteza, ECM de cerebelo y ECM de áreas restantes. De esta forma se aseguró la viabilidad celular de la MECd para estimulación celular después de la Deprivación de Oxígeno y Glucosa (**Figura 13 A-E**).



**Figura 13.** Evaluación de viabilidad celular con la línea PC12. A) Gráfico de barras con Control (Cultivo en Normoxia con PC12 tratadas con NGF) y las tres

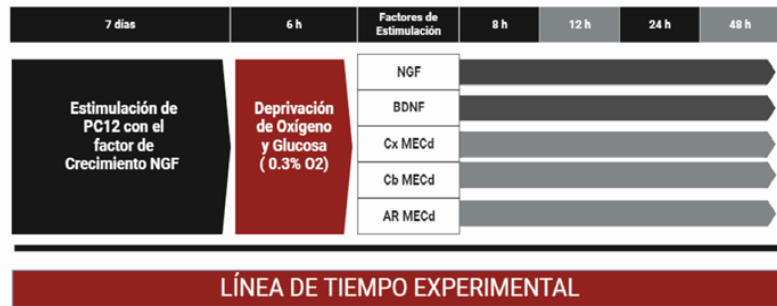
subregiones evaluadas: Corteza, Cerebelo y Áreas Remanentes (Sólo tejidos descelularizados). B) Control: PC12 tratadas con NGF (después de 48 horas).C) PC12 tratadas con Corteza descelularizada. D) PC12 tratadas con Cerebelo descelularizado. E) PC12 tratadas con áreas remanentes descelularizadas. El registro fotográfico fue tomado después de la incubación con MECd en 48 horas. Los valores de p significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis. *Participación en figura 9 del artículo "Exploring region-specific brain decellularized scaffold and their role in oxygen and glucose deprivation recovery", con el autor principal Dr. Diego Reginensi.*

Para investigar y analizar los efectos sobre la regeneración/recuperación de la matriz extracelular cerebral descelularizada durante la privación de oxígeno y glucosa (OGD), la viabilidad celular se cuantificó en porcentaje de la absorbancia tomada del ensayo colorimétrico XTT. No se agregó ningún período de reoxigenación después de realizar las 6 horas bajo privación de oxígeno y glucosa porque las características neuroprotectoras no fueron una de las variables de los estudios en este estudio, y el medio después de la OGD no se cambió para mantener la liberación de factores del cultivo a simular condiciones in vivo (**Figura 14 A**). Dentro de la experimentación completa con la Deprivación de Oxígeno y Glucosa, surgió una incógnita de ¿Cuánto duraría la reperfusión celular de las PC12 cuando no están tratadas con NGF? Se establecieron placas en paralelo en normoxia (condiciones normales) y con PC12 no tratadas y tratadas (NGF), bajo la técnica DOG por 6 horas (**Figura 15 A-Diagrama**). Los resultados obtenidos indican que, a las 24 horas, sin ningún cambio de medio para una mejor simulación de los factores liberados inflamatorios durante una isquemia/hipoxia (suministración de glucosa y de vuelta a condiciones de cultivo celular), las PC12 tratadas bajan su viabilidad en un 38% y mientras que las PC12 no tratadas, baja en un 65%. Finalmente, a las 48 horas, bajan a un 88% las células no tratadas y las PC12 tratadas a un 47% (**Figura B**).

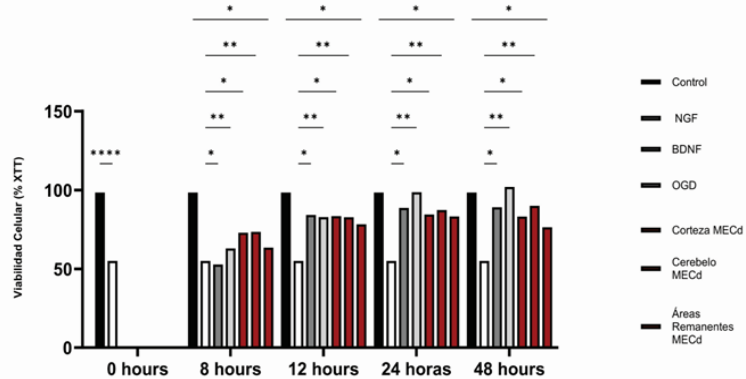


**Figura 14.** Evaluación de viabilidad celular después de daño cerebral en modelo celular PC12. A) Diagrama completo de diseño experimenta en normoxia y en hipoxia. B) Gráfico de barras con Controles, DOG (6 horas) y los resultados de la recuperación evaluando: Factores neurotróficos ( NGF y BDNF) y factures de matriz descelularizada cerebral ( Corteza, Cerebelo y áreas remanentes del cerebro). Los valores de p significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis. *Participación en figura 9 del artículo “Exploring region-specific brain decellularized scaffold and their role in oxygen and glucose deprivation recovery”, con el autor principal Dr. Diego Reginensi.*

A



B



**Figura 15.** Evaluación de recuperación en viabilidad celular después de daño cerebral en modelo celular PC12. A) Diagrama completo de diseño experimental en normoxia y en hipoxia. B) Gráfico de barras con Controles, DOG (6 horas) y los resultados de la recuperación evaluando: Factores neurotróficos (NGF y BDNF) y factores de matriz descelularizada cerebral (Corteza, Cerebelo y áreas remanentes del cerebro). Los valores de  $p$  significativos estuvieron en  $p > 0.05$  (\*),  $p > 0.01$  (\*\*),  $p > 0.001$  (\*\*\*) y  $p > 0.0001$  (\*\*\*\*), clasificados en dos vías ANOVA con Turkey post hoc análisis. *Participación en figura 9 del artículo “Exploring region-specific brain decellularized scaffold and their role in oxygen and glucose deprivation recovery”, con el autor principal Dr. Diego Reginensi.*

Después de DOG de 6 horas de insulto (55,68% de muerte celular), las células PC12 se estimularon con cdECM (corteza 80,99%  $\pm$ 5,373, cerebelo

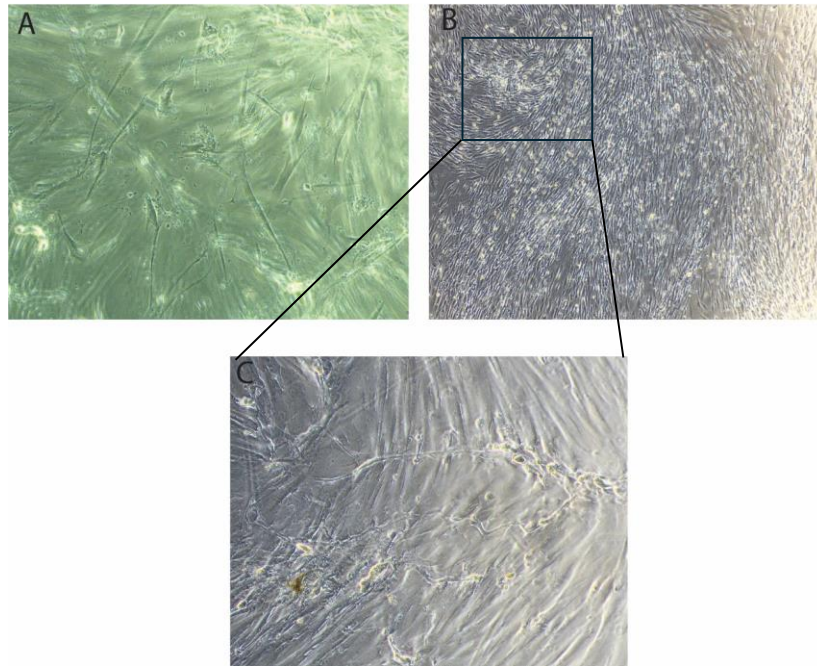
83,64%  $\pm$  7,586 y áreas restantes 75,34%  $\pm$  8,410) para observar el potencial de recuperación (un total de 48 horas). Dando a conocer que la ECM cerebral descclularizada es una herramienta para evitar la muerte celular y finalmente, la apoptosis. En este estudio no se probaron las agresiones o insultos mayores a 6 horas de OGD o perfusiones después de 6 horas. Los factores neurotróficos que mantienen la supervivencia celular se incluyeron en el experimento como control positivo para comparar sus efectos neuroprotectores en condiciones isquémicas/hipóxicas: NGF (84,16  $\pm$  7,717) y BDNF (78,92  $\pm$  8,822) ( **Figura 15 B**).

Como el efecto en la regeneración de la MEC descclularizada no ha sido probado en modelos in vitro o in vivo para isquemia cerebral, ictus o hipoxia anteriormente, nos enfocamos en un modelo de DOG con células PC12 para analizar la recuperación de la viabilidad celular utilizando las diferentes regiones descclularizadas del cerebro: Corteza, Cerebelo y resto de áreas. Los efectos del DOG (0,3 % O<sub>2</sub>) en PC12 similares a neuronas diferenciadas se evaluaron con la reducción de la actividad XTT después de 6 horas. Singh y cols. (2011) describieron que el efecto de DOG de 6 h en adelante recae en la categoría de respuesta de citotoxicidad y con una pérdida de más del 25% de la viabilidad celular. Luego, este punto de referencia se utilizó para determinar la concentración óptima de glucosa y el período de reoxigenación para observar su interacción y dependencia para la recuperación de las células PC12. Singh y Chen, de igual forma realizaron un estudio similar en el 2023, y encontraron una reducción de la actividad de MTT después de 2 horas en adelante usando 0,3% de O<sub>2</sub>. Nuestro experimento se basó en estos modelos anteriores (Singh et al., 2009) ya que proporcionan la información necesaria para reproducirlo, la credibilidad y consistencia para observar los efectos de recuperación de la matriz extracelular descclularizada. Según los datos mostrados, la mayor actividad XTT se produjo entre los lapsos de tiempo de 24-48 horas de estimulación con el dECM del cerebelo, siguiendo la corteza y el resto de las áreas. La cdECM del cerebelo proporciona ramificación de neuritas a las células PC12 diferenciadas, mientras que la estimulación con cdECM de la corteza y las áreas restantes alargó las

neuritas existentes de las células. Existe data que establece que después del proceso de descelularización del tejido cerebral, el factor BDNF todavía está presente ( Reginensi et al., 2023). Además, los GAG/PG se encuentran en el cdECM como se muestra en la sección de resultados en altos porcentajes. Haciendo que todos estos factores neurotróficos y solubles contenidos en la matriz extracelular del cerebro descelularizada pueden presentar una posibilidad de regeneración neuronal a largo plazo.

La matriz extracelular cerebral decelularizada posee un enorme potencial para respaldar la proliferación celular y mejorar la regeneración del tejido neural. Incluso el revestimiento para el cultivo de células neuronales hecho de cdECM ha demostrado ser un eficiente acelerador de la formación de redes en neuronas primarias cocultivadas con células gliales (Díaz et al., 2022) en comparación con MaxGel y Matrigel. Esto se debe a que el cdECM es rico en glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas y muchas otras señales bioquímicas que se pueden utilizar en el crecimiento de neuritas, sinaptogénesis, estabilización sináptica (Dyitavet et al., 2010) y plasticidad relacionada con lesiones en modelos in vitro o in vivo (Song et al., 2018). Según el estudio de Terek, se estableció una plataforma de matriz extracelular cerebral decelularizada con microportadores, y el resultado fue una diferenciación de cultivos de células progenitoras neurales (NPs) hacia la línea de células oligodendrocitos. Su plataforma induce microarreglos derivados de la matriz extracelular para apuntar a terapias de remielinización (Terek et al., 2023). Otro tipo de plataforma que proporciona un enfoque para estudiar oligodendrocitos funcionales a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) humanas es la matriz extracelular cerebral alineada con un soporte nanofibrilar electrohilado desarrollado por Cho y su grupo (2019). En este artículo se demostró que la cocultura con iPSC-OL con células neuronales inducidas en la plataforma mejoró el proceso de mielinización en los oligodendrocitos iPSC y la función electrofisiológica en neuronas diferenciadas a partir de iPSC. Además, su plataforma cdECM con electrohilado nanofibrilar demostró ser efectiva para imitar el entorno microambiental cerebral in vivo, promover la maduración de iPSC-OL,

la neurogénesis y la producción de estructuras similares a vainas de mielina (Cho et al., 2019).



**Figura 16.** Diferenciación de Células Mesenquimales Umbilicales humanas con estimulación de 6 días con Matriz extracelular de corteza Descelularizados (**Figura A**) comparando con una diferenciación con factores neurotróficos (**Figura B-C**) : NGF/BDNF.

Resaltamos que MEC descellularizada es una herramienta poderosa que puede hacer avanzar las aplicaciones clínicas con células madre debido a que mejora la supervivencia celular y las interacciones de la ECM que influyen en la funcionalidad de las células (**Figura 16 A-C**). Nuestros resultados mostraron que quedan factores importantes en la Matrices descellularizada cerebrales por explorar. Sin embargo, nuestros resultados finales establecen que mejoran la supervivencia y la viabilidad funcional de las células después de una hipoxia a cierto grado de severidad.

# **CAPÍTULO VI**

## **Futuras direcciones de la Investigación**

En base a los resultados obtenidos, podemos considerar los siguientes puntos para desarrollar en un futuro:

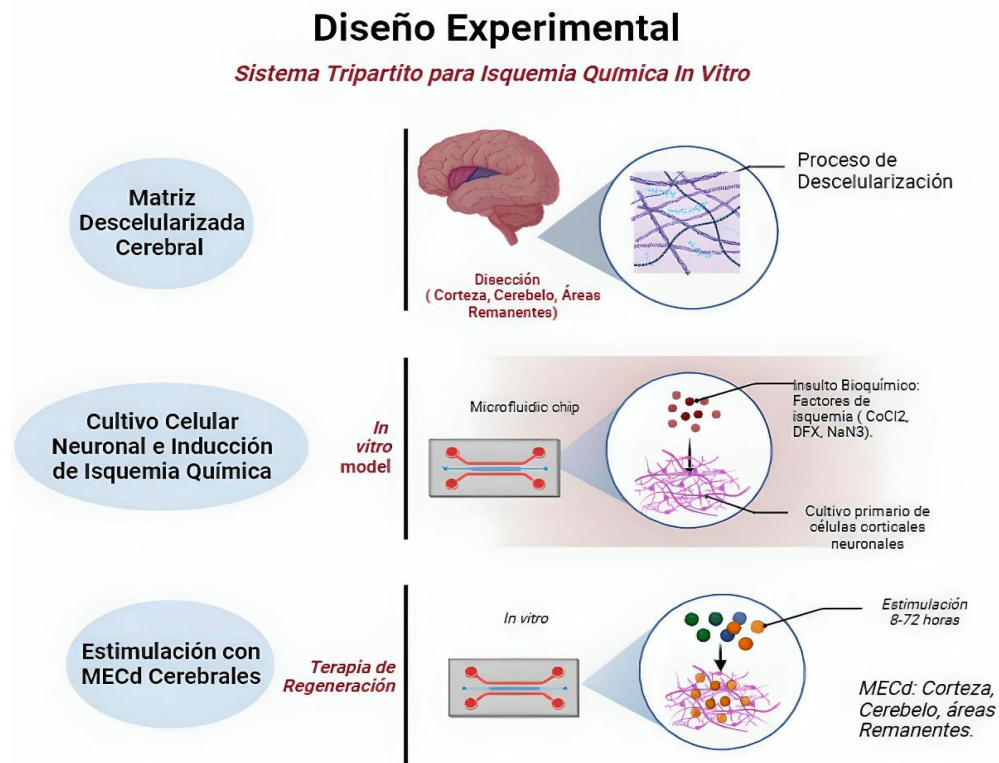
**Diseño experimental para la Privación de Oxígeno y Glucosa con Células Primarias Neuronales de forma química dentro de los sistemas tripartitos de Microfluídica.**

Hay evidencia científica que hay sustancias químicas que simulan totalmente lesiones cerebrales de isquemia como el cloruro de cobalto (1mM  $\text{CoCl}_2$ ), deferoxamina (3 mM DFX), Azida de Sodio (2mM  $\text{NaN}_3$ ), y estas misma conllevan la muerte celular por diferentes vías metabólicas (Kim et al., 2015). El factor HIF- $\alpha$  posee un role de respuesta celular ante la disminución de oxígeno (Heck-Swain et al., 2023). En las siguientes investigaciones experimentales, se planea estudiar cuantificando la expresión del del factor HI-F ante la estimulación con matrices descelularizadas cerebrales (Corteza, Cerebelo y áreas Remanentes). Además, observar la longitud del crecimiento axonal del cultivo mediante sistemas tripartitos de microfluídica después de la isquemia por períodos de 0 horas- 72 horas después de la estimulación con MECd cerebrales (**Diagrama E**). Y finalmente, comparar los modelos de isquemias por diferentes medios (físicos y químicos) para optimización de estos y proveer mayor similitud para ser probado con diferentes fármacos de neuroprotección.

**Re-mielinización mediante co-cultivos con precursores de oligodendrocitos durante isquemia química.**

Existen en el cuerpo humano diversas poblaciones de oligodendrocitos mielinizantes y no-mielinizantes. Ante una isquemia cerebral, ocurren daños irreversibles como una parálisis o incluso la muerte del paciente. En la actualidad se conoce poco sobre el efecto de una isquemia cerebral en los oligodendrocitos. Los únicos registros que se al logrado obtener son dependientes del tiempo del daño. Según los laboratorios de la Dra. María José-Álvarez y Mario Villa-González del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid,

establecieron experimentos dependientes de tiempo para cuantificar la muerte de los oligodendrocitos. Como resultado se obtuvo que durante una isquemia a largo



**Diagrama E. Flujo de trabajo experimental para ejecución de Modelo de Isquemia Química y Estimulación con MECd Cerebral Porcina para comparación y optimización de modelos in vitro en sistemas tripartitos.**

plazo ocurre un incremento de oligodendrocitos en la zona afectada, más, una oligodendrogénesis.

Estos nuevos oligodendrocitos presentan un alto porcentaje de 3R-Tau y 4R-TAU, los cuales inducen un dinamismo en la red de microtúbulos y, por ende, mayor migración a las zonas afectadas, para finalmente re-mielinizar los axones lesionados (Villa et al., 2020; Tori et al., 2023). Según estos experimentos previos, recomendamos observar otras expresiones en los oligodendrocitos después de una isquemia a largo y corto plazo durante una estimulación con matrices descelularizadas cerebrales como las isoformas de Tau, MBP, Gal C.

**Optimizar un modelo de isquémica con organoides cerebrales para estudio u producción de oligodendrocitos mielinizantes maduros.**

Además de uso de los sistemas compartimentalizados de microfluídica, el desarrollo de modelos in vitro mediante organoides cerebrales humanos permite el estudio de diversas áreas del cerebro por su parecido en estructuras 3-dimensionales. Estos son ventajosos debido a que se pueden modelar desórdenes en un tejido humano sin el uso de modelos animales. Para aumentar la complejidad de esta línea de estudio sería de gran utilidad explorar un modelo optimizado de un organoide humano en condiciones de isquemia, en períodos de corto plazo (0-12 horas) y de largo plazo (20-48 horas) con el propósito principal de estudiar la respuesta de los oligodendrocitos en proliferación y migración celular.

# Conclusiones

En este trabajo de investigación, presentamos una descripción general de cómo la topografía y el flujo de microfluidos afectan el comportamiento neuronal, ya sea por separado o en sinergia, con la ayuda de sistemas de microfluidos innovadores. Además, destacamos la importancia de utilizar muchos estímulos diferentes (por ejemplo, topografía, flujo de microfluidos, tensión de corte) para simular el microambiente in vivo de manera más apropiada. Se demuestran varios sistemas de microfluidos para estudios neuronales centrados en el gradiente (estimulación química, perfusión), tensión de corte y cocultivo. Los estudios revelan la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo celular biomiméticos in vitro que permitan una simulación más cercana del microambiente in vivo para promover el crecimiento neuronal. Sin embargo, los sistemas de microfluidos aún no han aprovechado plenamente su potencial en el campo de la regeneración neuronal. De hecho, aunque el efecto del flujo de microfluidos sobre el crecimiento neuronal se ha estudiado a fondo, el efecto combinado del flujo de microfluidos y la topografía se limita a unos pocos estudios.

## **Las conclusiones más relevantes son:**

1. Las plataformas de microfluidicos funcionan para mimetizar daños cerebrales como hipoxias, y observar su crecimiento neuronal entre sus microcanales como técnica de cuantificación de desarrollo axonal y sinapsis.
2. Las subregiones de matrices extracelulares de la corteza, cerebelo y tronco encefálico mantienen factores neurotróficos como el BDNF y glicosacaridos después de un proceso agresivo de descelularización con detergentes (Dexosicolato de Sodio y Dodecil Sulfato de Sodio), principales constituyentes del Sistema Nervioso Central.

3. Esta iniciativa no solo busca replicar las condiciones in vivo de manera controlada in vitro, sino que también propone un sistema de imitación de las lesiones cerebrales desde una perspectiva reduccionista, ofreciendo así una aproximación novedosa y valiosa para avanzar en el conocimiento de los desafíos asociados con el daño cerebral y la recuperación neuronal.
4. La parte experimental de esta tesis establece que las matrices extracelulares (MEC) descelularizadas provenientes de diferentes regiones del cerebro ( en este caso porcino), como la corteza y el cerebelo, tienen un impacto significativo en la recuperación de la viabilidad celular en condiciones de hipoxia inducida por DOG en células PC12.
5. Los datos sugieren que estas MEC sean descelularizados o nativos pueden mitigar los efectos citotóxicos de la hipoxia, promoviendo la recuperación celular tras la reoxigenación. La mayor actividad de XTT observada en nuestras pruebas indica que las MEC descelularizadas pueden preservar o restaurar funciones celulares cruciales bajo condiciones de estrés hipóxico.

## Referencias Bibliográficas

- A. Dityatev, M. Schachner, P. Sonderegger, The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis, *Nat Rev Neurosci* 11(11) (2010) 735-46.
- A.N. Cho, Y. Jin, S. Kim, S. Kumar, H. Shin, H.C. Kang, S.W. Cho, Aligned Brain Extracellular Matrix Promotes Differentiation and Myelination of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Oligodendrocytes, *ACS Appl Mater Interfaces* 11(17) (2019) 15344-15353
- AA, M. A. (2020). Scaffolds in tissue engineering. *Annals of RSCB*, 24(1), 142-152.
- Baiguera, S., Del Gaudio, C., Lucatelli, E., Kuevda, E., Boieri, M., Mazzanti, B., ... & Macchiarini, P. (2014). Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 35(4), 1205-1214.
- 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  $\alpha\beta3$  integrin. *Cell Journal (Yakhteh)*, 25(4), 247.
- Batista, P., & Pereira, A. (2016). Quality of life in patients with neurodegenerative diseases. *dimensions*, 1, 3.
- Bi, J., et al., Axonal mRNA transport and localized translational regulation of k opioid receptor in primary neurons of dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. 103(52): p. 19919-19924.
- Buckenmeyer, M. J., Meder, T. J., Prest, T. A., & Brown, B. N. (2020). Decellularization techniques and their applications for the repair and regeneration of the nervous system. *Methods*, 171, 41-61.
- Campenot RB. 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(10):4516-4519.
- Chen, MS, Huber, AB, van der, Haar, ME. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000; 403: 434-439.
- Choi J, Kim S, Jung J, Lim Y, Kang K, Park S, Kang S. Wnt5a-mediating neurogenesis of human adipose tissue-derived stem cells in a 3D microfluidic cell culture system. *Biomaterial*. 2011;32: 7013-22

- Cramer, M. C., & Badylak, S. F. (2020). Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior. *Annals of biomedical engineering*, 48, 2132-2153.
- 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.
- Cui, H., Horiuchi, K., Dutta, P., & Ivory, C. F. (2005). Isoelectric focusing in a poly (dimethylsiloxane) microfluidic chip. *Analytical chemistry*, 77(5), 1303-1309.
- Das, C., & Fan, Z. H. (2006). Effects of separation length and voltage on isoelectric focusing in a plastic microfluidic device. *Electrophoresis*, 27(18), 3619-3626.
- De Waele, J., Reekmans, K., Daans, J., Goossens, H., Berneman, Z., & Ponsaerts, P. (2015). 3D culture of murine neural stem cells on decellularized mouse brain sections. *Biomaterials*, 41, 122-131.
- DeQuach, J. A., Yuan, S. H., Goldstein, L. S., & Christman, K. L. (2011). Decellularized porcine brain matrix for cell culture and tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 17(21-22), 2583-2592.
- Domeniconi, M, Cao, Z, Spencer, T. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 2002; 35: 283–290.
- Dzyubenko, E., Gottschling, C., & Faissner, A. (2016). Neuron-glia interactions in neural plasticity: contributions of neural extracellular matrix and perineuronal nets. *Neural plasticity*, 2016.
- Evans, S. M., Litzenberger, A. L., Ellenberger, A. E., Maneval, J. E., Jablonski, E. L., & Vogel, B. M. (2014). A microfluidic method to measure small molecule diffusion in hydrogels. *Materials Science and Engineering: C*, 35, 322-334.
- G. Singh, M.A. Siddiqui, V.K. Khanna, M.P. Kashyap, S. Yadav, Y.K. Gupta, K.K. Pant, A.B. Pant, Oxygen glucose deprivation model of cerebral stroke in PC-12 cells: glucose as a limiting factor, *Toxicol Mech Methods* 19(2) (2009) 154-60.
- Gong, Y., Fan, N., Yang, X., Peng, B., & Jiang, H. (2019). New advances in microfluidic flow cytometry. *Electrophoresis*, 40(8), 1212-1229.
- Granato, A. E., da Cruz, E. F., Rodrigues-Junior, D. M., Mosini, A. C., Ulrich, H., Rodrigues, B. V., ... & Porcionatto, M. (2020). A novel decellularization method to produce brain scaffolds. *Tissue and Cell*, 67, 101412.
- Greene, L. A. (1978). Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *The Journal of cell biology*, 78(3), 747-755.

- Gruart A, Delgado-García JM . Regeneración neuronal y recuperación funcional tras la lesión del sistema nervioso periférico. *Rev Neurol* 2004;38 (08):746-756.
- Guo, S. Z., Ren, X. J., Wu, B., & Jiang, T. (2010). Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility. *Spinal cord*, 48(7), 576-581.
- Ha, B. G., Jang, Y. J., Lee, E., Kim, B. G., Myung, K., Sun, W., & Jeong, S. J. (2023). Isolation and identification of extracellular matrix proteins from oil-based CASPERized mouse brains for matrisomal analysis. *Heliyon*, 9(4).
- Harink B, Le Gac S, Truckenmuller R, van Blitterswijk C, Habibovic P (2013) Regeneration-on-a-chip? The perspectives on use of microfluidics in regenerative medicine. *Lab Chip* 13:3512-3528.
- Heck-Swain, K. L., & Koeppen, M. (2023). The Intriguing Role of Hypoxia-Inducible Factor in Myocardial Ischemia and Reperfusion: A Comprehensive Review. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 10(5), 215.
- Hermida, M. A., Kumar, J. D., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Advances in biological regulation*, 65, 5-15.
- Herrmann, N., Neubauer, P., & Birkholz, M. (2019). Spiral microfluidic devices for cell separation and sorting in bioprocesses. *Biomicrofluidics*, 13(6).
- Huang, W. H., Ai, F., Wang, Z. L., & Cheng, J. K. (2008). Recent advances in single-cell analysis using capillary electrophoresis and microfluidic devices. *Journal of Chromatography B*, 866(1-2), 104-122.
- Hur, E. M., & Zhou, F. Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(8), 539-551.
- Ivins, K.J., E.T.N. Bui, and C.W. Cotman,  $\beta$ -Amyloid Induces Local Neurite Degeneration in Cultured Hippocampal Neurons: Evidence for Neuritic Apoptosis. *Neurobiology of Disease*, 1998. 5(5): p. 365-378.
- J.C. Terek, M.O. Hebb, L.E. Flynn, Development of Brain-Derived Bioscaffolds for Neural Progenitor Cell Culture, *ACS Pharmacol Transl Sci* 6(2) (2023) 320-333.
- Jie, M., Mao, S., Li, H., & Lin, J. M. (2017). Multi-channel microfluidic chip-mass spectrometry platform for cell analysis. *Chinese Chemical Letters*, 28(8), 1625-1630.
- Kim, S., Seo, J. W., Oh, S. B., Kim, S. H., Kim, I., Suh, N., & Lee, J. Y. (2015). Disparate roles of zinc in chemical hypoxia-induced neuronal death. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 1.

- Kong, Y., Wang, D., Wei, Q., & Yang, Y. (2022). Nerve decellularized matrix composite scaffold with high antibacterial activity for nerve regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 840421.
- Krausz, A. D., Korley, F. K., & Burns, M. A. (2021). A variable height microfluidic device for multiplexed immunoassay analysis of traumatic brain injury biomarkers. *Biosensors*, 11(9), 320.
- Lee, JK, Geoffroy, CG, Chan, AF. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron* 2010; 66: 663–670.
- Li, X. J., & Zhou, Y. (Eds.). (2021). *Microfluidic devices for biomedical applications*. Woodhead Publishing.
- Lukyanenko, K. A., Denisov, I. A., Yakimov, A. S., Esimbekova, E. N., Belousov, K. I., Bukatin, A. S., ... & Belobrov, P. I. (2017). Analytical enzymatic reactions in microfluidic chips. *Applied biochemistry and microbiology*, 53, 775-780.
- M.D. Diaz, R.M. Kandell, J.R. Wu, A. Chen, K.L. Christman, E.J. Kwon, Infusible Extracellular Matrix Biomaterial Promotes Vascular Integrity and Modulates the Inflammatory Response in Acute Traumatic Brain Injury, *Adv Healthc Mater* (2023) e2300782.
- Majumdar, D., Gao, Y., Li, D., & Webb, D. J. (2011). Co-culture of neurons and glia in a novel microfluidic platform. *Journal of neuroscience methods*, 196(1), 38-44
- Matuła, K., Rivello, F., & Huck, W. T. (2020). Single-cell analysis using droplet microfluidics. *Advanced Biosystems*, 4(1), 1900188.
- Mazia, D., Schatten, G., & Sale, W. (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 66(1), 198-200.
- McKerracher, L, David, S, Jackson, DL, Kottis, V, Dunn, RJ, Braun, PE. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 1994; 13: 805–811.
- Millet LJ, Gillette MU (2012) New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends Neurosci* 35:752-761.
- Moreno E, Hachi S, Hemmer K, Trietsch S, Baumuratov A, Hankemeier T, Vulto P, Schwamborn J, Fleming R. Differentiation of neuroepithelial stem cells into functional dopaminergic neurons in 3D microfluidic cell culture. *Lab on a Chip*. 2015;15: 2419-28
- 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*, 100081.

- Naderi, A., Bhattacharjee, N., & Folch, A. (2019). Digital manufacturing for microfluidics. *Annual review of biomedical engineering*, 21, 325-364.
- Nagendran, T., Poole, V., Harris, J., & Taylor, A. M. (2018). Use of pre-assembled plastic microfluidic chips for compartmentalizing primary murine neurons. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (141), e58421.
- Park JW, Kim HJ, Kang MW, Jeon NL (2013) Advances in microfluidics-based experimental methods for neuroscience research. *Lab on a Chip* 13:509-521.
- Park, J.; Koito, H.; Li, J.; Han, A. Multi-compartment neuron–glia co-culture platform for localized CNS axon–glia interaction study. *Lab Chip* 2012, 12, 3296–3304.
- Perea-Gil, I., Uriarte, J. J., Prat-Vidal, C., Gálvez-Montón, C., Roura, S., Lluçia-Valldeperas, A., ... & Bayes-Genis, A. (2015). In vitro comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization. *American journal of translational research*, 7(3), 558.
- Rangel, Rafael. (2006). Teorías del Sistema Nervioso. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 37(1), 013-023. Recuperado en 05 de abril de 2021, [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772006000100004&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772006000100004&lng=es&tlng=es).
- Reginensi, D., Ortiz, D., Pravia, A., Burillo, A., Morales, F., Morgan, C., ... & Gittens, R. A. (2020). Role of region-specific brain decellularized extracellular matrix on in vitro neuronal maturation. *Tissue Engineering Part A*, 26(17-18), 964-978.
- Richardson, P. M., McGuinness, U. M., & Aguayo, A. J. (1980). Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts. *Nature*, 284(5753).
- Ristola, M.; Sukki, L.; Azevedo, M.M.; Seixas, A.I.; Relvas, J.B.; Narkilahti, S.; Kallio, P. A compartmentalized neuron-oligodendrocyte co-culture device for myelin research: Design, fabrication and functionality testing. *J. Micromech. Microeng.* 2019, 29, 065009
- Robertson, G., Bushell, T. J., & Zagnoni, M. (2014). Chemically induced synaptic activity between mixed primary hippocampal co-cultures in a microfluidic system. *Integrative Biology*, 6(6), 636-644.
- Robertson, G.; Bushell, T.J.; Zagnoni, M. Chemically induced synaptic activity between mixed primary hippocampal co-cultures in a microfluidic system. *Integr. Biol.* 2014, 6, 636–644.
- Rolls, A, Shechter, R, Schwartz, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 235–241.

- Sha Cheng, Wen Chen, Pengchao Zhang. Developing Advanced Polymer Films Based on Microfluidic Laminar Flow. *Giant*, WVolume 9, 2022, 100091, ISSN 2666-5425.
- Sambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., ©2001.
- Serra, M., Mai, T. D., Serra, A. L., Nguyen, M. C., Eisele, A., Perié, L., ... & Descroix, S. (2020). Integrated droplet microfluidic device for magnetic particles handling: Application to DNA size selection in NGS libraries preparation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 305, 127346.
- Shi, M., Majumdar, D., Gao, Y., Brewer, B. M., Goodwin, C. R., McLean, J. A., ... & Webb, D. J. (2013). Glia co-culture with neurons in microfluidic platforms promotes the formation and stabilization of synaptic contacts. *Lab on a Chip*, 13(15), 3008-3021.
- Shi, M.; Majumdar, D.; Gao, Y.; Brewer, B.M.; Goodwin, C.R.; McLean, J.A.; Li, D.; Webb, D.J. Glia co-culture with neurons in microfluidic platforms promotes the formation and stabilization of synaptic contacts. *Lab Chip* 2013, 13, 3008–3021
- Shrirao A, Perez-Castillejos R. 2010. Simple fabrication of microfluidic devices by replicating Scotch-tape masters. *Chips Tips*.
- Shrirao AB, Kung FH, Yip D, Cho CH, Townes-Anderson E. 2014. Vacuum-assisted fluid flow in microchannels to pattern substrates and cells. *Biofabrication* 6(3):035016.
- Siegert, E., Paul, F., Rothe, M., & Weylandt, K. H. (2017). The effect of omega-3 fatty acids on central nervous system remyelination in fat-1 mice. *BMC neuroscience*, 18, 1-9.
- Sierra-Fonseca, J. A., Najera, O., Martinez-Jurado, J., Walker, E. M., Varela-Ramirez, A., Khan, A. M., ... & Roychowdhury, S. (2014). Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G $\beta$  $\gamma$ -microtubule interaction. *BMC neuroscience*, 15, 1-19.
- Sigalov, E., Fridkin, M., Brenneman, D. E., & Gozes, I. (2000). VIP-Related protection against Iodoacetate toxicity in pheochromocytoma (PC12) cells: a model for ischemic/hypoxic injury. *Journal of Molecular Neuroscience*, 15, 147-154.
- Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron*, 89(2), 248-268.

- Soligo, M., Albini, M., Bertoli, F. L., Marzano, V., Protto, V., Bracci-Laudiero, L., ... & Manni, L. (2019). Different responses of PC12 cells to different pro-nerve growth factor protein variants. *Neurochemistry International*, 129, 1044-98.
- Song, I., & Dityatev, A. (2018). Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain research bulletin*, 136, 101-108.
- Taylor, D. A., Sampaio, L. C., Ferdous, Z., Gobin, A. S., & Taite, L. J. (2018). Decellularized matrices in regenerative medicine. *Acta biomaterialia*, 74, 74-89.
- Tello, Walkira, Septiembre del 2018. Noticias de Salud Mental. Caja de Seguro Social. Retrieve from: <http://www.css.gob.pa/web/3-junio-2019aa.html>.
- Torii T, Miyamoto Y, Nakata RB, Higashi Y, Shinmyo Y, Kawasaki H, Miyasaka T, Misonou H. Identification of Tau protein as a novel marker for maturation and pathological changes of oligodendrocytes". *Glia*. 71(2023):1002-17.
- Uhl, F. E., Zhang, F., Pouliot, R. A., Uriarte, J. J., Enes, S. R., Han, X., ... & Weiss, D. J. (2020). Functional role of glycosaminoglycans in decellularized lung extracellular matrix. *Acta biomaterialia*, 102, 231-246.
- Villa Gonzalez, M., Vallés-Saiz, L., Hernández, I. H., Avila, J., Hernández, F., & Pérez-Alvarez, M. J. (2020). Focal cerebral ischemia induces changes in oligodendrocytic tau isoforms in the damaged area. *Glia*, 68(12), 2471-2485.
- Wang, KC, Koprivica, V, Kim, JA. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002; 417: 941–944.
- Wang, R, King, T, Ossipov, MH. Persistent restoration of sensory function by immediate or delayed systemic artemin after dorsal root injury. *Nat Neurosci* 2008; 11: 488–496.
- Welsh MD (2001) Measurement of quality of life in disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 1: 346-9.
- Welty, J. D. (2020). Brain extracellular matrix and oligodendrocyte regeneration. *Neural Regen Res*, 15(5), 774-783.
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., & Barg, E. (2020). PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions. *Cells*, 9(4), 958.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. 2013. Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience* 14(2):128-142.
- Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M. 2001. Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.281(3):H1295-303.

- Xuehui Lei, Weiwu Ye, F. Safdarin, Sh. Baghaei. Microfluidic devices for sports: A review on Technology for biomedical application used in fields such as biomedicine, drug encapsulation, preparation of nanoparticles, cell targeting, analysis, diagnosis, and cell culture, tissue and Cell, Volume 87, 2024, 102339, ISSN 0040-8166.
- Xuan, X. (2019). Recent advances in continuous-flow particle manipulations using magnetic fluids. *Micromachines*, 10(11), 744.
- Yaldiz, B., Saglam-Metiner, P., & Yesil-Celiktas, O. (2021). Decellularised extracellular matrix-based biomaterials for repair and regeneration of central nervous system. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 23, E25. doi:10.1017/erm.2021.22
- Yamamoto, K., Ota, N., & Tanaka, Y. (2020). Nanofluidic devices and applications for biological analyses. *Analytical Chemistry*, 93(1), 332-349.
- Yang K, Park H, Han S, Lee J, Ko E, Kim J, Lee J, Yu J, Song K, Cheong E, Cho S, Chung S, Cho S. Recapitulation of in vivo-like paracrine signals of human mesenchymal stem cells for functional neuronal differentiation of human neural stem cells in a 3D microfluidic system. *Biomaterial*. 2015;63: 177-88.
- Yiu, G, He, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 617–627.
- Zeng, W., & Fu, H. (2020). Measurement of fluid viscosity based on droplet microfluidics. *Physics of Fluids*, 32(4).
- Zhang, Y., Zhang, C., Li, Y., Zhou, L., Dan, N., Min, J., ... & Wang, Y. (2023). Evolution of biomimetic ECM scaffolds from decellularized tissue matrix for tissue engineering: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125672.
- Zhang, Z, Guth, L, Hill, D. A. Experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation in the absence of interleukin-23. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 58–65.
- Zhao, Y., Song, S., Ren, X., Zhang, J., Lin, Q., & Zhao, Y. (2022). Supramolecular adhesive hydrogels for tissue engineering applications. *Chemical Reviews*, 122(6), 5604-5640.