

Crecimiento *in vitro* de células primarias del músculo esquelético de ratón en andamios de PLA, PLA-PPy

E. Zuñiga^{1*}, C. Chapa¹, R. Olayo², J. Morales², R. Godínez²

¹ Departamento de Ingeniería Eléctrica y Computacional, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chih., México

² Departamento de Eléctrica, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México

* esmeralda.zuniga@uacj.com

Resumen— Uno de los objetivos primordiales de la Ingeniería de Tejidos, es el de buscar materiales que promuevan el anclaje, proliferación y diferenciación de un cultivo *in vitro*. En las últimas décadas se han utilizado diferentes tipos de biomateriales, recubrimientos, así como de técnicas de fabricación, que favorezcan el crecimiento en cultivo de diferentes tipos celulares, como lo es el tejido músculo esquelético, encargado del movimiento, y sostén óseo, y que puede ser blanco de múltiples enfermedades, y/o lesiones. En éste trabajo, se realiza el crecimiento *in vitro* de células musculares de ratón en fibras electrohiladas de Acido Poli-Láctico (PLA) y Acido Poli-Láctico polimerizado con Poli-Pirrol (PLA-PPy).

Palabras clave— Fibras electrohiladas, músculo esquelético, Acido Poli Láctico, Poli pirrol.

I. INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético así como el cardiaco, presentan una serie de bandas oscuras y claras perpendiculares al eje longitudinal de la fibra, por lo que también se les conoce como músculo estriado. El patrón estriado en las fibras musculares esqueléticas, resulta del arreglo de numerosos filamentos gruesos y finos en el citoplasma en paquetes de cilíndricos aproximadamente (1 a 2 μm de diámetro) conocidas como miofibrillas. Todas estas miofibrillas, se encuentran alineadas una por encima de la otra [1].

El ciclo de vida de una célula normal, involucra una serie controlada de eventos bien definidos: división, proliferación, migración y apoptosis, los cuales se basan inherentemente, en los principios de organización espacial y temporal. El cultivo de las células en dos dimensiones es posiblemente demasiado simple y pasa por alto muchos parámetros que son importantes para la reproducción precisa de células y la fisiología de los tejidos. Estos incluyen señales mecánicas, la comunicación entre la célula y su matriz y la comunicación entre células adyacentes [2,3].

En décadas recientes se han desarrollado y mejorado nuevas técnicas de fabricación, así como el uso de diferentes recubrimientos que mejoren el anclaje celular, que permitan superar las limitaciones que llegan a tener los cultivos bidimensionales [4-8].

La técnica de electrohilado, esta técnica se utiliza para producir fibras continuas de diámetro micrométrico a nanométrico, por pulverización electrostática de los revestimientos de polímeros. Los andamios electrohilados tienen amplias aplicaciones en la ingeniería de tejidos [9, 10]. Se utilizan principalmente para proporcionar orientación estructural para el crecimiento de neuritas y la extensión axonal. El electrohilado es ventajoso para la producción de fibras ultra finas con orientación especial, alta relación de aspecto, alta área superficial y tamaño de poro controlado [11].

II. METODOLOGÍA

Polimerización por plasma

Las camas electrohiladas de PLA, fueron sintetizados por plasma, por medio de un reactor con descarga de resplandor de baja presión, se utilizó como monómero pirrol (98% Sigma-Aldrich). Esto se realizó en un reactor tubular de vidrio con electrodos de acero inoxidable. Los cubreobjetos así como las fibras electrohiladas, fueron colocados en el reactor de plasma, a una frecuencia de oscilación de 30 watts (Dressler Cesar, RF Power Generator) por 10 min. a una presión de vacío de 3×10^{-2} Torr (Edwards Active Gauge Controller).

Obtención de mioblastos de ratón

Se sacrificaron 5 ratones neonatos de 1-3 días por inhalación de Isoflorano. Se limpiaron los cuatro miembros con etanol al 70%, y se removieron con tijeras estériles. Se retiró la piel y el hueso con fórceps estériles. Una vez obtenido el tejido, se realizó una disociación mecánica y enzimática para la obtención de los mioblastos, utilizando navajas y una solución enzimática de Colagenasa D/

Dispasa/CaCl₂ (SIGMA). El proceso de obtención del modelo celular de mioblastos, se llevó en tres pasos: 1) Pre siembra: depuración de fibroblastos por adherencia, 2) Mantenimiento: suplementación del medio de cultivo para el anclaje y supervivencia de los mioblastos de ratón, 3) Diferenciación: cambio de medio para la formación de miotubos en cultivo.

Fibras electrohiladas de PLA

En este trabajo se utilizó un polímero de PLA por su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Se utilizó el Biopolímero de PLA, INGENIO 3251D de NatureWorks TM aprobado por FDA para ser usado en empaques de comida, el lote usado fue el ZC2428B113 proporcionado por PROMAPLAST-México. Se disolvió 1.2 g del biopolímero en 9 ml de cloroformo a temperatura ambiente, antes de iniciar el proceso de electrohilado se le agregó 1 ml de etanol. La fuente de alto voltaje utilizada fue marca PHYWE- GERMANY HV-Power Supply de 0-25 kV. La solución del biopolímero se inyectó con un sistema de bombeo de jeringas fabricado y controlado con un servo mecanismo diseñado en la UAM-Izt. Para generar fibras se utilizó una jeringa de plástico con aguja 20G de punta plana con un diámetro interior de 0.6 mm. Las fibras fueron colocadas en hornos a una temperatura de 50°C por 1 semana para retirar por completo los restos de cloro que pudieran quedar adheridos en las fibras.

Inmunofluorescencia celular

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

III. RESULTADOS

Polimerización y FT-IR

En la Fig. 1, se muestran las imágenes de las fibras electrohiladas de PLA. En la polimerización por plasma se obtuvo el recubrimiento superficial de los cubreobjetos y de las fibras de PLA; se observa una delgada capa de PPy depositada sobre la superficie de los mismos, los cuales

sirvieron como superficies de crecimiento de células primarias de músculo esquelético.



Fig. 1. Polimerización por plasma de las fibras electrohiladas. Reactor de plasma polimerizando las fibras de PLA (Izq.), fibras electrohiladas de PLA (Der.) polimerizadas con Pirrol.

La Fig. 2., muestra imágenes tomadas por microscopía de barrido electrónico de las fibras electrohiladas, polimerizadas, y sin polimerizar. Observándose que la superficie de la fibra queda recubierta con una delgada capa del polímero de pirrol.

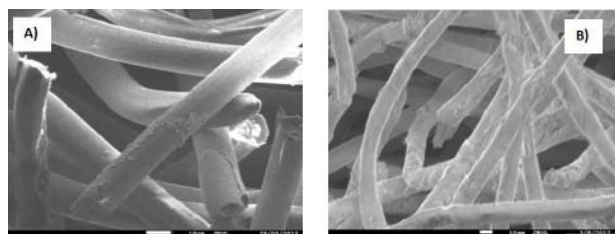


Fig. 2. Imágenes SEM. A) Imagen de microscopía electrónica de las fibras electrohiladas de PLA. B) Imagen de microscopía electrónica de las fibras electrohiladas de PLA-PPy

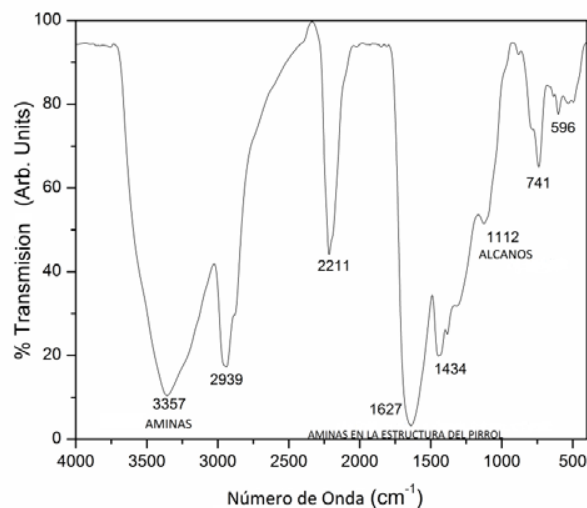


Fig. 3. Espectro de transmisión por FT-IR del PPy.

La Fig. 3 muestra el análisis de transmisión por FT-IR. Se pueden observar todos los picos característicos del PPy [12, 13]. Los picos en 3357 cm^{-1} y 1627 cm^{-1} corresponden a los grupos aminos en la estructura del PPy. El pico ancho en el rango de $500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ contiene muchas absorciones correspondiente a alcanos de la ruptura de los anillos de pirrol durante la polimerización. La anchura de los picos indica la compleja absorción en el polímero debido al entrecruzamiento, enlazamiento e interacciones entre los grupos del pirrol.

Inmunofluorescencia celular

En la Fig.4, se pueden observar las imágenes de los andamios electrohilados sin polimerizar y polimerizado por plasma, en donde se observa el recubrimiento superficial de las fibras con Poli Pirrol (PPy). En las imágenes a) y b) se observa anclaje de las células de músculo esquelético sobre las fibras de PLA Y PLA-PPy.

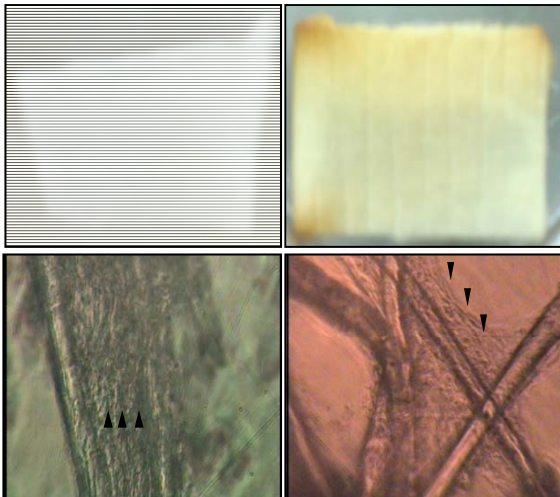


Fig. 4 Células de músculo esquelético sembradas en fibras de PLA (a) y en PLA-PPy (b) (cabezas de flecha indican a las células musculares) (contraste de fases, Barra=50 micras, Amplificación original x400).

En la Fig. 5, se pueden ver las imágenes de la tinción por inmunofluorescencia, realizada a las fibras electrohiladas de PLA y las fibras polimerizadas de PLA con Poli Pirrol, en la que se realizó el sembrado de células músculo esqueléticas de ratón. Se marcó miosina, proteína específica de este tipo de células, así como de ADN contenida en el núcleo celular.

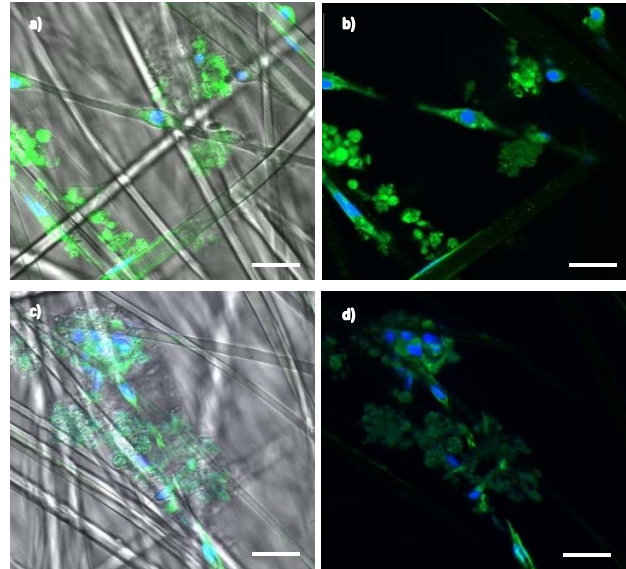


Fig. 5. Microscopía confocal e inmunofluorescencia del crecimiento de células de músculo esquelético en fibras electrohiladas de PLA (a, b) y PLA-PPy (c,d) (Anti-Miosina-FITC, Hoechst, Barra=50 micras, Amplificación original x400)

IV. DISCUSIÓN

La técnica de electrohilado, nos permitió obtener capas de fibras electrohiladas, en el orden de los nanómetros, que sirvieron como andamios de crecimiento de células músculo esqueléticas primarias de ratón. La técnica de polimerización por plasma, permite crear una modificación de las superficies, creando una capa sobre la superficie del material sin alterar sus propiedades físicas y químicas. Se puede ver en la gráfica de FT-IR (Fig.3) los grupos amina, responsables de mejorar el anclaje celular en las capas electrohiladas de PLA.

Con las técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Al marcar superficialmente las células con Miosina, fue posible localizarlas las células músculo esqueléticas primarias de ratón en los cultivos, ya que es una proteína contráctil propia del músculo esquelético.

V. CONCLUSIÓN

Se obtuvo un crecimiento *in vitro* de células músculo esqueléticas de ratón, sobre andamios de PLA y PLA-PPy. La polimerización por plasma, no altera las propiedades superficiales de las fibras, y se observó un buen anclaje de las células en ambos andamios, en donde se observa en ambos cultivos la producción de miosina, proteína contráctil

presente en el músculo esquelético. Por lo que los andamios cubiertos de PLA-PPy no alteran la morfología y propiedades bioquímicas de las células en cultivo, sirviendo como una opción de andamio recubierto para el crecimiento celular *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bente KP, Mark AF. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*. 8:457-465, 2012. DOI:10.1038/nrendo.2012.49.
- [2] Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng K, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 212:97-104, 1994.
- [3] Chang T, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A*. 15:559-67, 2009.
- [4] Chen W, Tabata Y, Tong Y. Fabricating tissue engineering scaffolds for simultaneous cell growth and drug delivery. *Curr Pharm Des*. 16:2388-94, 2010.
- [5] Seyednejad H, Ji W, Yang F, van Nostrum C, Vermonden T, van den Beucken J, et al. Coaxially electrospun scaffolds based on hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone) and loaded with VEGF for tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. 13:3650-60, 2012
- [6] Des Rieux A, Shikanov A, Shea L. Fibrin hydrogels for non-viral vector delivery *in vitro*. *J Control Release*. 136:148-54, 2009.
- [7] Lei P, Padmashali R, Andreadis S. Cell-controlled and spatially arrayed gene delivery from fibrin hydrogels. *Biomaterials*. 30:3790-9, 2009.
- [8] Ehrbar M, Djonov V, Schnell C, Tschanz S, Martiny-Baron G, Schenk U, et al. Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res*. 94:1124-32, 2014
- [9] Xie J, MacEwan M, Schwartz A, Xia Y. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale*. 2:35-44, 2010
- [10] Cao H, Liu T, Chew S. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 61:1055-64, 2009
- [11] Subramanian A, Maheswari KU, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science*. 16:108, 2009. DOI: 10.1186/1423-0127-16-108.
- [12] Ramírez O, Zuñiga E, Olayo R, Morales J, Godínez R. Cell cocultures on coated scaffolds applied to liver models. *Int. J. Medical Engineering and Informatics*, 9: 4, 2017.
- [13] Zuñiga E, Olayo R, Ramírez O, Morales J and Godínez, R. Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 255:7; 729-747, 2014.