

# Cultivo de Células Progenitoras Neurales Humanas sobre Andamios de Ácido Poli-Láctico (PLA) Generados por Impresión 3D para su Aplicación en Lesiones Medulares.

Edson I. Rubio<sup>1</sup>, H. Santos<sup>2</sup>, A. Paredes<sup>3</sup>, C. Castillo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Toxicología Ambiental-Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P., México.

<sup>2</sup>Ingeniería Biomédica- Escuela de Ingeniería, Universidad Modelo, Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco, México.

\* correspondencia: [claudiacastillo@gmail.com](mailto:claudiacastillo@gmail.com)

**Resumen**— La lesión medular (LM) es un trastorno del SNC para el cual no existen tratamientos exitosos. En los últimos años se han explorado alternativas para tratar la LM, como la terapia celular, no obstante, el hecho de inyectar células resulta ineficaz debido a la pobre sobrevivencia de las células durante el tratamiento. Es por esto que se han utilizado nuevos enfoques proponiendo una combinación de injertos celulares con biomateriales. Actualmente se han estudiado una variedad de materiales, entre ellos se encuentra el ácido poli-láctico (PLA). Nosotros generamos andamios de PLA con distintos tamaños de poro (300µm, 400µm y 500µm) mediante impresión 3D y posteriormente fueron analizados por microscopía electrónica de barrido, obtuvimos que presentaban estructuras y poros bien definidos. Además, fue evaluada su idoneidad con células madre neurales humanas (hNSC). Se realizaron pruebas de viabilidad celular a 3, 7 y 11 días de diferenciación celular, nosotros obtuvimos que el PLA no disminuye la viabilidad e inclusive, los andamios con poros de 400µm y 500µm ofrecen beneficio al cultivo neural. En cuanto a la proliferación celular nosotros obtuvimos que el andamio de 500µm tiene efectos benéficos. Nosotros concluimos que los andamios de PLA no generan toxicidad ni muerte celular en las hNSC, por tanto, el PLA podría ser un material candidato para la terapia de LM.

**Palabras clave**— ácido poli-láctico, progenitores neurales humanos, lesión medular

## I. INTRODUCCIÓN

El término LM hace referencia a los daños sufridos en la medula espinal a consecuencia de un traumatismo, una enfermedad sistémica o enfermedades degenerativas [1], calculándose para el 2013 una incidencia mundial anual entre 40 a 80 casos por millón de habitantes, es decir, entre 250,000 y 500,000 personas sufren cada año LM en todo el mundo [2].

En los últimos años se han explorado nuevas alternativas para tratar la LM, como la administración de moléculas bioactivas, como ARN de interferencia para llevar a cabo una terapia génica, factores de crecimiento y anticuerpos, además de la terapia celular [1,3]. La terapia con células madre tiene la finalidad de reemplazar y promover la supervivencia de las células dañadas y alterar el entorno local haciéndolo más propicio para la regeneración [4]. En diversos modelos experimentales se ha probado su eficacia y la restauración de funciones dañadas en el sistema nervioso central [4], sin embargo, en muchas ocasiones

sobre todo en LM, el solo hecho de inyectar células resulta ineficaz debido a la pobre sobrevivencia de las células durante el tratamiento, es por esto que se han utilizado nuevos enfoques terapéuticos proponiendo una combinación de injertos celulares con biomateriales [2,4,5].

En numerosos estudios se ha comprobado la eficiencia del PLA para la regeneración del SNC y lesiones medulares [6], sin embargo, no existen reportes donde se investigue la idoneidad del material PLA con células humanas. Por lo tanto, es necesario realizar la evaluación de viabilidad celular y proliferación celular de células progenitoras neurales humanas con este material. La línea celular neural troncal humana (hNS1), es una línea celular clonal, su origen es de tejido fetal humano de 10.5 semanas de gestación del cual se diseccionó la región del diencefalo y telencefalo y posteriormente fueron inmortalizadas de forma condicional y en ausencia de factores de crecimiento (EFG y FGF) se diferencian dando lugar a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas [7], por tanto, las hNS1 pueden ser un buen modelo *in-vitro* para evaluar la factibilidad de emplear andamios de PLA en la reparación de lesiones medulares.

Un aspecto importante a considerar en la ingeniería de tejidos es la dificultad para la fabricación de andamios biodegradables, sin embargo, la obtención de andamios mediante impresión 3D se ha convertido en una herramienta interesante para el diseño y síntesis de andamios de polímeros macroporosos.

En este trabajo estudiamos la viabilidad y proliferación celular de la línea celular hNS1 al ser cultivadas en andamios de PLA generados por impresión 3D; se evaluaron tres tipos de andamios con tamaños de poro de 300µm, 400µm y 500µm, con la finalidad de observar si el tamaño de poro afecta la viabilidad y proliferación de células neurales humanas.

## II. METODOLOGÍA

1) *Síntesis y caracterización de los andamios de PLA.* Los andamios fueron diseñados en el programa SolidWorks® (Dassault Systemes SolidWorks Corp., Waltham, Massachusetts, EE.UU.), posteriormente se sintetizaron en una impresora WanHao Duplicator 4s por medio de deposición de capa por capa a temperatura ambiente y utilizando como materia prima ácido poli-D-

láctico (PDLA). Para su caracterización, estas estructuras se analizaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

2) *Mantenimiento y diferenciación de las células hNSI*. Las células fueron cultivadas a 37°C, en una atmosfera con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Para proliferar las células, estas fueron cultivadas en medio 20/20, compuesto por: DMEM/F12 (Gibco), suplementos N2 (100x, Gibco), glucosa al 30% (Sigma), AlbuMAX-I al 20% (Gibco), 1M hepes (Gibco), aminoácidos no esenciales, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 20 ng/ml de factores de crecimiento humano recombinantes bFGF-2 y EGF (Research & Development). En los experimentos de diferenciación celular, es utilizado el medio de diferenciación que contiene los mismos componentes que el medio 20/20 a excepción de los factores de crecimiento, bFGF-2 y EGF.

3) *Esterilización y aclimatación de los andamios*. Los andamios fueron sumergidos en etanol al 70% durante 2 días, posteriormente se lavaron con solución buffer de fosfatos (PBS). Se pusieron en contacto con poli-L-lisina (PLL) a una concentración de 50 µg/ml durante toda la noche, pasada la incubación se lavaron con PBS y se colocaron en una placa de 24 pozos (P24) con pinzas estériles. Se agregaron 400 µl de medio 20/20, finalmente se revisó la placa observando si había contaminación, al no registrarse eventos de contaminación se procedió a sembrar las células para los posteriores experimentos.

4) *Ensayos de citotoxicidad celular*. Una vez que los andamios se esterilizaron y recubrieron con PLL, fueron colocados en P24, las células fueron sembradas a 80,000 células por pozo y se dejaron en proliferación 3 días, posteriormente se sustituyó el medio 20/20 por medio de diferenciación. Se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT a los 1, 5 y 11 días de haber inducido la diferenciación. Al día de análisis, se desechó el medio y se agregaron 300 µl de medio DMEM sin rojo de fenol con el reactivo MTT a 5 mg/ml, se dejó incubar la placa durante 4 horas. Pasada la incubación, se agregaron 300 µl de una solución de dodecilsulfato (SDS) al 10% con 0.25 µl de HCl al 37%, finalmente se removieron los andamios de los pozos y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm. Se realizaron 3 experimentos independientes con triplicados, teniendo en cuenta un control positivo (células en pozo con PLL) y un control negativo (células en pozo con PLL tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6% una hora antes del análisis).

5) *Ensayos de proliferación celular*. Los andamios fueron colocados en P24 sin pretratamiento con PLL. Se sembraron 100,000 células por pozo, posteriormente a los 3, 5 y 7 días de haber sembrado, se realizó un conteo celular utilizando la cámara de Neubauer y realizando una tinción con azul de tripano, contabilizándose células unidas y no unidas. Se realizaron 2 experimentos independientes con triplicados y teniendo en cuenta un control positivo (células en pozo con poli-l-lisina).

### III. RESULTADOS

#### A. Caracterización de los Andamios de PDLA generados mediante impresión 3D.

Se realizó microscopia electrónica de barrido de baja presión para visualizar los andamios, todos mostraron estructuras y poros bien definidos; los tamaños de poro de los tres tipos de andamios fueron de 300±25µm, 400±25µm y 500±25µm (Fig. 1).

#### B. Los andamios de PDLA no generan toxicidad celular en la línea celular hNSI.

Se evaluó la citotoxicidad celular por medio del ensayo de MTT a distintos estadios de diferenciación (1, 5 y 11 días de diferenciación); debido a que el área superficial expuesta para que se unan las células en los andamios es menor que la de los pozos utilizados como control positivo, se colocaron los andamios en pozos recubiertos y no recubiertos con PLL, ya que creíamos que cuando los andamios se colocaban en pozos sin recubrir se pegarían un menor número de células, y las células no unidas se desearían al cambiar del medio 20/20 al de diferenciación, observando una baja en la viabilidad debido a la eliminación de las células no unidas y no por un efecto citotóxico.

En la última década se han reportado numerosos estudios que comprueban la biocompatibilidad y falta de citotoxicidad del material ácido poli-láctico (PLA), al evaluar la citotoxicidad celular que producían los andamios de PDLA a los progenitores neurales encontramos que a un día de diferenciación la viabilidad celular fue similar al control positivo (Fig. 2). Como se comentó anteriormente, los andamios fueron colocados en pozos recubiertos con PLL y sin recubrir ya que creíamos que la viabilidad en pozos sin recubrir iba ser menor debido a la pérdida de células al cambiar el medio y no por que el material fuera tóxico. Sorpresivamente observamos que el porcentaje de viabilidad fue similar tanto en pozos recubiertos y no recubiertos (andamio 300µm pozo sin PLL 121.146%, andamio 300µm pozo con PLL 113.47%, Andamio 400µm pozo sin PLL 99.35%, andamio 400µm pozo con PLL 131.91%, andamio 500µm pozo sin PLL 102.73% y andamio 500µm pozo con PLL 142.23%), inclusive al día 1 de diferenciación, las células sembradas en el andamio de 300µm colocado en pozo sin PLL muestra mayor porcentaje de viabilidad que las células en andamio de 300µm en pozo con PLL (Fig. 2).

Al día 5 y 11 de diferenciación observamos que las células tienen mayor viabilidad celular en los andamios con tamaños de poro de 400µm y 500µm, evidenciándose en mayor forma en el andamio con poros de 500µm (Fig. 3 y Fig. 4). Cabe mencionar que, aunque el andamio de 300µm no aumenta la viabilidad celular, este se comporta de forma similar que el control, por lo tanto, podemos decir que ninguno de los tres tipos de andamios es tóxico.

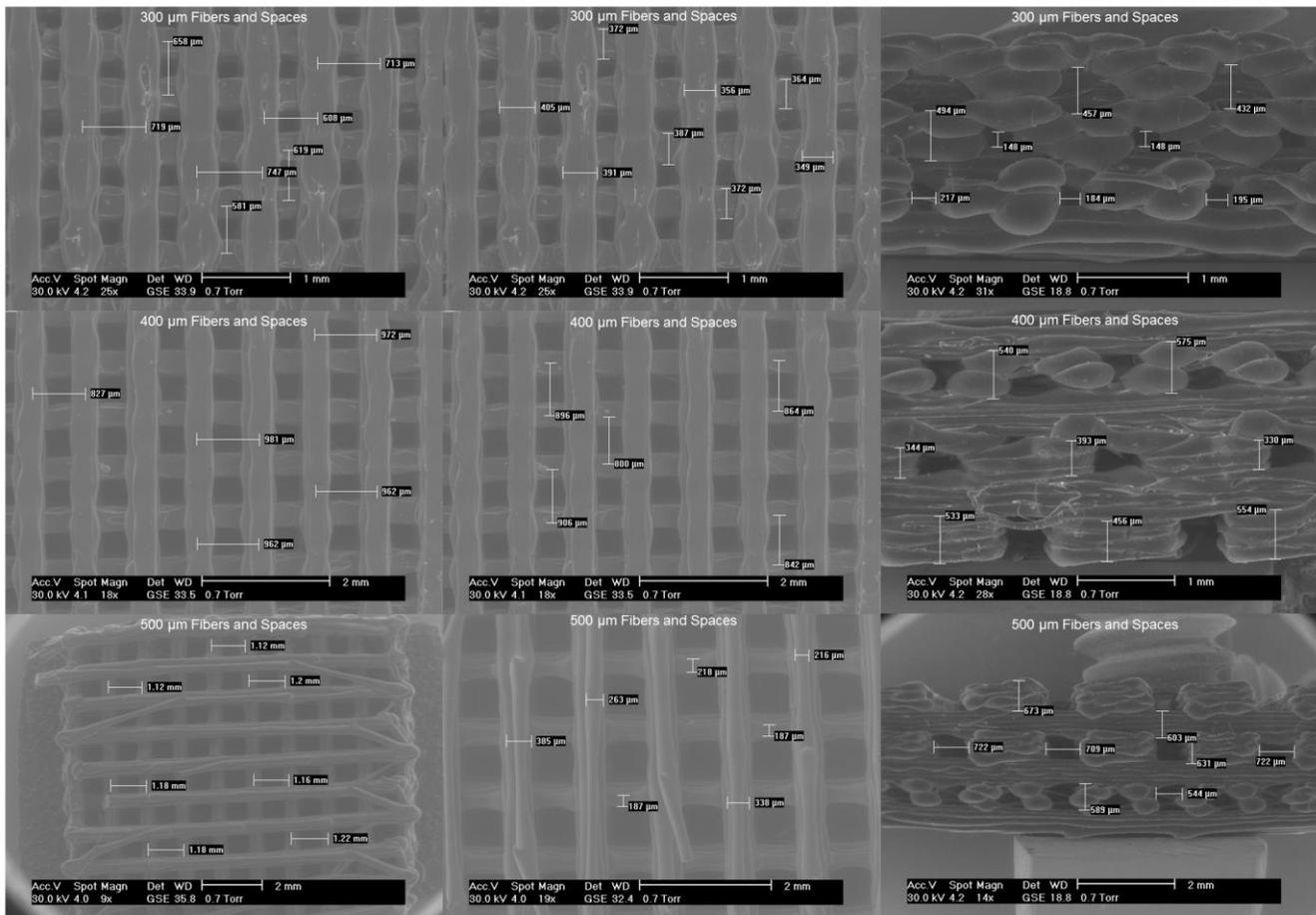


Fig. 1. Micrografías de andamios de PDLA. Para su observación se utilizó el método de visualización a baja presión en microscopio electrónico de barrido, se observan tamaños de poro de  $300 \pm 25 \mu\text{m}$ ,  $400 \pm 25 \mu\text{m}$  y  $500 \pm 25 \mu\text{m}$ .

### C. Proliferación celular de progenitores neurales humanos.

Se evaluó la proliferación celular de progenitores neurales humanos cuando son cultivados en andamios de PDLA, realizando un conteo de células vivas y muertas a diferentes días de proliferación (Fig. 5 y Fig. 6), encontramos que aproximadamente el 50% de las células totales se unen al andamio, además el andamio de  $500 \mu\text{m}$  muestra beneficios en la proliferación celular (Fig. 5).

Al realizar el conteo de células muertas se encontró un porcentaje considerable de muerte celular en el sobrenadante, a fin de esclarecer si la muerte se debía a los productos de degradación del andamio disueltos en el medio o por la condición de crecimiento en suspensión se decidió colocar 100,000 células por pozo en placas de 24 pocillos sin tratamiento de PLL, y realizar el conteo de células vivas y muertas a los 3, 5 y 7 días de proliferación, se obtuvo desde un 26% hasta un 33% de células muertas cuando las células crecían en suspensión, en cambio, la muerte celular en el sobrenadante en presencia de los andamios osciló de los 7.6% hasta 13% (Tabla 1). Con esto concluimos que posiblemente la muerte celular en el sobrenadante se debió

al crecimiento en suspensión y no a una aparente toxicidad por parte del andamio.

TABLA I  
PORCENTAJE DE MUERTE CELULAR A DISTINTOS DIAS DE PROLIFERACIÓN EN LOS TRES TIPOS DE ANDAMIOS Y EN POZO CON PLL (CONTROL) Y POZO SIN PLL.

Condición de cultivo	Porcentaje de Células Muertas		
	Día 3	Día 5	Día 7
Andamio $300 \mu\text{m}$	13.81%	12.29%	10.80%
Andamio $400 \mu\text{m}$	9.45%	10.66%	11.51%
Andamio $500 \mu\text{m}$	11.50%	8.01%	7.63%
Células pozo SPLL	2.67%	7.61%	7.01%
Células pozo PLL	26.33%	31.21%	32.35%

Con los datos obtenidos en el experimento de proliferación celular (células unidas al andamio y células en suspensión) se obtuvo el número total de células vivas y se generó una curva de crecimiento celular (Fig. 9). Es claro que los andamios con poros de  $300 \mu\text{m}$  y  $400 \mu\text{m}$  tienen un comportamiento muy parecido al control, sin embargo, el andamio con poros de  $500 \mu\text{m}$  muestra un alza en el número total de células al séptimo día.

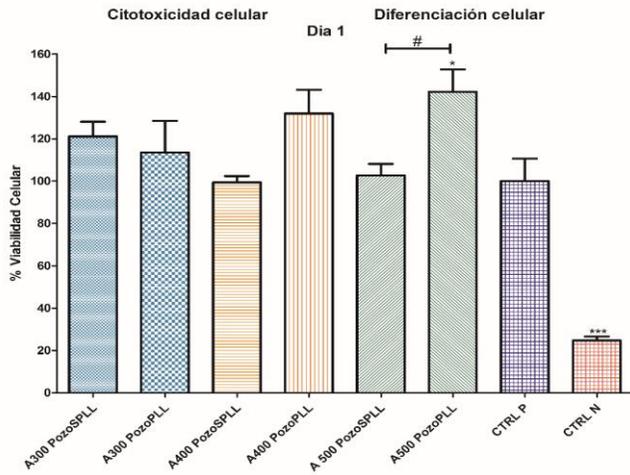


Fig. 2. Viabilidad celular de la línea celular hNS-1 a 1 día de diferenciación en los tres tipos de andamios colocados en pozos recubiertos con PLL (PozoPLL) y no recubiertos (PozoSPLL). Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis' ANOVA con la corrección de Bonferroni, en cada barra se representa la media  $\pm$  SD (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

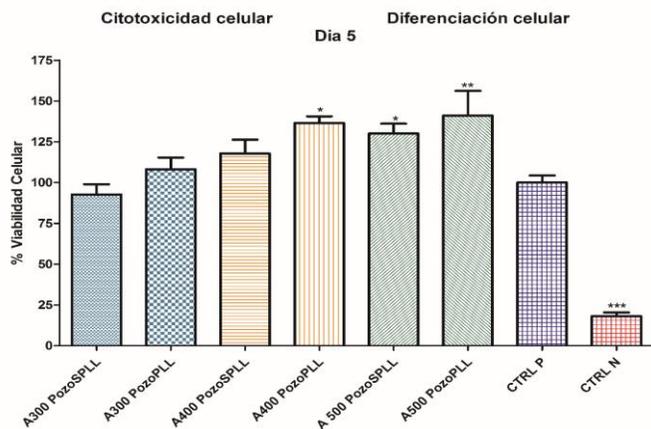


Fig. 3. Viabilidad celular de la línea celular hNS-1 a 5 días de diferenciación en los tres tipos de andamios colocados en pozos recubiertos con PLL (PozoPLL) y no recubiertos (PozoSPLL). Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis' ANOVA con la corrección de Bonferroni, en cada barra se representa la media  $\pm$  SD (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

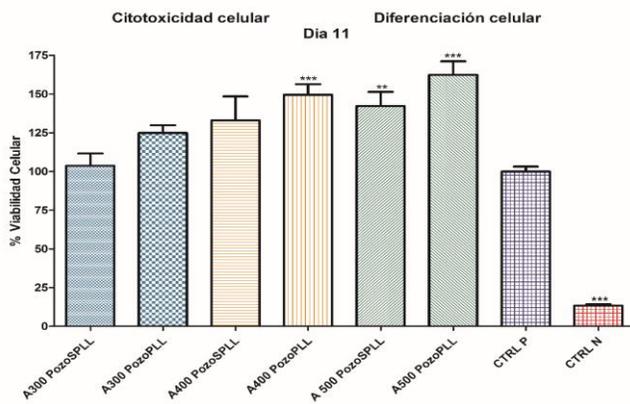


Fig. 4. Viabilidad celular de la línea celular hNS-1 a 11 días de diferenciación en los tres tipos de andamios colocados en pozos recubiertos con PLL (PozoPLL) y no recubiertos (PozoSPLL). Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis' ANOVA con la corrección de Bonferroni, en cada barra se representa la media  $\pm$  SD (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

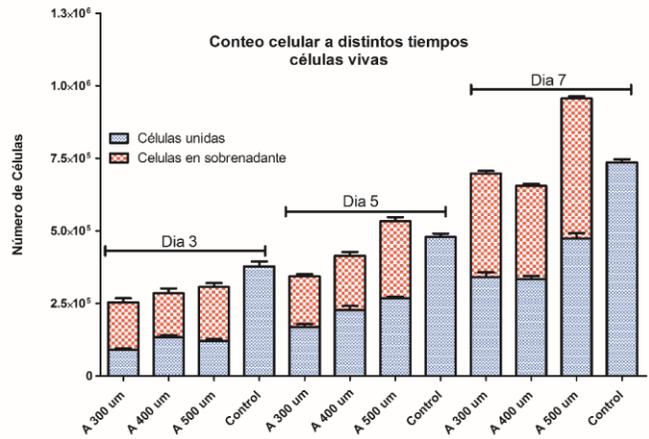


Fig. 5. Conteo celular a los 3, 5 y 7 días de proliferación. Para los andamios se realizó el conteo tanto de células que se unieron y células que quedaron en el sobrenadante. Representación del conteo de células vivas (Se realizaron 2 experimentos independientes con triplicados cada uno. Control: células plaqueadas en Pozo tratado con PLL).

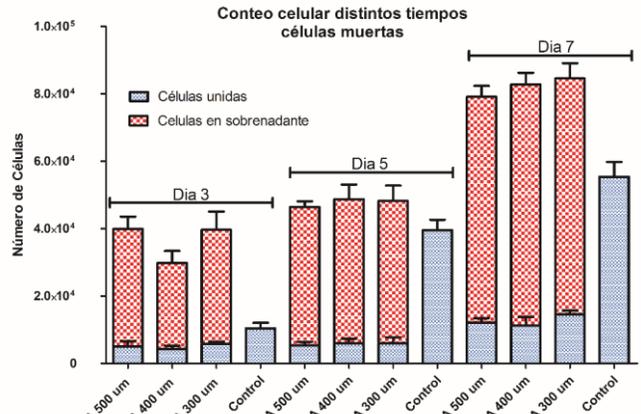


Fig. 6. Conteo celular a los 3, 5 y 7 días de proliferación. Para los andamios se realizó el conteo tanto de células que se unieron y células que quedaron en el sobrenadante. Representación del conteo de células muertas.

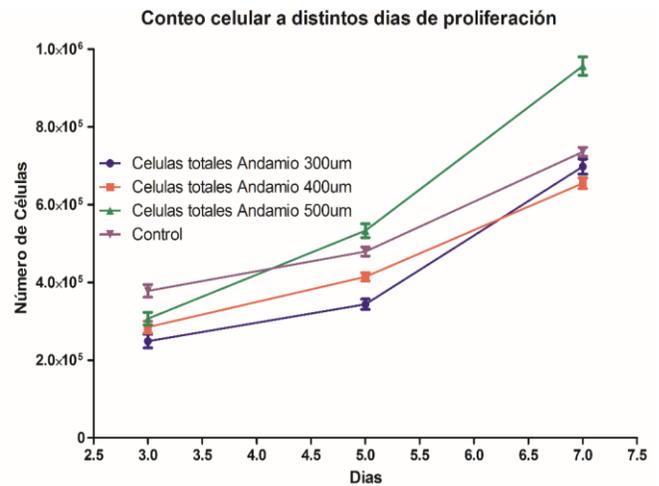


Fig. 7. Cinética de crecimiento celular de progenitores neurales en los tres tipos de andamios (células vivas totales= células unidas al andamio + células en sobrenadante). Se logra apreciar que el andamio que ofrece ventajas al cultivo de progenitores neurales es el andamio con poros de 500 $\mu$ m.

Con este experimento podemos concluir que los andamios no son citotóxicos y que las células que mueren en el sobrenadante no son afectadas por los productos de degradación sino afectadas por el crecimiento en suspensión. Cabe mencionar que el andamio que ofrece mayores ventajas en cuanto a la proliferación es el andamio de 500µm.

#### IV. DISCUSIÓN

El producto principal de biodegradación del PLA es el lactato, existen dos isómeros L-lactato y D-lactato, el lactato de isomería L es biológicamente activo, por lo que el D-lactato no puede ser aprovechado por células de mamífero [8]. En el SNC, el lactato se produce en células gliales y se transporta a las neuronas para ser utilizado como combustible. Para poder utilizarse, el lactato debe ser transformado a piruvato con la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) y de este generarse Trifosfato de Adenosina (ATP) [9]. Si bien se sabe que el D-lactato no es biológicamente activo, es sorprendente que en diversos estudios al utilizar el isómero D-lactato se observan efectos, por ejemplo, sobre la neurotransmisión [9], la neuroprotección [10] y la plasticidad cerebral [11].

Teóricamente los andamios de PDLA se degradan en D-lactato, sin embargo, no hemos evaluado la concentración de este metabolito a distintos días del cultivo. Al realizar estos estudios y observar un incremento en la concentración de D-lactato nosotros podríamos atribuir que los beneficios en el cultivo de progenitores neurales se deben al D-lactato.

#### V. CONCLUSIÓN

Ninguno de los tres tipos de andamios analizados son tóxicos, sin embargo, el que ofrece mayores ventajas en el cultivo de las células es el andamio con poros de 500µm. El tamaño de poro del andamio juega un papel importante en la viabilidad y proliferación celular, sin embargo, los tamaños de poro que analizamos no muestran desventajas al cultivo celular. Las ventajas en los cultivos de progenitores neurales podrían deberse principalmente al D-lactato, metabolito generado por la degradación del material.

#### BIBLIOGRAFÍA

- [1] Siebert, J. R., Eade, A. M., & Osterhout, D. J. (2015). Biomaterial Approaches to Enhancing Neurorestoration after Spinal Cord Injury: Strategies for Overcoming Inherent Biological Obstacles. *BioMed Research International*, 2015, 752572. doi: 10.1155/2015/752572.
- [2] Estrada-Mondaca, S., Carreón-Rodríguez, A., Parra-Cid, M. d. C., León, C. I.-P. d., Velasquillo-Martínez, C., Vacanti, C. A., & Belkind-Gerson, J. (2007). Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Pública de México*, 49, 437-444.
- [3] Tam, R. Y., Fuehrmann, T., Mitrousis, N., & Shoichet, M. S. (2014). Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases: a Biomaterials Approach. *Neuropsychopharmacology*, 39(1), 169-188. doi: 10.1038/npp.2013.237.
- [4] Liu, C., Huang, Y., Pang, M., Yang, Y., Li, S., Liu, L., . . . Liu, B. (2015). Tissue-Engineered Regeneration of Completely Transected Spinal Cord Using Induced Neural Stem Cells and Gelatin-Electrospun Poly (Lactide-Co-Glycolide)/Polyethylene Glycol Scaffolds. *PLoS ONE*, 10(3), e0117709. doi: 10.1371/journal.pone.0117709.
- [5] Álvarez, Z., Mateos-Timoneda, M. A., Hyroššová, P., Castaño, O., Planell, J. A., Perales, J. C., . . . Alcántara, S. (2013). The effect of the composition of PLA films and lactate release on glial and neuronal maturation and the maintenance of the neuronal progenitor niche. *Biomaterials*, 34(9), 2221-2233. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.001.
- [6] Nisbet, D. R., Crompton, K. E., Horne, M. K., Finkelstein, D. I., & Forsythe, J. S. (2008). Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 87B(1), 251-263. doi: 10.1002/jbm.b.31000.
- [7] González-Sánchez, H. M., Monsiváis-Urenda, A., Salazar-Aldrete, C. A., Hernández-Salinas, A., Noyola, D. E., Jiménez-Capdeville, M. E., . . . Castillo, C. G. (2015). Effects of cytomegalovirus infection in human neural precursor cells depend on their differentiation state. *Journal of NeuroVirology*, 21(4), 346-357. doi: 10.1007/s13365-015-0315-5.
- [8] Mosienko, V., Teschemacher, A. G., & Kasparov, S. (2015). Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(7), 1069-1075. doi: 10.1038/jcbfm.2015.77
- [9] Lauritzen, K. H., Morland, C., Puchades, M., Holm-Hansen, S., Hagelin, E. M., Lauritzen, F., . . . Bergersen, L. H. (2014). Lactate Receptor Sites Link Neurotransmission, Neurovascular Coupling, and Brain Energy Metabolism. *Cerebral Cortex*, 24(10), 2784-2795.
- [10] Castillo, X., Rosafio, K., Wyss, M. T., Drandarov, K., Buck, A., Pellerin, L., . . . Hirt, L. (2015). A Probable Dual Mode of Action for Both L- and D-Lactate Neuroprotection in Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(10), 1561-1569. doi: 10.1038/jcbfm.2015.115.
- [11] Yang, J., Ruchti, E., Petit, J.-M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12228-12233. doi: 10.1073/pnas.1322912111