



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**MICROTEJIDOS ÓSEOS 3D DESARROLLADOS POR EL MÉTODO DE
CULTIVO CELULAR EN LEVITACIÓN MAGNÉTICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Biol. ÍÑIGO GAITÁN SALVATELLA

TUTOR

Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de
la Salud

CO-TUTOR

AMAURY DE JESÚS POZOS GUILLEN

Universidad Autónoma de San Luis Potosí



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

Agradezco a todos que me han brindado apoyo durante todos estos años de estudio, agradezco a toda mi familia por brindarme un gran apoyo, a mi padre el Dr. Luis Alberto Gaitán y sobre todo a mi madre la Dra. M.^a Ángeles Salvatella por permitirme completar una gran etapa de mi vida y darme todo el apoyo necesario desde la distancia.

A mi tío Andrés por pertenecer a mi vida y ser un gran soporte para toda esta etapa, sin él no podría haber completado esta gran meta.

A mi hermana M.^a del Mar Gaitán por acompañarme en este periodo y apoyarme siempre que ha sido necesario.

A todos aquellos que me han acompañado en los estudios previos, que sin ellos nunca habría conseguido completar esta etapa:

Gracias con todo cariño a mi profesor Joaquín Albesa, gracias por hacer que me enamore de la biología y ayudarme en todos los momentos de mi etapa de estudios y por ser parte fundamental de mi carrera académica, sin ti nada de esto hubiera sido posible.

Gracias a todos los profesores de los Salesianos de Burriana por otorgarme una educación académica fundamental de mi vida.

Gracias a la Universitat de València por enseñarme todo sobre la biología y seguir amando dicha carrera.

A la Universidad Autónoma de México por ser mi segunda casa durante este periodo de posgrado y darme la oportunidad de seguir con mi carrera profesional.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez por ser mi tutor y haberme aceptado para realizar este proyecto, por todas sus enseñanzas, apoyo y confianza que me ha brindado y sobre todo, gracias por ser mi segundo padre durante este periodo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos y de mi generación de estudios: José Luis, Paola, Lucía, Daniela, Febe, Osmar, Saúl, Laura, Adrián, Alan, Rodolfo, y Elsa.

Gracias con todo corazón a una persona fundamental en este periodo y en mi vida como lo es Diana, la cual ha sido, y será mi guía y mi luz durante esta etapa y en las que están por llegar, sin ella no hubiera llegado hasta este momento.

A todos los profesores del programa de Maestría y Doctorado en ciencias médicas, odontológicas y de la salud por todos los conocimientos compartidos y todas las enseñanzas otorgadas, en especial cariño a la Dra. Martha Contreras.

Gracias a la Dra. Elba R. Leyva Huerta por toda su pasión y entrega a la Universidad, gracias por todo el apoyo y confianza.

Gracias a la Dr. Fernando Suaste Olmos, por ayudarme en todo el proceso del proyecto y compartir los conocimientos en este campo.

A mi co-tutor el Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillen y a mi miembro del comité tutor el Dr. David Masuoka Ito, por todas observaciones dadas a mi proyecto.

Gracias a todos mis amigos de España por ayudarme en esta etapa y ser un gran apoyo, que sin vosotros nada de esto sería posible, gracias a Carlos Guillamón, Alejandro Pino, José Gil, Pepe Comes, Angela, Sebastián, Ferran, José Miguel, Paula, Irene, Martha y María Villarroya.

Especial cariño a Yeray por ser un gran apoyo en todos los momentos de este proceso y compartir unas grandes risas.

Y también especial cariño a mi primera compañera de laboratorio María Jesús Piñar, por compartir unos grandes momentos durante la carrera y ayudarme a que todo esto sea posible.

En cuanto a Hobbies, gracias al mundo del fútbol y de los videojuegos por ser una forma de escape en los momentos difíciles, en especial, al equipo de mi alma, el FC Barcelona. A CONACyT por el apoyo económico otorgado con número de becario 855179 para mis estudios de Maestría en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM al proyecto PAPIIT IT203618 que me permitió la realización de esta investigación.

Se agradece el financiamiento por parte del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT de Investigación Científica Básica al proyecto A1-S-9178 que permitió la realización de esta investigación.

Índice de abreviaturas

3D: Tridimensional.

2D: Bidimensional.

ALP: Fosfatasa Alcalina (por sus siglas en inglés)

BMP: Proteína morfogénica ósea (por sus siglas en inglés).

BMP-2: Proteína morfogénica ósea-2 (por sus siglas en inglés).

BSA: Suero de Albumina Bovina (por sus siglas en inglés).

MEC: Matriz extracelular (por sus siglas en inglés).

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos (por sus siglas en inglés).

HARV: Recipiente giratorio de alto aspecto (por sus siglas en inglés).

HTS: Proyección de alto impacto (por sus siglas en inglés).

iPSCs: Células pluripotentes inducidas (por sus siglas en inglés).

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés).

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos (por sus siglas en inglés).

MLM: Método de levitación magnética.

MSC: Células troncales mesenquimales (por sus siglas en inglés).

NPM: Nanopartículas Magnéticas.

OB: Osteoblastos.

PBS: Tampón Fosfato Salino (por sus siglas en inglés).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés).

PDMS: Polidimetilsiloxano.

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por transcripción reversa.

RANKL: Ligando del Receptor para la activación del factor nuclear κ -B (por sus siglas en inglés).

RCCS: biorreactor de sistema de cultivo de células rotatorias (por sus siglas en inglés).

RWV: Biorreactor de vaso de pared (Por sus siglas en inglés).

RER: Retículo endoplasmático rugoso.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SSB: Biorreactor de suspensión agitada (por sus siglas en inglés).

STLV: Recipiente lateral de giro lento (por sus siglas en inglés).

Resumen

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado cuya matriz extracelular se encuentra calcificada donde se encuentran embebidas las células osteoblásticas que lo secretan. Este tejido presenta una estructura jerárquica donde el 90% se encuentra a manera de fibras formadas por proteínas como el colágeno y el 10% restante por nanocristales de hidroxiapatita y proteínas no colágenas.

En procesos patológicos y/o traumáticos la organización estructural se pierde y cuando el defecto es demasiado grande no logra recuperarse por si solo. Por ello, la búsqueda de nuevas estrategias para tratar de regenerar este tejido a partir del campo de los biomateriales se llevó a la denominada ingeniería de tejidos definida como el campo que lleva a la práctica la combinación de andamios, células y moléculas biológicamente activas con la finalidad de crear tejidos funcionales. Sin embargo, los enfoques actuales sobre la utilización de dichas prácticas en la ingeniería de tejidos, posee enfoques en una o dos dimensiones, que presentan una serie de desventajas como el hecho de no conseguir mimetizar al completo la estructura jerárquica tridimensional del hueso cuando las células se encuentran bajo cultivo celular. Por lo cual, la ingeniería de tejidos está comenzando a investigar el uso de nuevas técnicas de cultivo 3D que poseen varias ventajas frente a los cultivos 2D o de monocapa, como el hecho de reflejar los gradientes moleculares, las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM).

En este trabajo de investigación uno de los objetivos fue implementar una estrategia de cultivo celular de esferoides 3D. El método de cultivo seleccionado para dicho fin fue el de levitación magnética utilizando nanopartículas de magnetita (NP-Fe₃O₄). Las NP-Fe₃O₄ al interactuar con osteoblastos humanos permiten ensamblar tejidos multilíneales estratificados secuencialmente como modelos de cultivos esferoides 3D como una futura aplicación en el campo de la regeneración de tejidos mineralizados.

Los esferoides 3D formados mostraron una proliferación celular ideal, indicando que la utilización del campo magnético para inducir la levitación del cultivo celular no afecta la proliferación celular. Asimismo, los esferoides fueron observados por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) para caracterizar el microtejido óseo establecer sus tamaños y observar su morfología. Por último, se analizó la expresión de

las proteínas no colágenas que juegan un papel esencial en la regeneración ósea como osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y osteocalcina (OCN) mediante inmunocitoquímica. Nuestros resultados indican que la implementación del cultivo celular en levitación magnética para generar esferoides 3D son de fácil manipulación en los cultivos celulares, permiten el desarrollo de microtejidos complejos y que tendrían una aplicación directa en las estrategias de regeneración ósea o de diversos tejidos del cuerpo humano como sistema nervioso, muscular o piel.

Abstract

Bone tissue is a specialized connective tissue with a calcified extracellular matrix where the osteoblastic cells that deposit are embedded. This tissue has a hierarchical structure where 90 % is found as random fibers formed principally by collagen and the remaining 10 % by hydroxyapatite nanocrystals and non-collagen proteins.

In pathological and/or traumatic processes the structural organization is lost and when the defect is too large, it could not recovery by its own. Therefore, the search for new strategies to try to regenerate this tissue from the field of biomaterials led to the so-called tissue engineering (TE) defined as the field that leads to the practical combination of scaffolds, cells and biomolecules in order to create a functional tissue. However, the current approaches in the TE is the use of one or two-dimensional cell cultures which have several disadvantages such as the failure to completely mimic the three-dimensional hierarchical structure of bone when the cells are located under cell culture. Therefore, TE is beginning to investigate the use of new 3D culture techniques that have several advantages over 2D or monolayer cultures, such as reflecting molecular gradients, cell-cell and cell-extracellular matrix interactions (ECM).

In this research work one of the main objectives was to implement a strategy of 3D cell culture to form a specific spheroid. The culture method selected for this purpose was magnetic levitation using magnetite nanoparticles (NP-Fe₃O₄). NP-Fe₃O₄ when interacting with human osteoblasts allow to assemble sequentially stratified multilineage tissues as 3D spheroidal culture models as a future application in the field of mineralized tissue regeneration.

The 3D spheroids formed showed an ideal cell proliferation, indicating that the use of the magnetic field to induce the levitation of the cell culture does not affect cell proliferation and growth of the microtissue. Moreover, the spheroids were observed by optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM) to characterize the bone microtissue to establish its sizes and observe its morphology. Finally, we analysed the expression of non-collagen proteins that play an essential role in bone regeneration such as osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP) and osteocalcin (OCN) by immunocytochemistry. Our results indicate that the implementation of cell culture

under magnetic levitation to generate 3D spheroids are easily manipulated in cell cultures, allow the development of complex microtissues and could have a direct application in the strategies of bone tissue regeneration or move the application of levitation culture of several tissues of the human body as neuron, muscle, skin, etc.

Índice

Capítulo 1: Introducción	11
Capítulo 2: Antecedentes	14
2.1: El hueso	15
2.2: Técnicas 3D	19
2.2.1: Del 2D al 3D	19
2.2.2: Técnicas de cultivo 3D	22
2.2.2.1: Técnicas que requieren andamios	22
2.2.2.1.1: Andamios	22
2.2.2.1.2: Hidrogeles	25
2.2.2.2: Técnicas que no requieren andamios	25
2.2.2.2.1: Biorreactores	26
2.2.2.2.2: Bioimpresión 3D Magnética	28
2.2.3: Organoides	29
2.2.3.1: Gota colgante	30
2.2.3.2: Biorreactor del vaso de la pared (BWV)	31
2.2.3.3: Platos de baja adhesión	32
2.2.3.4: Levitación Magnética	32
Capítulo 3: Diseño experimental	35
3.1: Planteamiento del problema	36
3.2: Pregunta de investigación	36
3.3: Justificación	36
3.4: Hipótesis	37
3.5: Objetivo general	37
3.6: Objetivos específicos	37
Capítulo 4: Material y Métodos	38
4.1: Cultivo de Osteoblastos	39
4.2: Modelo de cultivo celular en Levitación Magnética	39
4.3: Proliferación celular	40
4.4: Tinción de cristal violeta	40

4.5: Diferenciación celular	41
4.5.1: Inmunofluorescencia en microtejido 3D completo	41
4.5.2: Caracterización ultraestructural del microtejido 3D:	42
4.6: Ensayo de viabilidad por Cell Tracker	42
4.7: Análisis estadístico	42
4.8: Tipo y universo del estudio , variables utilizadas y criterios	43
Capítulo 5: Resultados	44
5.1: Cultivo de organoides utilizando el método de levitación magnética	45
5.2: Ensayo de proliferación celular y análisis estadístico	46
5.3: Observación morfológica de los organoides por cristal violeta	49
5.4: Inmunofluorescencia en microtejido 3D depositado	49
5.5: Caracterización ultraestructural del microtejido 3D depositado	50
5.6: Ensayo de viabilidad por Cell Tracker	53
Capítulo 6: Discusión	55
Capítulo 7: Conclusiones	62
Capítulo 8: Bibliografía	64

Capítulo 1:

Introducción

Las definiciones encontradas para el tejido óseo son varias y una de las más utilizadas es la proporcionada por (Leslie p. & Hiatt, 2008), la cual define el hueso como un tejido conjuntivo especializado cuya matriz extracelular está calcificada e incluye las células que lo secretan. A pesar de que el hueso es una de las sustancias más duras del organismo humano, es un tejido dinámico que cambia de forma constantemente en relación con las fuerzas que soporta (Leslie p. & Hiatt, 2008). Este tejido posee, además, la capacidad de regenerarse tras un trauma o por alguna lesión causada siempre y cuando no sea un defecto óseo donde el proceso regenerativo no puede llevarse a cabo. Cuando esto sucedo, es muy común la utilización de injertos óseos para la regeneración y formación de hueso nuevo, con el objetivo de ser lo suficientemente similar al tejido original (Gallón, et al., 2017). La alta frecuencia de aparición de defectos óseos ha hecho necesaria la existencia de Bancos de huesos a nivel mundial, donde en España, a partir del 2006 se han registraron hasta más de 80 bancos, llevando al tejido óseo ser el segundo tejido con mayor demanda en cuanto a trasplantes y en México sigue la tendencia de considerarse uno de los tejidos con mayor demanda, por lo cual hay un auge en la investigación en el desarrollo de nuevos materiales y técnicas tanto de síntesis como de cultivos, con el objetivo de regenerar el tejido óseo (San Julián & Valentí, 2006) (Kotela, et al., 2009). Cabe destacar que, aunque se espera un éxito a la hora de reemplazar y regenerar el tejido óseo por estas estrategias, no todos los materiales sintetizados son aptos para este cometido, por ejemplo, los materiales metálicos o poliméricos presentan varias deficiencias con respecto a la rigidez y resistencia cuando son comparados con las propiedades del tejido natural (Kotela, et al., 2009).

En general la mayor parte de técnicas utilizadas actualmente van en la dirección de formar andamios que deben poseer varias características importantes: biocompatibilidad, resistencia mecánica y una porosidad óptima e interconectada para la siembra celular, transporte de nutrientes y oxígeno, y la capacidad de unirse a las células adyacentes y liberar factores de crecimiento cuando sea necesario (Gilbert & Budinskaya, 2017). No obstante, la formación de un material “perfecto” que cumpla todas estas cualidades es muy complicado y difícil de completar hoy día. Es por ello por

lo que las investigaciones se han dirigido hacia las técnicas de cultivos en 3D, en concreto en el estudio de la formación de organoides u esferoides.

Actualmente, estas técnicas de cultivo 3D poseen ventajas frente a las clásicas de monocapa o de cultivo 2D en presencia de andamios debido a que exploran una mayor interacción celular, una mejora en la comunicación de las biomoléculas en el microambiente 3D y que no están excluyendo a las clásicas sino más bien pueden servir de apoyo para que en un futuro se logre una combinación que podría incluso abrir nuevas líneas de investigación en la ingeniería de tejidos. Estas técnicas de cultivo 3D también son de mucha utilidad en el estudio de los ámbitos regenerativos, incluyendo el uso de biomoléculas y/o fármacos, lo que permite abordar problemas de lesiones críticas, respuesta a fármacos y búsqueda de soluciones que los andamios clásicos no pueden aportar llegando a uno de los grandes objetivos de la investigación tisular como lo es el combate de enfermedades para conseguir su cura, con lo que se llevaría, al fin y al cabo, a un gran propósito como lo es el intento de salvar vidas.

Capítulo 2:

Antecedentes.

2.1.-El Hueso

Como se ha mencionado anteriormente, el hueso queda definido como un tejido conjuntivo especializado cuya matriz extracelular se encuentra calcificada e incluye las células que lo secretan. Una de las características más importantes del hueso es que está formado por una combinación de materiales inorgánicos y orgánicos (Nordin, 2004).

Una gran característica del hueso es que aun teniendo una importante función de ser el marco estructural principal para el apoyo y protección de los órganos del cuerpo (Leslie p. & Hiatt, 2008), también posee una gran elasticidad. La dureza del hueso depende de las sales inorgánicas de que está impregnado, y por otra parte, la elasticidad del hueso está dada por el componente orgánico de la matriz que le otorgan plasticidad (Carrera, 2013). Dichas propiedades son aún difíciles de mimetizar en el campo de la ingeniería de tejidos.

El hueso está formado por una matriz ósea, la cual, se encuentra conformada por una parte orgánica y otra inorgánica. La parte orgánica está conformada por un componente predominante, como lo es el colágeno de tipo I, abarcando aproximadamente el 90% de la parte orgánica y alrededor de un 35% del peso seco del hueso, mientras que el 10% restante está formado por proteínas no colágenas (Morgan, et al., 2008) (Leslie p. & Hiatt, 2008). La parte inorgánica abarca aproximadamente un 65% del peso seco del hueso, y está formada por varios componentes, los dos más abundantes son el calcio y el fósforo. Aparte de estos dos integrantes; también se encuentran el bicarbonato, citrato, magnesio, sodio y potasio (Welsch & Ulrich, 2010). Los dos componentes más abundantes se encuentran además organizados en una forma especial denominada cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Hall, 2015). Estos cristales poseen una medida de 40 nm de largo por 25 nm de ancho y de 1.5 a 3 nm de grosor y se encuentran dispuestos en una forma ordenada a lo largo de las fibras de colágeno tipo I, donde estos cristales se depositan en las regiones del intersticio del colágeno, pero también por la región superpuesta.

El hueso, además, está conformado por tres principales componentes celulares, células osteoprogenitoras, osteoclastos y osteoblastos.

Las células osteoprogenitoras se encuentran en la capa celular interna del periostio, como un recubrimiento de los canales haversianos y el endostio. Este tipo de células poseen una capacidad de diferenciación hacia osteoblastos y en ciertos casos en células condrógenas (Leslie p. & Hiatt, 2008). Por otra parte, en el hueso que posee un crecimiento activo, como lo es el caso del hueso fetal o en un periodo de alto recambio en el hueso adulto, las células aumentan de tamaño y de número, conteniendo núcleos ovalados grandes y citoplasma de huso más abundante (Lowe & Anderson, 2015).

Los osteoblastos se originan a partir de células progenitoras mesenquimales, que también dan lugar a condrocitos, células musculares y adipocitos. Estos osteoblastos pueden ser llevados a diferenciación mediante la activación de distintos factores de transcripción inducidos por las proteínas morfogenéticas como se ilustra en la figura 2.

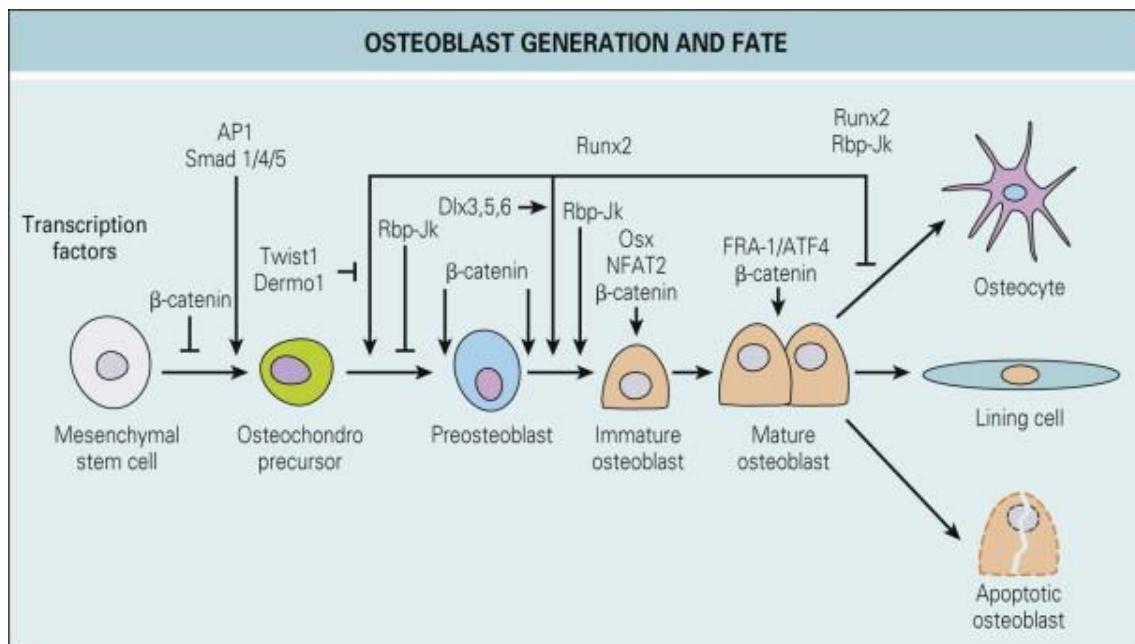


Figura 1: En la figura se ilustra el proceso de diferenciación a partir de MSC. Una de las vías implicadas en la diferenciación es la vía canónica de la β -catenina, donde mediante su inhibición, las MSC poseen capacidad de diferenciarse a Preosteoblasto con la participación de factores de transcripción como Runx2 o la propia vía de β -catenina. A partir de los Preosteoblastos, las células se pueden seguir diferenciando, hasta osteoblastos maduros donde a partir de estos pueden llegar a diferenciarse a otras líneas celulares como los osteocitos, células endoteliales vasculares u osteoblastos apoptóticos. Figura perteneciente a (Burr, et al., 2015).

Debido a que los osteoblastos son los encargados de la regeneración ósea, no es ningún secreto que estas células sean el objetivo de estudio de los últimos años en cuanto a la regeneración ósea. Las células troncales mesenquimales (MSC) persisten hasta la edad

adulta y proporcionan un suministro constante de osteoblastos para la remodelación ósea en adultos. La mayoría de las MSC asignadas para el linaje de osteoblastos se encuentran en la médula ósea y comprenden aproximadamente 1/100000 células de la médula ósea (Kassem & Abdallah, 2008). Como marcadores de formación de matriz mineralizada se utilizan proteínas como Osteopontina (OPN), Osteocalcina (OCN) o la Sialoproteína ósea (BSP):

- OPN: La osteopontina, también conocida como activación temprana de linfocitos T 1 (Eta-1) o fosfoproteína-1 secretada (Spp-1), es una proteína multifuncional de 314 aminoácidos, 44 kDa con sitios de multifosforilación expresados en varias células inmunes y se encuentra en varios tipos de tejidos y órganos, como huesos, riñones y dientes (Ikeshima-Kataokaa, et al., 2018). La OPN induce la secreción de citoquinas, participa en la interferencia entre el hueso y el sistema inmunológico a través de muchos tipos de receptores, incluyendo integrinas de la familia y CD44 (Gravallese, 2003). En la regeneración ósea la OPN se expresa en etapas tempranas en las células osteoprogenitoras para la diferenciación a OB (Hernandez-Gil, et al., 2006).
- BSP: La sialoproteína ósea, es un marcador de diferenciación de los preosteoblastos al osteoblasto y aparece cuando se inicia la mineralización (Hernandez-Gil, et al., 2006). La BSP es una fosfoproteína altamente glicosilada y sulfatada que posee una característica propia en cuanto a su localización dada que se encuentra exclusivamente en tejidos conectivos mineralizados. Esta proteína se caracteriza por tener un dominio de arginina, glicina, aspártico (RGD) (Hernández, et al., 2011).
- OCN: Al igual que la BSP, la osteocalcina es un marcador de diferenciación de los preosteoblastos al osteoblasto y aparece cuando se inicia la mineralización (Hernandez-Gil, et al., 2006). Se trata de una proteína no colagénica que presenta tres restos de ácido γ -carboxiglutámico y afecta a la morfología y a la dureza del hueso (Bailey, et al., 2017).

Por último, los osteoclastos son células multinucleadas que se originan en progenitores granulocito-macrófago y poseen una función en la resorción ósea. El precursor del

osteoclasto se encuentra en la médula ósea y son atraídos a los sitios óseos que se encuentran destinados a la reabsorción. Los osteoclastos llegan a fusionarse entre ellas, dando lugar a células multinucleadas grandes (Lowe & Anderson, 2015). En un sitio de reabsorción ósea activa, en el osteoclasto se pueden encontrar cuatro regiones identificables como se muestra en la figura 3:

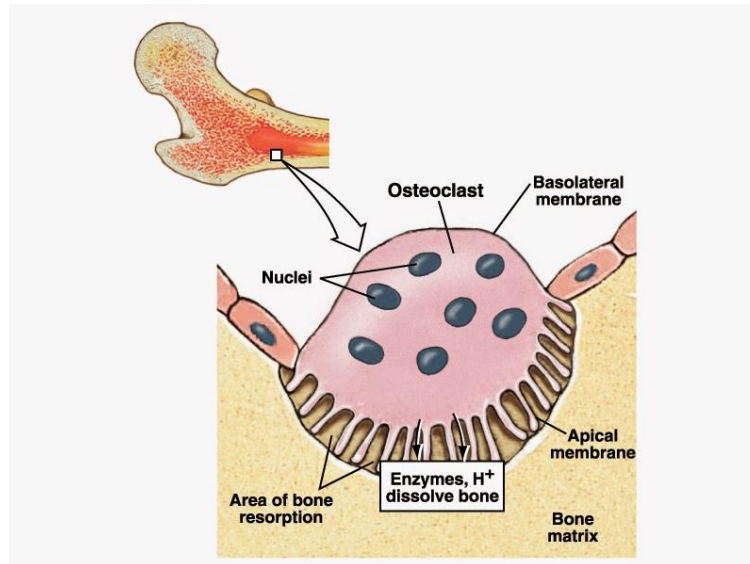


Figura 2: Ilustración que muestra la morfología del osteoclasto, dónde se puede observar la región del área de reabsorción ósea. Se observa en la base del osteoclasto la zona denominada como borde en cepillo, cuya función es aumentar la superficie celular para la secreción y la absorción de los contenidos del compartimento de resorción. También se puede observar la cantidad de núcleos que los osteoclastos pueden llegar a tener. En la membrana apical se encuentra la zona vesicular que posee numerosas vesículas endocíticas y exocíticas que transportan enzimas lisosómicos y metaloproteinasas al compartimento subosteoclástico y los productos óseos que han sido degradados. Imagen recuperada de (Cruz, 2014).

El hueso siempre se encuentra en constante remodelación ósea en el cual es reemplazado el tejido viejo por un tejido nuevo. En adultos este proceso se encuentra en equilibrio con la resorción ósea, a medida que hay remodelación para adaptarse a las fuerzas que el tejido debe soportar. El ser humano durante todas sus actividades cotidianas es propenso a sufrir cualquier tipo de accidentes. Varios de estos accidentes terminan en fracturas óseas, además, de incluir enfermedades óseas que aumentan en mayor número los defectos óseos. En el caso de España, en el 2015, se ha registrado 25.440 fracturas cerradas sufridas en el ámbito de trabajo, añadiendo a este número las 3.042 personas que han sufrido fracturas abiertas (Statista, 2016). Estos datos son solo sobre los accidentes laborales, pero, si añadimos, por ejemplo, los datos sobre la

osteoporosis, el número aumenta hasta registrarse en 2010 casi 27.5 millones de personas diagnosticadas por osteoporosis en la Unión Europea, donde, en 2017 fueron casi 3.5 millones de casos (Anon., 2017). En México, se han reportado 29.732 casos de fracturas solo en el 2005, y se estima que el número de casos aumentara drásticamente hasta cerca de 156 mil casos para el año 2050 (Johansson, et al., 2011). El costo total directo de las fracturas proyectada en México superara los 555 millones de USD para 2050 y aumentara constantemente debido a que la población y la expectativa de vida aumenta en la población mexicana. Debido a este elevado número de casos, la importancia en la búsqueda de alternativas para la regeneración toma relevancia día con día en las áreas de investigación biomédica.

El proceso de reparación ósea es afectado por factores de riesgo como el envejecimiento, diabetes o el ser fumador, que provoca un aumento en el riesgo de falla en este proceso (Gregory & Clines, 2011). Con el fin de disminuir este tipo de fallas, el único medicamento aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) ha sido la aplicación de proteína morfogénica ósea-2 (BMP-2) (Dean, et al., 2009). En el caso de fracturas por Osteoporosis, donde existe una deficiencia de estrógenos, glucocorticoides o inflamación, se ha llegado a demostrar que la aplicación de hormona paratiroidea anabólica acelera la curación de fracturas en modelos animales, sin embargo, aún no ha sido aprobada para ser aplicada en humanos (Manabe, et al., 2007). Pese a la aparición de dichos medicamentos o técnicas, la tasa de índice de fracturas sigue aumentando, y tal y como dice (Gregory & Clines, 2011) “Claramente, existe espacio para terapias más efectivas dirigidas a la reparación ósea y la regeneración”, ocupando dicho espacio los avances en las técnicas de regeneración 3D, como los andamios o los organoides.

2.2.-Técnicas 3D

2.2.1.-Del 2D al 3D

La búsqueda de distintas estrategias para el desarrollo de técnicas regenerativas del tejido óseo ha sido uno de los principales objetivos de los últimos años, es por ello, que el cambio realizado de los cultivos en dos dimensiones a los de tres dimensiones (como multicapas, organoides/esferoides, etc.) se ha considerado como un evento clave en la ingeniería de tejido óseo. Desde la primera utilización de los cultivos 2D en 1907 por

(Harrison, et al., 1907), dicha técnica ha sido ampliamente utilizada en los laboratorios de todo el mundo debido a la facilidad, conveniencia y alta viabilidad de dichas técnicas. Sin embargo, pese a que son numerosas las ventajas que pueden llegar a ser nombradas, también los son sus propias limitaciones.

Varias de estas limitaciones se centran en el hecho de que dichos cultivos no son representativos al no reflejar la morfología y la funcionalidad de sus fenotipos tridimensionales nativos (Park, et al., 2018). Uno de los elementos principales para tener en cuenta en los cultivos celulares es el microentorno del tejido, en el que se incluyen la matriz extracelular (MEC) y las propias células vecinas (Wiseman & Werb, 2002), es donde se encuentra una de las principales limitaciones de los cultivos 2D, dado que aun teniendo un mejor control sobre su ambiente, carecen del contexto ambiental y de la arquitectura estructural 3D adecuados. Un ejemplo característico para resaltar la importancia del microentorno del tejido es mencionado por (Bissell, 1981) sobre las células epiteliales, dado que estas al cultivarse en monocapas o cultivos 2D, llegan a perder su diferenciación, se convierten en plásticas y muestran unas características muy relacionadas con las células tumorales. A dicha limitación se le puede añadir el problema a la hora de replicar la relación existente entre la interacción célula-célula y célula-MEC, la morfología, diferenciación, polaridad, tasa de proliferación, expresión génica, perfiles genómicos, heterogeneidad celular, gradientes de nutrientes y los gradientes de oxígeno críticos mostrados en células cancerígenas (Jin-Young, et al., 2015) (Koledova, 2017).

La aparición de la ingeniería de tejidos ha tenido una relevante relación con la expansión de las técnicas 3D en los cultivos celulares. La primera aparición del término ingeniería de tejidos fue en 1988 donde fue acuñado oficialmente en el taller de la National Science Foundation donde se le definió como “la aplicación de los principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función de tejidos normales y patológicos de mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función tisular” (Anon., 1988).

Una de las principales bases del campo de la ingeniería de tejidos ha sido la utilización de los andamios porosos que proporcionan un microentorno adecuado para la

regeneración tisular y de órganos. A dichos andamios se les pueden sembrar células con la finalidad de sintetizar tejidos que luego podrán ser implantados en el sitio lesionado o implantarse de forma directa y que el paciente con sus propios sistemas corporales se llegue a una inducción de regeneración *in vivo* (O'Brien, 2011). Por ello, con la aparición de la ingeniería de tejidos, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de una producción de modelos funcionales de tejidos 3D, que sean capaces de imitar estructuras complejas y fisiológicamente relevantes (Penland, et al., 2017).

In vivo prácticamente todas las células de los tejidos residen en la MEC, la cual consiste en una compleja malla fibrosa 3D con una amplia distribución de fibras y huecos que proporcionan señales complejas tanto bioquímicas como físicas (Lee, et al., 2008). Es por ello por lo que uno de los principales logros de las técnicas 3D es el acercamiento claro hacia esa gran imitación de las distintas interacciones que llegan a rodear a las células y por ende, consiguiéndose parecerse a un tejido vivo. En el momento en el que las células llegan a cultivarse en un entorno 3D, estas poseen una serie de características fisiológicas que los hacen parecer con mayor cercanía al tejido nativo original que a los que se lograrían mediante técnicas 2D. Esto puede ser explicado por el hecho de que las células cultivadas mediante técnicas 3D llegan a desarrollar una MEC más elaborada, consiguiendo una mejoría en la comunicación intercelular y conduce a una recuperación o mantenimiento de la función *in vivo* (Fey & Wrzesinski, 2013).

Uno de los ejemplos más claros para explicar las diferencias entre los cultivos 2D y 3D son en las células tumorales, donde la mayoría de estas células, cultivadas en monocapa, no reproducen los microambientes mostrados en los tumores, un espacio complejo tipificado por unas células estromales, componentes de la matriz extracelular y un cóctel de factores de señalización. Los platos de cultivo tisular tienen tres diferencias principales con respecto al tejido donde se aisló el tumor: topografía de superficie, rigidez superficial y una arquitectura 2D en lugar de 3D. Como consecuencia, el cultivo 2D ejerce una presión selectiva sobre las células que podrían alterar sustancialmente sus propiedades moleculares y fenotípicas (Soker & Skardal, 2017).

Los cultivos 3D pueden combinar distintos tipos de células humanas en geles tanto naturales como sintéticos con características similares a la MEC, que formarán estructuras libres de células o cargadas de ellas. Dentro de estos cultivos 3D

desarrollados, los entornos pueden organizarse de forma precisa en formas ordenadas que permiten la selección de fármacos de alto rendimiento. Con todas estas características incluidas, estas técnicas pueden llegar a reemplazar ventajosamente los cultivos 2D básicos e incluso, en un futuro, los modelos animales preclínicos actuales. Por otra parte, las habilidades de la ingeniería 3D para modelar órganos humanos se extienden a la integración de dichos órganos en pacientes. De hecho, los cultivos 3D ya se han utilizado para modelar cómo los humanos metabolizan los fármacos a través de las interacciones entre múltiples órganos (Park, et al., 2018).

Dichas limitaciones de los cultivos bidimensionales han llevado a un aumento de los esfuerzos en los últimos años para desarrollar modelos de cultivo de células 3D que llegan a reproducir mejor la morfología del tejido y que llegan a presentar propiedades mecánicas dinámicas y un entorno bioquímico que poseen una gran semejanza a los órganos vivos.

2.2.2.-Técnicas de cultivo 3D

En general los cultivos 3D, pueden diferenciarse en 2 grupos: Técnicas que requieren de andamios y aquellas técnicas que no necesitan de los andamios.

2.2.2.1.-Técnicas que requieren de andamios

En este tipo de técnicas se utilizan para la formación de cultivos 3D andamios, hidrogeles u otros tipos de materiales.

2.2.2.1.1.-Andamios

Según (Chan & Leong, 2008) los andamios son definidos como biomateriales, hechos típicamente de polímeros, que proporcionan el soporte estructural para la unión celular y el posterior desarrollo del tejido. Uno de los principales objetivos de los cultivos 3D es conseguir mimetizar la MEC, por ello una de las características principales que deben poseer estos biomateriales es el hecho de poseer porosidad interconectada. Existen numerosas posibilidades a la hora de aplicar los andamios y dependiendo de dicha aplicación, estos pueden diseñarse con el fin de ser biodegradables con la finalidad de que el neo-tejido permanezca posteriormente en un período de cultivo determinado posterior a su implantación, o conseguir que sean bioestables en donde se fabrican para tener un tejido compuesto que proporcionará soporte a largo plazo (Grenier S, 2009).

En el caso de los andamios biodegradables, las células remodelan el andamio con sus propias proteínas de la MEC llegando a crear el tejido deseado sin la necesidad de comprometer la integridad estructural del tejido. Los andamios para poder ser utilizados requieren poseer una serie de características importantes:

- Biocompatibles.
- Resistencia mecánica.
- Porosidad óptima.
- Transporte *in vitro* de nutrientes y oxígeno.
- Capacidad de unirse a las células y liberar factores de crecimiento en el momento de necesidad (Gilbert & Budinskaya, 2017).

Claro está que la elección del tipo y del material para el diseño del andamio depende de la aplicación específica de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Los andamios pueden ser creados a partir de numerosos materiales, entre ellos los que son de origen natural, estos poseen una serie de ventajas como el hecho de que generalmente no son tóxicos, además de proporcionar señales biológicas para promover la unión y la proliferación celular (Deluzio, et al., 2013). Por otra parte, los materiales sintéticos se encuentran mayormente disponibles y son fáciles de modificar, con algunas variaciones mínimas de lote a lote. Sin embargo, también poseen ciertas limitaciones, como el hecho de no poseer innatamente sitios apropiados para mejorar las interacciones celulares, careciendo de actividad biológica.

A la hora de la selección del andamio también ha de tenerse en cuenta la reproducibilidad y la relación entre el costo y la eficacia. Entre los métodos más comunes para la fabricación de andamios se incluyen la fundición con disolvente/lixiviación de partículas y electrohilado, o técnicas más avanzadas, como el trazado rápido en 3D, forma libre sólida y estereolitografía de proyección en 3D, las cuales aún continúan en etapas de desarrollo (Carletti, et al., 2011).

Entre las distintas aplicaciones de los andamios se encuentran su utilización como plantillas para la ingeniería de una variedad de tejidos como el tejido óseo, cartilaginoso, cardiovascular, nervioso y la piel (Paul & Sharma, 2012) (Lee, et al., 2017) (Ricklefs, et al., 2017) (Wang, et al., 2018) (Ruiz, et al., 2017).

Entre los distintos andamios utilizados para la regeneración ósea destacan las nanocerámicas. En el contexto de la regeneración ósea, los biomateriales han sido desarrollados con el objetivo de superar las posibles desventajas de los injertos óseos. Estos materiales deben tener propiedades mecánicas similares a las del hueso y reflejar la geometría anatómica del tejido sin causar ninguna respuesta inmune en el huésped durante la regeneración. Estos biomateriales son materiales frágiles que poseen propiedades de baja carga, sin embargo, poseen componentes minerales similares al hueso natural y demuestran poseer una buena biocompatibilidad. Un ejemplo claro de estos materiales son las biocerámicas, las cuales han sido utilizadas para:

- Transportar células óseas, factores de crecimiento y moléculas activas.
- El recubrimiento superficial de implantes para mejorar la integración.
- En la cirugía de tumores.
- En combinación con cemento óseo (Kankilic, et al., 2016).

No sólo las biocerámicas demuestran sus grandes cualidades como biomateriales, sino que en los últimos años se han estudiado más a fondo las denominadas nanocerámicas, que poseen mejores cualidades como regeneradoras óseas, por sus propiedades mecánicas y biológicas, su mayor área superficial, y su capacidad de fabricarse junto con otros polímeros biodegradables como poliésteres, poliuretanos, polianhídridos y policaprolactona para dar lugar a la formación de andamios composites que poseen resistencia mecánica y soporte para la regeneración ósea (Cicuendez, et al., 2012). Para que dicha reconstrucción sea exitosa, estos andamios finales deben ser biocompatibles, con porosidad, que sean biodegradables y que puedan modular las señales celulares para conducir a la formación del tejido (Kankilic, et al., 2016).

Las biocerámicas pueden ser caracterizadas a escala nanométrica por numerosos métodos. Por ejemplo, es posible caracterizar mediante difracción de rayos X, utilizada para determinar la estructura cristalina de biomateriales basados en apatita nanocristalina. Por otra parte, también es posible la caracterización por Espectroscopia de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), la cual caracteriza los enlaces moleculares del material. El área específica del material en polvo, la porosidad o el tamaño de partículas son conocidas gracias al análisis del área de superficie de Brunauer-Emmett-Teller. Finalmente, en el ámbito de las técnicas de microscopia, tanto

la microscopía electrónica de barrido (SEM), como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), son técnicas que permiten la obtención de imágenes con mayores aumentos de la estructura del material (Phillips, et al., 2003), (Lu, et al., 2016).

2.2.2.1.2.-Hidrogeles

Al igual que en el caso de los andamios, los hidrogeles buscan de igual formar simular una MEC. El caso de los andamios, como se ha discutido anteriormente, posee varias ventajas, sin embargo, también se encuentran presentes ciertas limitantes que los hidrogeles no las tienen, como el caso de los andamios microporosos, los cuales permiten una encapsulación conveniente de las células, pero contienen porosidades ($\sim 100 \mu\text{m}$) mayores que el diámetro celular promedio ($\sim 10 \mu\text{m}$). El caso de los andamios nanofibrosos poseen una ventaja de proporcionar una topología tridimensional que imita mejor a la arquitectura formada por las proteínas fibrilares de la MEC; sin embargo, muchos son demasiado débiles para manejar el estrés necesario para la mecanotransducción adecuada (Saha, et al., 2007). Estas limitaciones descritas no son dadas en el caso de los hidrogeles y es una importante ventaja para su utilización, es por ello por lo que se aprovechan de las características dadas por los hidrogeles gracias a su propia composición por poros interconectados con alta retención de agua, lo que permite el transporte eficiente de nutrientes y gases (Geckil, et al., 2011). Además, muchos hidrogeles se pueden formar bajo condiciones suaves, citocompatibles y se modifican fácilmente para poseer ligandos de adhesión celular, viscoelasticidad deseada y degradabilidad (Tibbitt & Anseth, 2009). Para la fabricación de hidrogeles, existe una gran variedad de materiales utilizados para el cultivo de células de mamíferos que comprenden desde materiales puramente naturales como la colágena, ácido hialurónico, quitosano... hasta materiales puramente sintéticos como el polietilenglicol y sus copolímeros y cada sistema de hidrogel posee sus propias ventajas y limitaciones (Tibbitt & Anseth, 2009).

2.2.2.2.-Técnicas que no requieren de andamios

Como su propio nombre indica, estas técnicas no requieren del uso de algún andamio, lo que conlleva una serie de ventajas y limitaciones únicas. Algunos de estos métodos se incluyen el uso de placas de baja adherencia, placas de gotas colgantes, superficies microestructuradas y biorreactores giratorios, levitación magnética y bioimpresión 3D

magnética. A continuación, se explicarán más a detalle las más relevantes para este trabajo de tesis.

2.2.2.2.1.-Biorreactores

Según la definición dada por (IUPAC, 2006) un biorreactor es un aparato utilizado para llevar a cabo cualquier tipo de bioproceso. Sin embargo, en el campo sobre cultivos celulares, los biorreactores se refieren como el aparato que facilita el proceso de cultivo celular mediante descelularización y recelularización de determinados tejidos y la evaluación de sus propiedades biomecánicas a tiempo real (Rus & Melchor, 2014).

Existen numerosos tipos de biorreactores, cada uno con sus ventajas y desventajas, por ejemplo, en el caso de los biorreactores de suspensión agitada (SSB), poseen la capacidad de aceptar más tipos celulares, esto es debido a que las células no requieren de una superficie de fijación especial y pueden operar a una escala mucho mayor que en el caso de los cultivos inmovilizado, incluso se puede llegar a utilizar las células pluripotentes inducidas (iPSCs) que a diferencia de los cultivos adherentes, estas poseen capacidad de crecer en los biorreactores de suspensión.

La principal ventaja reside en el hecho de que los cultivos en el SSB son más homogéneos y rentables, debido a la agitación la cual es importante para mantener el tamaño del agregado, dado que rompe las celdas, además del hecho de que dicha agitación posee un papel importante en la regulación de la pluripotencia y la supresión de la diferenciación a través de la tensión de cizallamiento del fluido (Shafa, et al., 2012). Sin embargo, el principal problema de los SSB es el hecho de que en el proceso de funcionamiento continuo, los organismos se eliminarán del reactor con el efluente.

Otros tipos de reactores utilizan la inmovilización para utilizar una buena biocatálisis, incluidas las enzimas, orgánulos celulares, células animales y vegetales. Es por ello por lo que (Peinado, et al., 2006) define inmovilización como una descripción de una amplia variedad de fijación o atrapamiento de células o partículas. Para llegar a utilizar los biorreactores hay que tener en cuenta varios factores, debido a que durante la actividad de los biorreactores, el medio llega a cambiar debido al crecimiento de los microorganismos, cambio en el pH, cambio en la temperatura, en la oxidación, etc. Todos estos factores reducen el crecimiento y la proliferación y, como consecuencia, reducen el rendimiento del biorreactor (Mardoukhi, et al., 2015).

Existen otros biorreactores mayormente relacionados con la formación de organoides (ver apartado de organoides). Los biorreactores “ProtoTissue” están especialmente diseñados para ser fáciles de manipular y mantener el 100% de humedad alrededor de la cámara de crecimiento, donde se consigue una apta formación de los organoides y llegándose a obtener una viabilidad del 90% (Fey & Wrzesinski, 2013) (Fig. 4).



Figura 3: Imagen del biorreactor "ProtoTissue", imagen sacada de (Fey & Wrzesinski, 2013).

Además de estos biorreactores, existen muchas más como los biorreactores de puente aéreo, fibra hueca o el biorreactor de sistema de cultivo de células rotatorias (RCCS) (Fig. 5). Este último ha sido inventado por la NASA, y es el que se utiliza mayormente en el área de ingeniería de tejidos con fines regenerativos y médicos. Actualmente se encuentra en desarrollo este tipo de técnicas con el fin de mejorar el rendimiento de los biorreactores, entre ellos el cultivo de perfusión, el uso de microvehículos y métodos para suprimir la apoptosis y controlar el crecimiento celular en tiempo real (Wang, et al., 2005). Es más, se han realizado diversos estudios de vuelo espacial de células y tejidos para comparar los distintos tipos de cultivo, realizándose en este caso, cultivos en 3D para promover la diferenciación celular y la perfusión con o sin rotación, con el fin de proporcionar un mecanismo independiente de la gravedad para la mezcla de fluidos y transporte masivo (Freed & Vunjak-Novakovic, 2002).

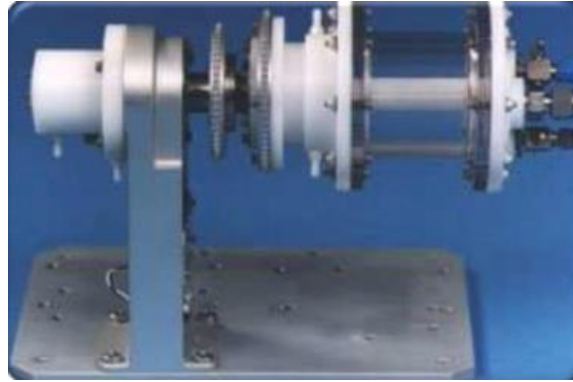


Figura 4: Imagen de un biorreactor RCCS, imagen adaptada de (Chebat, 2014).

2.2.2.2.-Bioimpresión 3D magnética.

Una de las técnicas mayormente utilizadas en el ámbito de la formación de cultivos 3D, es la utilización de la fuerza magnética (Bumpers, et al., 2015), entre dichas técnicas se puede mencionar la bioimpresión 3D magnética. Ésta se trata de una técnica que emplea nanopartículas magnéticas biocompatibles para imprimir células en estructuras 3D o cultivos celulares 3D. Para su formación, las células son etiquetadas por nanopartículas magnéticas (nanoshuttle), donde después se pueden imprimir rápidamente en patrones 3D específicos utilizando fuerzas magnéticas externas que imitan la estructura y la función del tejido (Souza, et al., 2010).

Dicha técnica posee numerosas ventajas con respecto a otras técnicas 3D, como la extrusión, la fotolitografía y la estereolitografía, además de que se requieren menos días para la formación de la estructura 3D y un manejo más fácil (Tseng, et al., 2015). Por el contrario la utilización de esta técnica requiere de unas características importantes como un proceso de bioimpresión rápida (15 min - 1 h) (Friedrich, et al., 2009); la síntesis endógena de la MEC sin la necesidad de un sustrato de proteína artificial; y buen control espacial (Daquinag, et al., 2013). Usando este sistema, los modelos de cultivo de células 3D pueden imprimirse rápidamente, desde esferoides simples y anillos, hasta modelos de órganos más complejos, como el del pulmón (Tseng, et al., 2013), válvula aórtica, (Tseng, et al., 2013) y tejido adiposo (Daquinag, et al., 2013).

Esta técnica puede ser utilizada para numerosas aplicaciones como la detección de toxicidad cardiovascular (Gwathmey, et al., 2009), formación de anillos 3D para intentar mimetizar los vasos sanguíneos y sus propias dilataciones y contracciones a partir de células musculares lisas vasculares impresas en anillos 3D (Tseng, et al., 2013). Es más,

dicha técnica podría llegar a ser una clara alternativa para los experimentos que llegan a utilizar tejido *ex vivo*, los cuales son costosos y pueden llegar a producir pocos datos experimentales. Este tipo de técnica permite combinar los beneficios de la bioimpresión 3D en la construcción de estructuras parecidas a tejidos para el estudio con la velocidad de la impresión magnética.

2.2.3.-Organoides

(Sambale, et al., 2015) define los organoides, como agregados celulares que representan un sistema 3D simple ya que no se requiere de la utilización de andamios o material de soporte para el crecimiento celular 3D. La primera utilización de organoides data de 1944 en un trabajo sobre morfogénesis, utilizando para ello un método de estudio 3D (Holtfreter, 1944).

Una de las principales características fundamentales de los organoides es su propia geometría, debido a que llega a determinar la forma, el estado de polaridad y el ambiente celular de los organoides, y son características propias para obtener una determinada expresión de genes y el comportamiento biológico de las células (Mueller-Klieser, 1997). En cultivos celulares donde se utilizan organoides, las células llegan a secretar MEC en la que se encuentran y pueden interactuar con las células de su microambiente original. Las técnicas para formar organoides se encuentran actualmente en auge debido a las nuevas plataformas microfabricadas susceptibles de cribado de alto rendimiento (HTS) y los avances en el cultivo celular (Fennema, et al., 2013).

El tamaño de los organoides es una característica fundamental para tener en cuenta dado que posee una influencia directa con las respuestas celulares. Ejemplo de ello es que los organoides de pequeño tamaño no llegan a mostrar la complejidad del tejido real, mientras que los esferoides de mayor tamaño presentan problemas a la hora de difundir el oxígeno y los nutrientes (Asthana & Kisaalita, 2012). Los organoides han tenido un gran éxito en varios campos importantes de la investigación, tales como el de la Biología Celular (adhesión, migración o morfogénesis), la Virología (aislamiento, propagación y cuantificación de virus, interacción célula-virus); la Farmacología (evaluación de fármacos); la Inmunología (producción de vacunas, uso de moduladores inmunitarios); la Cirugía (comportamiento de células de diferentes tejidos, como las de

hueso y cartílago en diferentes medios o frente a diferentes materiales); la Oncobiología y la Cancerología (recreación de tumores, estudios de quimiocinas en células cancerosas, o terapia basada en anticuerpos); la Biología del Desarrollo y de la fertilización (desarrollo de embriones), etc. (Meseguer, et al., 2015).

Son varios los métodos para la obtención de esferoides, como la técnica de gota colgante, biorreactor del vaso de la pared, utilización de platos de baja adhesión o levitación magnética.

2.2.3.1.-Gota colgante

Para la utilización de este método, se utiliza la cara inferior de una placa de Petri o utilizando placas de 96 pocillos de fondo horadado. En cada gota creada, las células se desplazan hacia el fondo de esta, donde forman un agregado, para originar finalmente una masa de forma esferoide. Dependiendo del número de células que se encuentran en el organoide, se pueden crear en forma de cultivo simple (esferoide monocelular) o cocultivos (esferoide multicelular). Una vez creadas las gotas, que se encuentran en el soporte, conteniendo cada gota un organoide, el soporte es llevado a un incubador (Foty, 2011). Las suspensiones celulares pueden ser dispensadas mediante pipeta, multipipeta o con dispensador mecánico (Meseguer, et al., 2015). Esta técnica ha sido utilizada, por ejemplo, en el mantenimiento y formación de cultivos 3D de hepatocitos de ovejas y búfalos, con la finalidad de realizar un estudio y observación más cercanas a como se encontrarían estas células *in vivo*, (Shri, et al., 2017). También ha sido utilizado esta técnica junto con polidimetilsiloxano (PDMS) (PDMS-HDA) para la formación de organoides para el estudio de células cancerígenas, las cuales cambiaron sus sensibilidades hacia los agentes quimioterapéuticos y la radiación del fármaco en comparación con los cultivos 2D, y un método de estudio válido para la detección de fármacos, la diseminación tumoral, el cocultivo celular y la invasión tumoral (Kuo, et al., 2017) (Fig. 6).

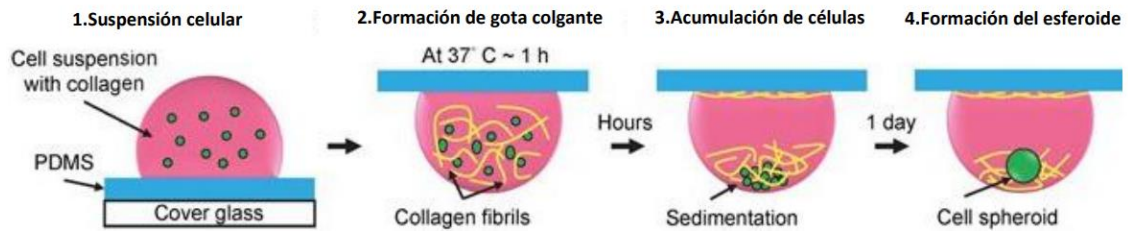


Figura 5: Esquema de (Kuo, et al., 2017) sobre la utilización de la técnica de cultivo 3D, gota colgante.

2.2.3.2.-Biorreactor del vaso de la pared (RWV)

El RWV es un biorreactor, giratorio, llenado de un medio de cultivo que suministra los alimentos esenciales a las células. La sedimentación natural de las células debido a la gravedad es equilibrada por la rotación del biorreactor, dando por resultado la caída lenta de las células dentro de los compartimientos. Es un sistema de cultivo en suspensión que permite el crecimiento de células bajo condiciones de cizallamiento de fluido fisiológico bajo. Los biorreactores vienen en dos formatos diferentes, un recipiente giratorio de alto aspecto (HARV) o un recipiente lateral de giro lento (STLV), en el que difieren según su fuente de aireación. El microambiente proporcionado por el biorreactor permite que las células formen agregados tridimensionales. Estas características incluyen uniones estrechas, orientación apical/basal, localización de proteínas *in vivo* y propiedades específicas adicionales del tipo de células epiteliales. Una vez que se establece la diferenciación celular y la formación de agregados, las células se recogen del biorreactor, y se pueden aplicar ensayos similares realizados en células 2D a los agregados 3D con algunas consideraciones (Radtke & Herbst-Kralovetz, 2012). Entre sus distintas aplicaciones, se han utilizado para el análisis de células epiteliales, estudio de Islotes pancreáticos humanos aislados, desarrollo y comportamiento de fármacos, y estudios de células troncales MSC (Navran, 2006) (Fig. 7).



Figura 6: Imagen de un biorreactor utilizado para formar organoides. Imagen traída por (Navran, 2006).

2.2.3.3.-Platos de baja adhesión

Estos se tratan de platos especiales que permiten una formación espontánea de organoides de tamaño y forma uniformes gracias a que se encuentran pre-cubiertas con un polímero ultrahidrófilo. Estos tienen la ventaja de poder obtener una alta claridad óptica, lo que las hace muy adecuadas para imágenes de campo brillante y microscopía confocal. Sus aplicaciones incluyen la formación de esferoides, tumores esféricos, cuerpos embrionarios y neuroesferas utilizando este tipo de placas para tipos de células que incluyen ES e iPS (humanos y ratones), NIH3T3, preadipocitos, HepG2 y otras líneas de células cancerosas, así como células neuronales primarias (AMS, 2014).

2.2.3.4.-Levitación magnética

El cultivo de células 3D mediante el método de levitación magnética (MLM) es la aplicación de tejido 3D en crecimiento induciendo células tratadas con ensambles de nanopartículas magnéticas bajo campos magnéticos espacialmente variables utilizando excitadores magnéticos de neodimio y promoviendo las interacciones célula-célula forzando a las células a mantenerse en una interfaz aire/líquida en una placa de Petri estándar (Mims, 2011). Una de las metodologías más habituales para formar estos esferoides se basa en la captación celular y la posterior levitación magnética mediante la utilización de nanopartículas magnéticas (como la magnetita o cobalto) (Bumpers, et al., 2015) (Fig. 8). Otras metodologías incluyen la utilización de un hidrogel bioinorgánico

compuesto por bacteriófago más magnetita (MIO, Fe₃O₄) y nanopartículas de oro que se autoensamblan en hidrogeles (Souza, et al., 2010).

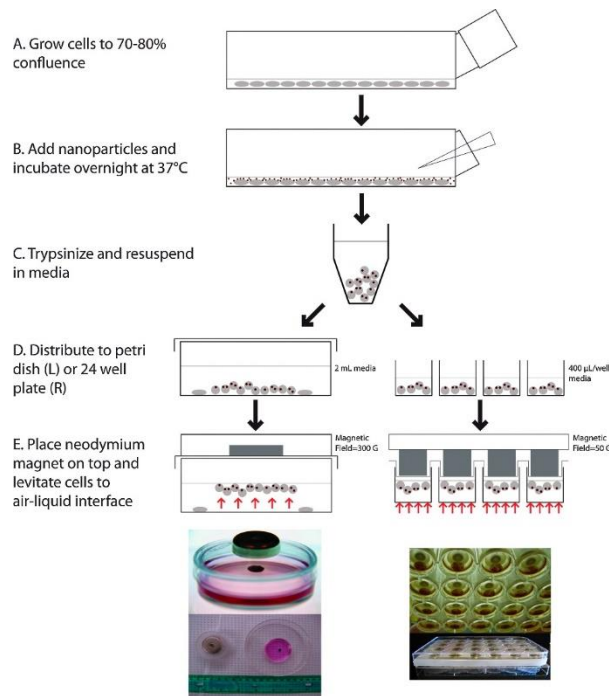


Figura 7: Esquema sobre el protocolo de utilización de la técnica de levitación magnética. Esquema por (Tseng, et al., 2013).

Anteriormente se había mencionado que uno de los objetivos de los cultivos 3D es la formación MEC fisiológicamente relevante. El MLM es uno de los métodos más eficaces para la formación de MEC, al estar las células en la interfaz aire-líquido e interactuar entre ellas, dando lugar a síntesis de proteínas como colágeno, fibronectina y laminina (Tseng, et al., 2013). Además, los componentes particulares de este método no son tóxicos, no afectan la proliferación y no inducen una respuesta inflamatoria por parte de las células cultivadas (Souza, et al., 2010).

En cuanto a su aplicación, el MLM generalmente utiliza el conjunto de nanopartículas magnéticas, lo que hace que el MLM sea ampliamente aplicable a la mayoría de los fenotipos celulares. De hecho, el MLM se ha utilizado con éxito para hacer cultivos en 3D con líneas celulares tipo MSC, iPS, ESC, células primarias, etc (Haisler, et al., 2013). Es por ello por lo que se han realizado varios estudios utilizando esta técnica, como la formación de cultivos 3D de bronquiolos (Tseng, et al., 2013), para el estudio de tumores y estudio del cáncer (Bumpers, et al., 2015) o estudios sobre regeneración ósea (Hammer, et al., 2009).

El uso de organoides, como modelo de cultivo 3D, supone importantes ventajas: 1) Las células del esferoide no se encuentran adheridas a un soporte, sino que forman un agregado celular de forma esferoidal en el interior de un líquido pipeteable durante todo el tiempo que dura el cultivo. 2) Las células del esferoide no requieren un andamiaje externo o interno para agregarse. 3) Las células del esferoide se pueden unir unas a otras, mimetizando un ambiente fisiológico similar al del tejido de procedencia. 4) Las células del esferoide pueden originar su propia matriz extracelular. 5) Las células del esferoide ven preservado su fenotipo celular específico característico de un tejido diferenciado (Meseguer, et al., 2015). Por lo que el uso de organoides suponen una importante ventaja frente al uso de los cultivos 2D, permitiendo un uso más ampliado y otros enfoques que previamente no eran posibles.

Capítulo 3:

Diseño

experimental.

3.1.-Planteamiento del problema

Uno de los principales problemas actuales son los defectos óseos provocados por tumores, traumas o anomalías esqueléticas, por lo que la reconstrucción esquelética viene siendo necesaria para la resolución de dichos problemas. En la actualidad existen distintos tipos de estrategias como los injertos óseos o la utilización de distintos tipos de biomateriales como los osteoconductores y osteoinductores. Sin embargo, dichas estrategias poseen numerosas limitantes que los hacen ineficaces frente a dichos problemas, es por ello por lo que en la búsqueda de dicho material perfecto se buscan distintas estrategias que dejen atrás los cultivos en 2D. La inclusión del campo de la nanotecnología en el ámbito de la ingeniería de tejidos ha permitido comenzar con la búsqueda de distintas estrategias con el fin de desarrollar cultivos multilíneas en 3D que poseen varias ventajas frente a los anteriores. Sin embargo, el concepto básico que implica el uso de las Nanopartículas Magnéticas (NPM) en la ingeniería de tejidos aún está en la búsqueda de mejorar los modelos de cultivos celulares 3D que puedan llevar a su aplicación en un futuro en la regeneración clínica tisular.

3.2.-Pregunta de investigación:

¿El autoensamblaje de los cultivos celulares a través del empleo de NPM (Fe_3O_4)-células (osteoblastos) *in situ* permitirá fabricar microtejidos 3D durante el proceso de cultivo bajo levitación magnética?

3.3- Justificación:

Actualmente, las fracturas a nivel óseo representan una gran cantidad de lesiones que le pueden ocurrir al ser humano, sin embargo, el punto de visión de la medicina actual **se está centrando en el cultivo celular de dos dimensiones**, es por ello por lo que las lesiones a nivel crítico ya sean provocadas por tumores, traumas o defectos esqueléticos suponen un serio problema actual. Teniendo en cuenta que las fracturas han aumentado en los últimos años, como en el caso español registrándose 25.440 fracturas o en el caso de México donde se espera que las fracturas aumenten hasta alcanzar los 156 mil casos en 2050. Se hace necesario el explorar alternativas que puedan llevar a resolver en el futuro a mediano plazo dichos procesos de afección ósea por lo que la investigación en

el campo de la ingeniería de tejidos en los últimos años ha seguido una tendencia hacia el desarrollo de modelos de cultivos 3D que mimeticen el microambiente de los tejidos a regenerar y entender la complejidad de los microambientes y nichos celulares. Por ello, en este trabajo proponemos la implementación de los cultivos celulares bajo levitación magnéticas como una nueva estrategia para la fabricación de microtejidos 3D a través del empleo de NPM de Fe_3O_4 *in situ* que permitirá estudiar su comportamiento de viabilidad y diferenciación durante el proceso de autoensamblaje de osteoblastos bajo la presencia de un campo magnético.

3.4.-hipótesis

El autoensamblaje por el método de levitación magnética de células osteoblásticas en cultivo induce la formación de un microtejido 3D.

3.5.-Objetivo General:

Implementar cultivos bajo levitación magnética que faciliten y guíen la respuesta celular (proliferación y diferenciación) durante el autoensamblaje de organoides (NPM-célula) hacia microtejidos 3D.

3.6.-Objetivos Específicos:

1. Establecer el efecto de las NPM de Fe_3O_4 en los cultivos bajo levitación magnética en la proliferación de los osteoblastos.
2. Determinar el papel del autoensamblaje NPM (Fe_3O_4)-células (osteoblastos) en la formación de un microtejido 3D durante las condiciones de cultivos bajo levitación magnética.
3. **Evaluar la diferenciación celular del autoensamblaje NPM (Fe_3O_4)-células (osteoblastos) durante la formación de un microtejido 3D en cultivo desarrollado por levitación magnética.**
4. **Analizar** las propiedades fisicoquímicas y estructurales del microtejido 3D depositado **en cultivo desarrollado por** levitación magnética por SEM.

Capítulo 4: Material y Métodos.

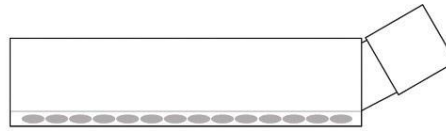
4.1.-Cultivo de osteoblastos

Se cultivaron y expandieron osteoblastos humanos (OB) en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. Además, los OB fueron cultivados en medio osteogénico como inductor de la diferenciación (50 µM de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato y 10⁻⁷ M de dexametasona).

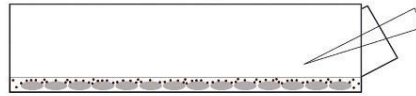
4.2.-Modelo de cultivo celular en Levitación Magnética

Las NPM de Fe₃O₄ se encuentran en una solución acuosa con 0.1% en peso de poly-L-Lysine como estabilizador (NanoShuttle™-PL). Para obtener los cultivos en levitación magnética, se sembraron las células (OB) en cajas de 75 cm² hasta obtener una confluencia de 85-90% y se les adicionaron 100 µL de la solución con las NPM (Fe₃O₄). Estas nanopartículas (∅ ~ 50 nm) magnetizan a las células mediante una unión electrostática a la membrana celular, que se obtuvieron durante 24 h de incubación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se lavaron con solución de amortiguador de fosfato salino (PBS) con un pH 7.4. Se tripsinizaron y se sembraron con placas de 96 pozos a una densidad de 3 X 10³ células/pozo. El procedimiento de levitación magnética consistió con que las células pueden acercarse y comenzar a formar agregados, donde las interacciones célula-célula (NPM-célula + NPM-célula) podrían cambiar la morfología celular en condiciones de cultivo largos (Fig. 9).

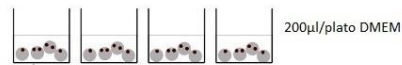
1.- Se dejaron creciendo los OB hasta una confluencia de 80-90%



2.- Se añadieron las NPM (magnetita), y se dejó incubando toda la noche.



3.- Se tripsinizaron las células y se resuspendieron en el medio.



4.- Se colocó la base con los imanes de neodimio para formar los organoides.

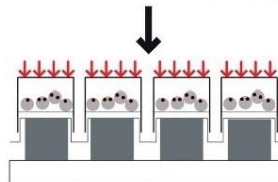


Figura 8: Esquema que resume el protocolo para realizar el cultivo MLM. Esquema modificado de (Tseng, et al., 2013).

4.3.-Proliferación celular

Para determinar el efecto de las NPM en la proliferación celular se utilizó el kit CCK-8. Los autoensamblajes de NPM-OB se incubaron durante 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días a una densidad celular de 5×10^4 células/ μl . Los autoensamblajes en cada tiempo a evaluar se lavaron con PBS y se incubaron con 10 μL de la solución CCK-8. Los agregados fueron incubados durante 2 h a 37°C y de la solución obtenida se tomaron 100 μL , se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para medir absorbancia en un espectrofotómetro usando una longitud de onda de 450nm (ChroMate, AWARENESS). Los experimentos se realizaron por triplicado, repitiéndose dos veces. El grupo control incluyó las células sembradas en placas de cultivo sin inducción magnética y con NPM sin células.

4.4.- Tinción de cristal violeta

Los organoides **se fijaron** fijados con 4% paraformaldehído (PFA) e incubados durante 24 h; posteriormente se retiró el PFA y se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua desionizada. Se adicionó una solución de cristal violeta al 0.1 % por 15 minutos, se retiró el cristal violeta, se lavó con abundante agua desionizada. Finalmente se observaron los esferoides bajo microscopía óptica.

4.5.-Diferenciación celular

La determinación de la diferenciación celular se realizó mediante modelos específicos de los agregados; en la cual el objetivo era investigar el potencial de diferenciación de los autoensamblajes de NPM-OB durante las condiciones de cultivos sometidos a levitación magnética. Se consideró que el desarrollo del microtejido 3D será el resultado de una compleja interacción celular; donde las señales inductivas autocrinas determinarían la morfogénesis y el patrón de los componentes del tejido mineral depositado durante 5 y 14 días de cultivo celular. Para ello se ha realizado la caracterización del microtejido 3D depositado bajo condiciones de levitación magnética por los siguientes métodos.

4.5.1.-Inmunofluorescencia en microtejidos 3D completo

Los autoensamblajes de NPM-OB en los tiempos especificados se fijaron con 4% de PFA, se permeabilizaron mediante 3 lavados con PBS Tween 20% durante 5 minutos cada lavado. Posteriormente se le aplicó una solución de bloqueo (10 μ L PBS Tween y 0.2 g de Suero de Albumina Bovina (BSA)). Los agregados se deshidrataron mediante una incubación seriada de menor a mayor porcentaje de alcoholes de 25%, 50%, 70%, 96% y 100%, donde se dejaron permeabilizándose durante 2 minutos a excepción del alcohol 100% en donde se ha lavado 2 veces por 5 minutos. Después de ello se lavaron con PBS Tween 20% 2 veces por 2 minutos, se incubaron los agregados en metanol frío durante 15 minutos y se lavan nuevamente por 3 veces con PBS Tween 20%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario para (OPN FL-314 sc-20788, BSP H-157 sc-292393 y OCN FL-100 sc-30084), la adición de los anticuerpos se realizó por triplicado con distintas diluciones (1:50, 1:100 y 1:150) con el objetivo de observar en cuál de ellas se observa un mejor resultado positivo del marcaje. Se lavaron los agregados 3 veces durante 5 minutos con PBS Tween 20%. Se colocó el anticuerpo secundario conjugado

con FITC y se analizó la señal utilizando microscopía de epifluorescencia base LED (modelo T670Q-PL-FLLED-B, AMSCOPE) para observar la señal positiva a las proteínas no colágenas involucradas en la formación de un microtejido mineralizado.

4.5.2.-Caracterización ultraestructural del microtejido 3D:

La morfología ultraestructural del microtejido 3D mineralizado se evaluó mediante SEM (FE-SEM 7600F, JEOL) utilizando una aceleración de 5 kV. Previamente, los esferoides fueron fijados con 2% glutaraldehído, lavados dos veces con PBS y se les realizó una deshidratación paulatina en soluciones de etanol/agua 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% y 70% por 25 min. en cada solución. Posteriormente se colocó en la porta muestra y se llevó al SPC, marca Hitachi modelo HCP-2, donde se sometieron a un secado de punto crítico con CO₂ con la finalidad de deshidratar la muestra sin modificar su estructura.

4.6.-Ensayo de viabilidad por Cell Tracker:

Para realizar los ensayos de viabilidad de los esferoides se utilizó el kit de CellTracker™ Green CMFDA Dye, para utilizarlo, se dejó a temperatura ambiente y se diluyó el reactivo con 1mL de medio sin suero y sin presencia de rojo fenol, añadiéndose 100µl de la disolución, dejándose incubar durante una hora. A posteriori se les cambió el medio otra vez, se añadieron 2µl del reactivo y se dejó incubando una noche. Finalmente fueron observados utilizando microscopía de epifluorescencia base LED (modelo T670Q-PL-FLLED-B, AMSCOPE).

4.7.-Análisis estadístico:

Con el objetivo de comparar las relaciones existentes entre los crecimientos celulares de los grupos a evaluar se realizaron diferentes pruebas estadísticas para demostrar alguna relación existente o no existente. Primeramente, se realizó una prueba de normalidad tanto de Kolmogórov-Smirnov y Shapiro-Wilk, para el caso de ambas comparativas entre los platos (utilizar o no un plato con imanes) y entre los medios la prueba dio como resultado una distribución no normal, como consecuencia se llevó a cabo una prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Todas las pruebas se realizaron con el programa IBM SPSS Statics 24 con un p-valor < 0.05.

4.8.-Tipo y universo del estudio, variables utilizadas y criterios:

Tipo de estudio	Estudio Experimental <i>In Vitro</i>
Universo de estudio	Organoides formados a partir de Osteoblastos humanos
Variables utilizadas	Absorbancia: Variable dependiente, cuantitativa de escala continua
	Medios Utilizados (Medio “normal” y Medio osteogénico): Variable independiente, cualitativa nominal
	Placas utilizadas (Placas con imán o Placas sin imán): Variable independiente, cualitativa nominal.
	Días: Variable independiente, cualitativa ordinal
Criterios	Inclusión: Todos los organoides.
	Exclusión: Organoides fragmentados.

Definiciones de variables:

- **Absorbancia:** Se trata de la medida que refleja cómo se atenúa la radiación cuando atraviesa un elemento. Se trata de la medida utilizada para reflejar el crecimiento de los organoides.
- **Medio “Normal”:** DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio.
- **Medio Osteogénico:** inductor de la diferenciación formado con 50 µM de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato y 10⁻⁷ M de dexametasona.
- **Placas con imán:** Cultivos 3D, donde se colocaron las células con las MNP para que reaccionaran con el campo magnético y dieran lugar a la formación de organoides.
- **Placas sin imán:** Cultivos 2D, los osteoblastos se añadieron directamente a una placa de 96 pozos estándar para dar lugar a su crecimiento.

Capítulo 5: Resultados.

5.1: Cultivos de organoides utilizando la técnica de levitación magnética

Con el objetivo de inducir formación de organoides por levitación magnética, los cultivos de OB se colocaron en cajas de 96 pozos. Se realizó un seguimiento de la morfología a los días 3, 7, 14 y 21 de los grupos experimentales y controles (Figura 10). Como se observa en la figura 12, la presencia del campo magnético permite la formación de esferoides bien delimitados que comienza con la agregación celular y que continua con una interacción célula-célula que compacta el esferoide y le da una buena organización estructural.

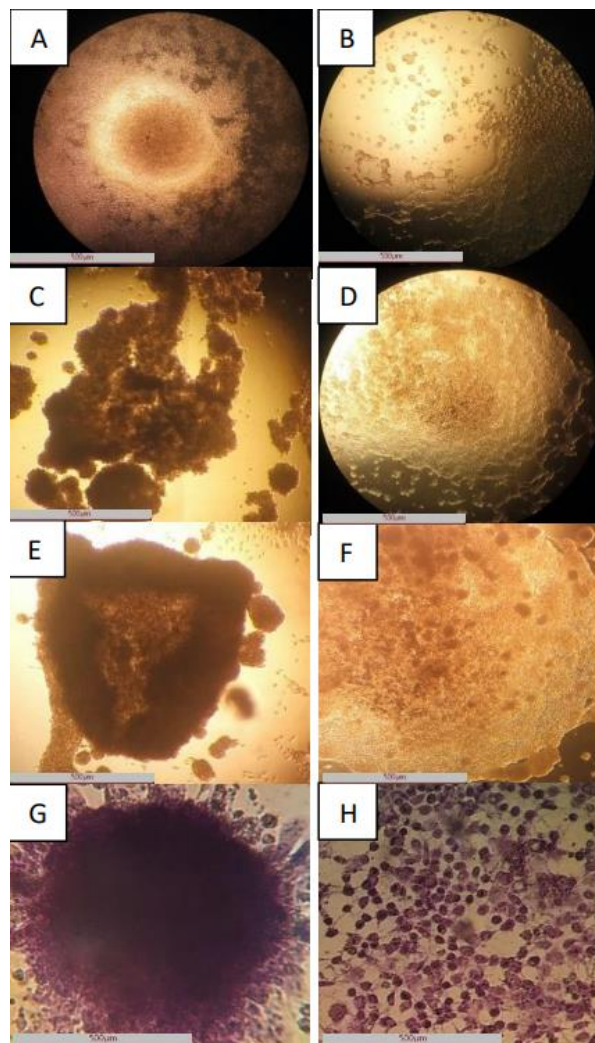


Figura 9: Morfología de los organoides durante su expansión en levitación magnética. (A-B) son los cultivos a 3 días, A con inducción magnética, B sin inducción magnética, (C-D) son los cultivos a 7 días, C con inducción magnética y D sin inducción magnética, (E-F) son los cultivos a 14 días, E con inducción magnética y F sin inducción magnética y finalmente, (G-H) son los cultivos a 21 días, G con inducción magnética y H sin inducción magnética.

5.2.-Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante el reactivo CCK-8, en diferentes días 1, 3, 5, 7 y 14. Los resultados se muestran en las figuras 11 y 12. Donde se puede apreciar una proliferación celular desde el día 1 con un pico pronunciado al día 5 en presencia del campo magnético. Sin embargo, los cultivos sin presencia de imán mantienen un crecimiento constante durante el periodo de cultivo celular. Comportamiento similar al comparar el medio normal con el medio osteogénico.

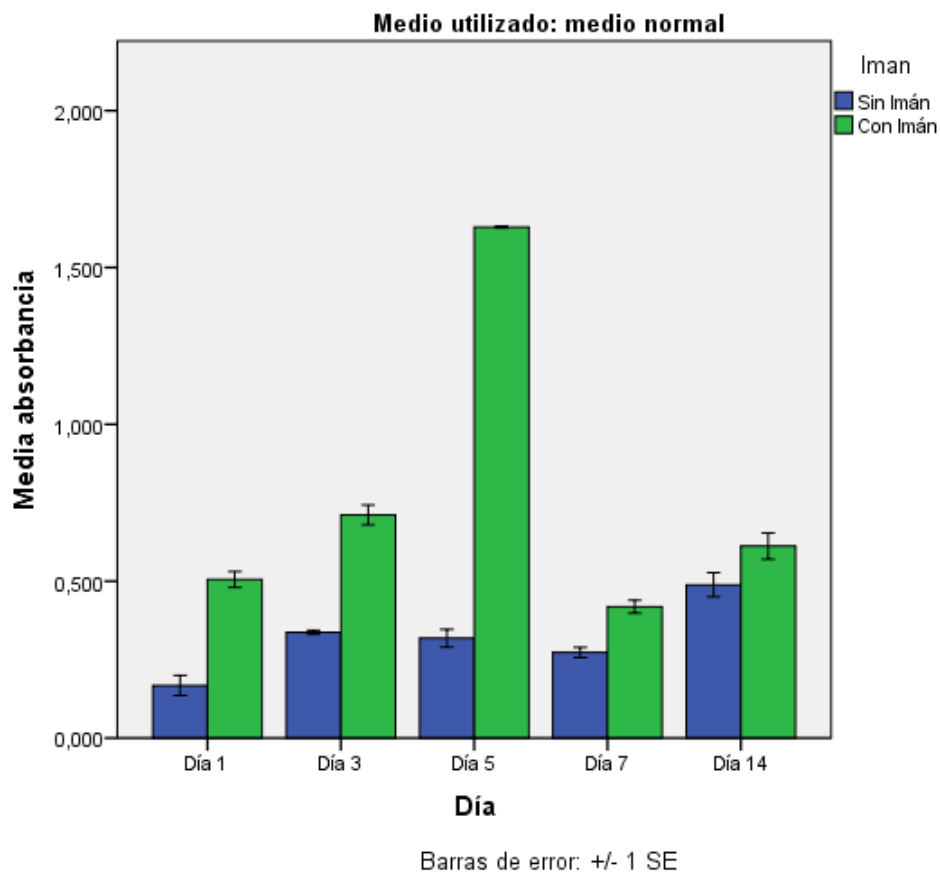


Figura 10: Gráfica que muestra la curva de proliferación de las células cultivadas en medio normal comparando aquellas crecidas en los imanes y aquellas crecidas en monocapa. La curva de proliferación fue realizada mediante el reactivo CCK-8.

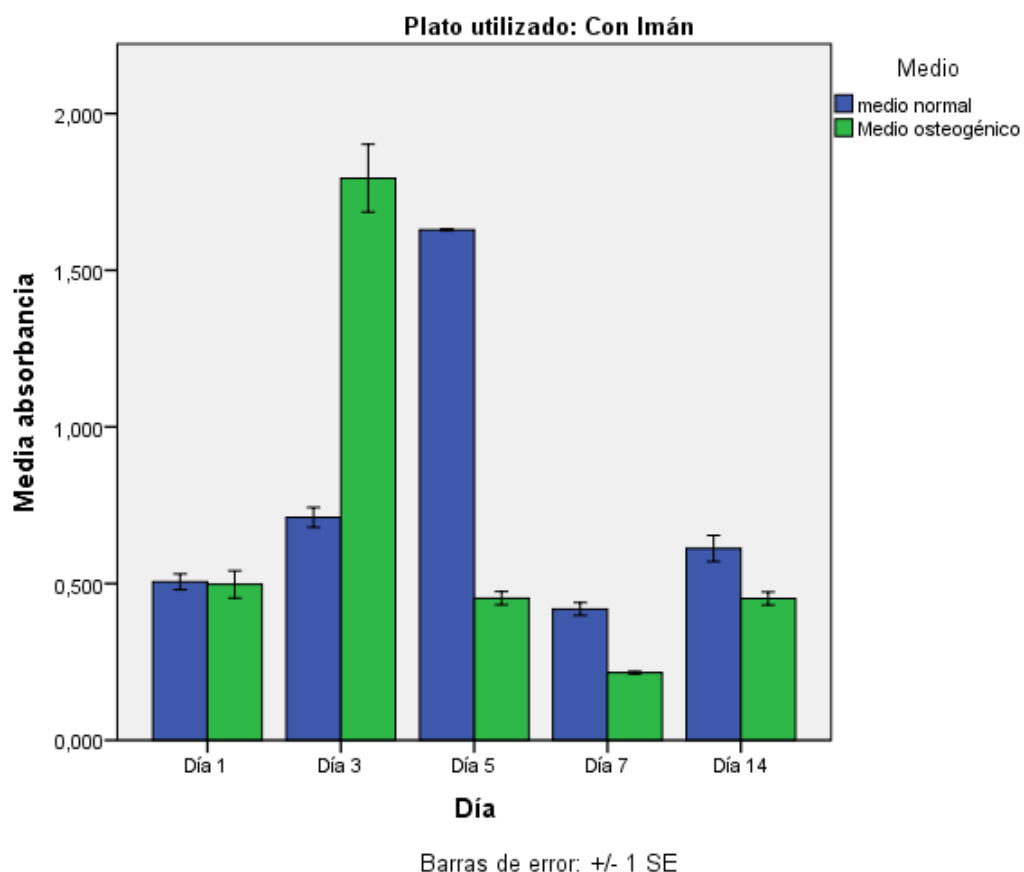


Figura 11: Gráfica que muestra las diferencias en cuanto crecimiento de osteoblastos crecidos en medio normal y el control positivo medio osteogénico, cultivados ambos en los imanes. La curva de proliferación ha sido realizada mediante el reactivo CCK-8.

Para comprobar las relaciones entre los distintos grupos se realizaron pruebas estadísticas para comparar la relación entre el crecimiento de OB en cultivo con imanes y otro sin imán, se llevó a cabo una prueba de normalidad tanto de Kolmogórov-Smirnov, dado que la prueba resultó ser negativa para una distribución normal, se llevó a cabo una comparativa de 2 grupos (“imán” y “no imán”) mediante la prueba estadística de U de Mann-Whitney, con un contraste de hipótesis:

- Ho: No existen diferencias significativas entre dejar crecer los OB en los platos con imán o en platos sin imán.
- Ha: Existen diferencias significativas entre dejar crecer los OB en los platos con imán o sin imán.

El resultado del contraste de Hipótesis queda reflejado en la tabla 1.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de absorbancia es la misma entre las categorías de Iman.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,000 ¹	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Tabla 1: Resultado de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, donde se muestra ya el resultado de dicha prueba, dado que con un p-valor < $\alpha = 0,05$, se rechazó la hipótesis nula y como consecuencia existe una diferencia significativa entre crecer los OB en un imán que dejarlos creciendo en monocapa.

Por otro lado, se realizó una comparativa entre el crecimiento de OB en medio normal o medio osteogénico, para ello, nuevamente se realizó una prueba de normalidad. Como la prueba resultó demostrar que no existe una distribución normal entre los datos, se realizó nuevamente una prueba no paramétrica para comparar 2 grupos mediante la U de Mann-Whitney con este contraste de hipótesis:

- Ho: No existen diferencias significativas entre dejar crecer los OB en medio normal y medio osteogénico.
- Ha: Existen diferencias significativas entre dejar crecer los OB en medio normal o medio osteogénico.

El resultado de la prueba se encuentra en la tabla 2.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de absorbancia es la misma entre las categorías de Medio.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	137,000 ¹	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Tabla 2: Resultado de la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, donde el p-valor > $\alpha = 0,05$, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula, por lo que no existen diferencias significativas entre crecer los OB en medio normal o medio osteogénico.

5.3.- Observación morfológica de los organoides por cristal violeta

Con el fin de observar más a detalle la morfología de los organoides formados, se le aplicó la tinción de cristal violeta a uno de los organoides crecidos en medio normal a los 14 días. El organoide formado se muestra en la figura 13. Se puede apreciar que el esferoide tiene una buena distribución celular, donde a los 14 días aun la integridad de las membranas celulares indica una interacción célula-célula que aumenta conforme al tiempo de cultivo. La tinción de cristal violeta se utiliza principalmente para evaluar la adhesión celular, con lo cual podemos inferir que los cultivos bajo levitación magnética inducen una adhesión celular constante entre los osteoblastos.

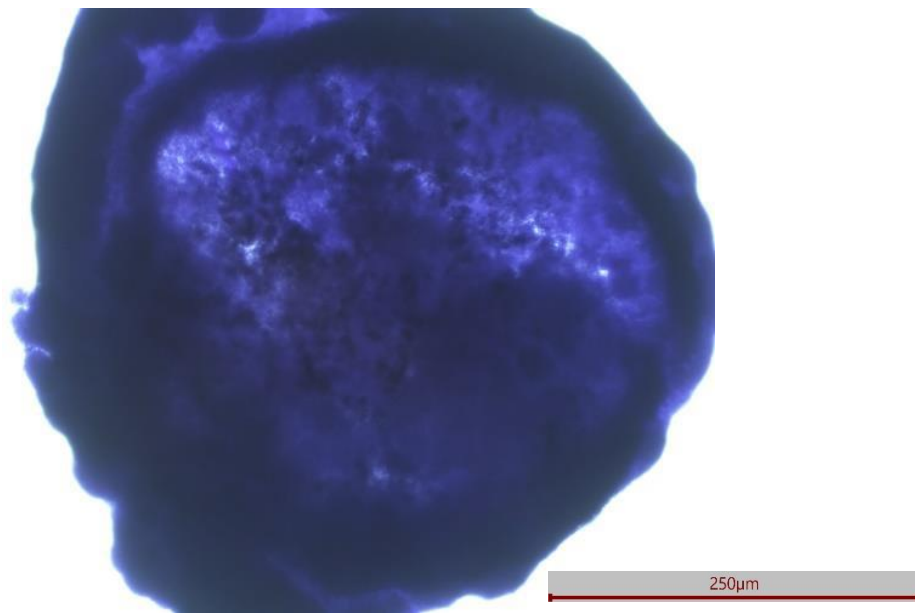


Figura 12: Imagen de un organoide crecido en medio normal durante 14 días, teñido con cristal violeta con el fin de observar su tamaño y forma, se observa un organoide bien delimitado, donde las interacciones célula-célula permite la compactación del mismo otorgando una buena organización estructural.

5.4.- Inmunofluorescencia en microtejido 3D completo

Con la finalidad de analizar el nivel de expresión de las proteínas no colágenas involucradas en el proceso de formar un microtejido mineral como OCN, OPN y BSP; se realizaron inmunofluorescencias utilizando anticuerpos específicos contra dichas proteínas.

Como se puede observar en la figura 14 se muestran esferoides representativos de la señal positiva. Para la señal de OCN (Fig. 14A), se puede observar que existen zonas de mayor expresión y zonas oscuras donde no existen ninguna expresión de la proteína

(color negro). Para OPN (Fig. 14B) se observa que existe una mayor expresión de la proteína en todo el esferoide con ciertas zonas donde no se detecta (color negro) lo cual indica que estas proteínas tienen un patrón diferencial de expresión. Por último, la BSP es una proteína encargada de estar en los estadios de mayor formación de depósito de tejido mineral, como se observa en el esferoide existe una señal positiva en la mayoría de las células mostrando el microtejido en una fase de alta de expresión de esta proteína (Fig. 14C).

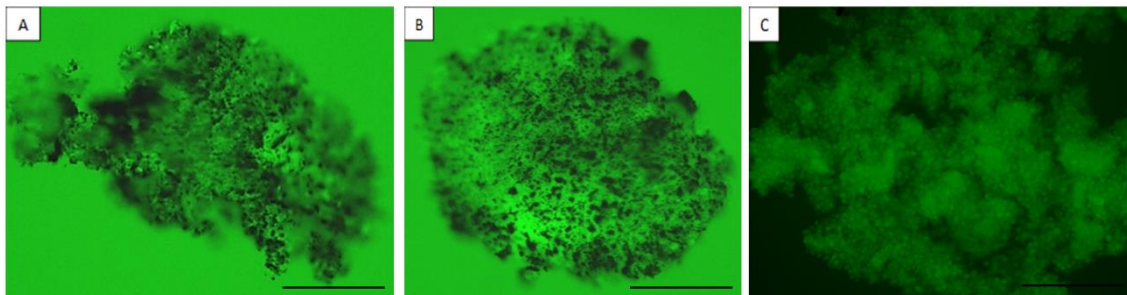


Figura 13: Imagen de las inmunofluorescencias de los microtejidos 3D de los esferoides analizando la expresión de OCN (A), donde se observan zonas de mayor expresión y zonas donde no se encontró señal positiva, OPN (B), se observa un patrón diferencial de expresión y BSP (C), donde se observan regiones de mayor depósito de tejido mineral. Todos los organoides se encontraron bajo cultivo osteogénico por 14 días.

5.5.-Caracterización ultraestructural del microtejido 3D depositado:

Con la finalidad de observar la morfología a una resolución mayor se procedió a realizar imágenes de los esferoides mediante SEM donde se puede observar la ultraestructura del microtejido 3D depositado con mayor detalle, así como la interacción celular y las células que forman el organoide y el tamaño completo del microtejido esferoidal 3D (fig. 15A). En un acercamiento se pueden observar a mayor detalle el contacto entre célula-célula (fig. 15B y C), además se observa la presencia de MEC por parte de los osteoblastos (fig. 15C y D).

Por otro lado, también se analizaron los microtejidos esferoidales 3D que se encuentran en un medio de cultivo osteogénico durante 14 días. En dichas imágenes podemos observar la comparación de tamaño entre ambos organoides, siendo este más pequeño, además de observar una mayor cantidad de MEC que tiende hacia un tejido mineralizante (figura 16).

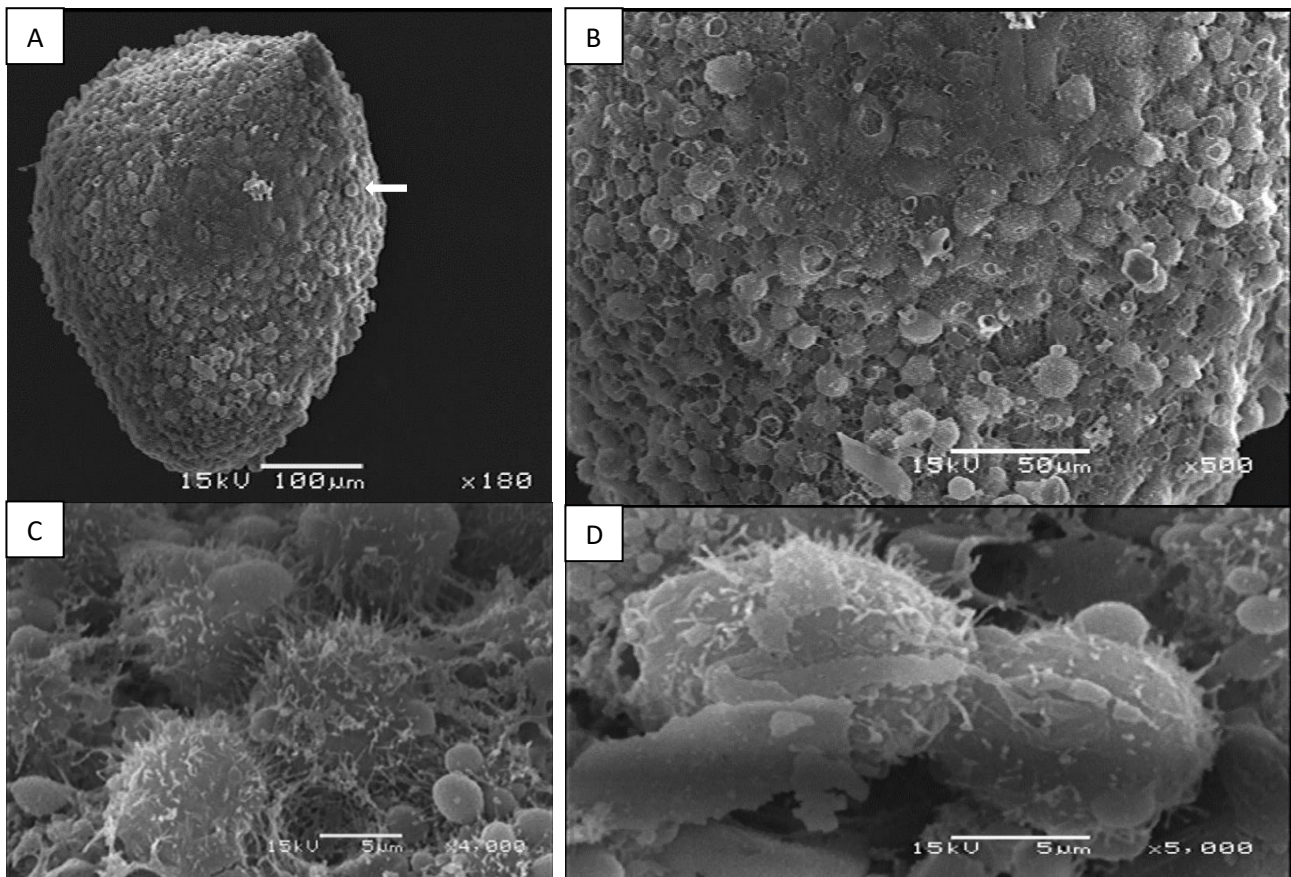


Figura 14: Observación de imágenes SEM de organoides cultivados en medio normal hasta 14 días. En el caso de **A** se puede observar el tamaño del organoide completo donde se pueden distinguir las distintas células que lo forman (**flecha**). En **B** se puede observar más a detalle dichas células formadoras del organoide. En **C**, se distingue parte de la matriz mineralizada secretada por los organoides. En **D** se observa una unión entre dos OB, alcanzándose a observar parte de la matriz que secretan ambas células.

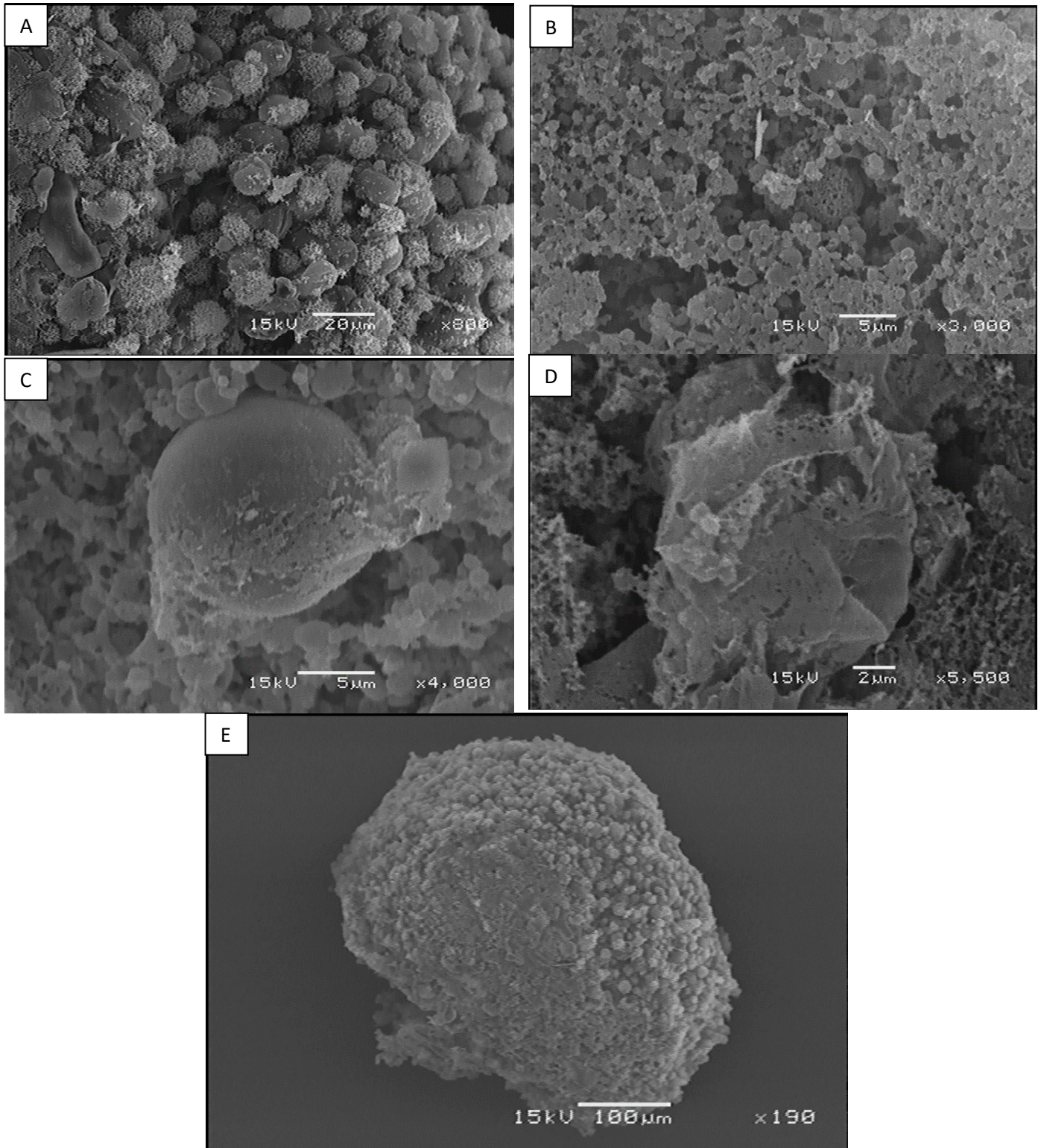


Figura 15: Observaciones SEM de un organoide crecido en medio osteogénico hasta 14 días. En A-B se pueden observar a detalle las células que forman el organoide. En el caso de C-D, se observa la mayor cantidad de matriz mineralizante secretada por el organoide. En E, finalmente, se observa el tamaño del organoide, donde comparándolo con el anterior, posee menor tamaño.

5.6.- Ensayo de viabilidad por Cell Tracker.

Para evaluar la viabilidad del esferoide 3D, se utilizó el reactivo Cell Tracker en el que se observa el centro del organoide como su periferia. En donde se logra observar la viabilidad celular en ambas localizaciones del organoide, además, también se puede observar el tamaño del organoide (fig. 17). Y en los acercamientos se puede visualizar que las células se encuentran viables debido a que el cromóforo se encuentra dentro de las células y nos permite visualizar con detalle la interacción entre ellas.

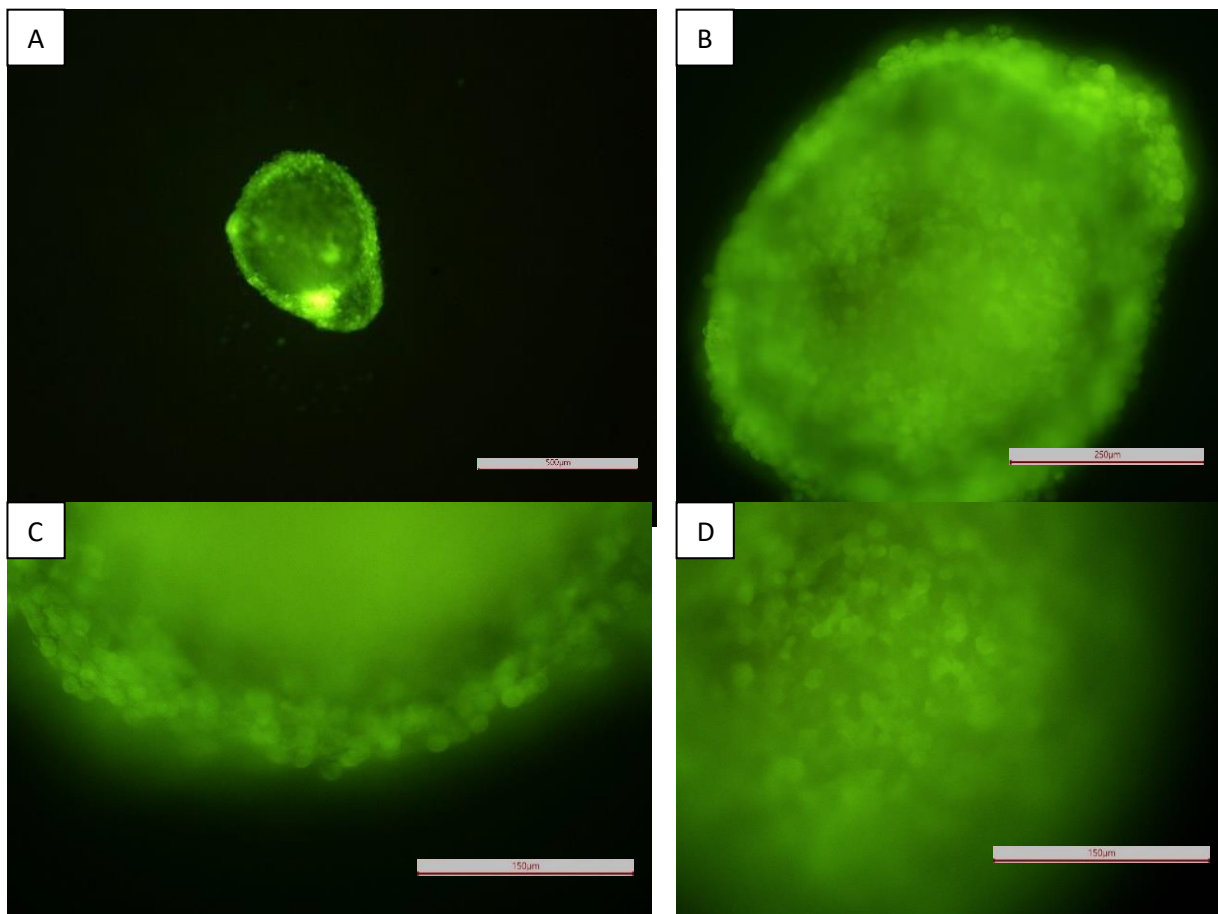


Figura 16: Ensayo de viabilidad por Cell Tracker de un organoide cultivado en medio normal hasta 14 días. En A se observa el tamaño del organoide. En B una observación de la señal de toda la periferia del organoide demostrando que las células se encuentran vivas. En C se observa más a detalle la periferia del organoide, mientras que en D se observa el centro del organoide también con señal positiva, demostrando que se encuentran vivas las células.

En los esferoides que se mantuvieron en medio osteogénico se puede apreciar que el tamaño cambia considerablemente, sustentando los resultados obtenidos por SEM, considerando que la compactación puede deberse a la presencia de tejido osteoide.

Asimismo, se parecía que el esferoide esta viable y donde se aprecia de igual manera las uniones célula-célula (fig. 18).

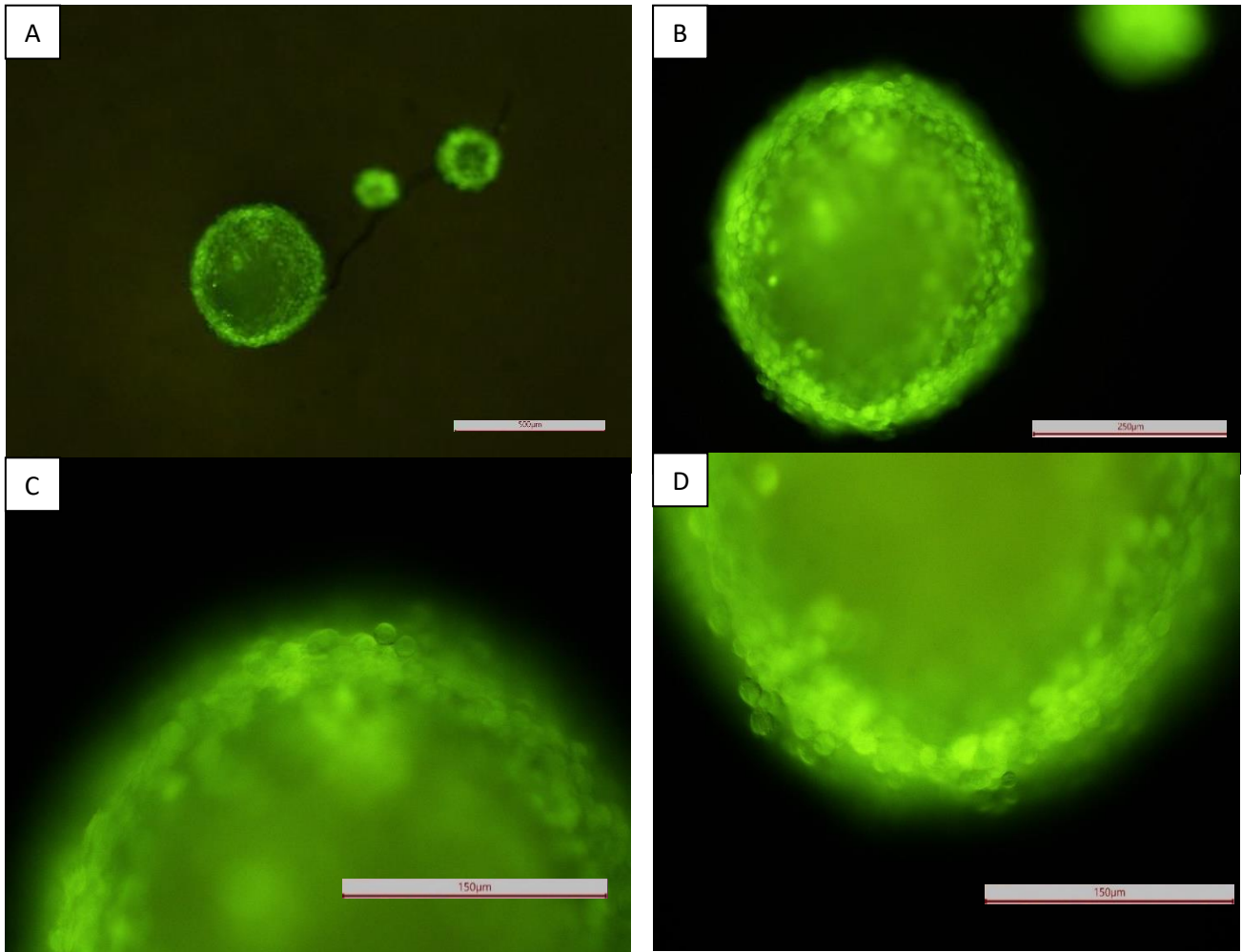


Figura 17: Imágenes del organoide cultivado en medio osteogénico hasta 14 días teñido con Cell Tracker, para el ensayo de viabilidad. En A se puede apreciar el tamaño del organoide cultivado en medio osteogénico, donde si lo comparamos con el anterior, es de menor tamaño. En B se puede observar con mayor detalle, que en todas las localizaciones del organoide se encuentra vivo, mientras que en C observamos con mayor detalle la periferia del organoide. Por otro lado, en D, se observa el centro del organoide estando también vivo, como en el caso del organoide cultivado en medio normal.

Capítulo 6:

Discusión.

Para entender procesos que involucran la regeneración de diversos tejidos se han utilizado organoides en el contexto tridimensional. Se han registrado tamaño de organoides con una media de 350 μm y de 550 μm utilizando células troncales mesenquimales de médula ósea (Lewis, et al., 2016). Estos organoides presentaron mayor tamaño que el reportado en nuestro trabajo. Sin embargo, es importante resaltar que se utilizaron 3.000 células para la formación del organoide, y en el trabajo citado se utilizaron 10.000 células por lo que era de esperar que su tamaño fuera mayor. Nosotros exploramos el número mínimo que permitía la obtención de un esferoide con lo cual también es un nuevo dato que proponemos a las técnicas de cultivo 3D donde a partir de 3000 células se pueden lograr la formación de organoides con una viabilidad óptima que puede llevarse hasta más de 14 días de cultivo celular.

Solo existe un reporte en la literatura en el cual utilizan 1.600.000 células para la formación de los organoides, aunque no se reporta el tamaño final de los organoides formados (Hägewald, et al., 2004).

Se pueden realizar comparaciones entre los distintos grupos de medio normal y medio osteogénico en cuanto a su tamaño. En el caso de los organoides cultivados en medio normal los organoides son de mayor tamaño en comparación con el organoide cultivado en medio osteogénico que presentan menor tamaño. Estos resultados se podrían explicar parcialmente debido a que los organoides están cultivados en medio osteogénico y poseen todo lo necesario para inducir el depósito de MEC osteoide, por lo que la proliferación se detiene y se induce la diferenciación celular, seguida de la formación y secreción de matriz mineralizada (Clines, 2011). En el caso de los organoides cultivados en medio normal, los organoides tienden a proliferar durante más tiempo, por lo que el organoide se hace más grande, llegando a formar matriz mineralizada, en los últimos días del cultivo.

En cuanto a los ensayos de proliferación celular, se registró un aumento entre los días 3 y 5, registrándose el mayor pico de crecimiento, posterior a una disminución para el día 7 y 14. Los estudios de comparación de crecimiento entre los organoides cultivados en monocapa o con el método de levitación magnética, mostraron que los co-cultivos (NPM-OB) presentan un pico más alto en el día 5, similar al publicado por (Ren, et al., 2018). En este trabajo utilizaron células del intestino y formaron organoides,

encontrando el pico más elevado al día 6. La comparación entre los grupos, pueden verse reflejados en trabajos realizados por (Lewis, et al., 2016), quienes utilizaron la técnica de levitación magnética, este grupo comparó entre el cultivo en monocapa y 3D, y encontraron que el organoide formado por el método de levitación magnética mostró un pico en el día 1. Esta diferencia puede ser explicada con el número inicial de células en cultivo, en nuestro estudio utilizamos 3.000 células al inicio por lo que era de esperar que el organoide empezara de menor tamaño y fuera creciendo conforme al tiempo. Además se puede comprobar cuál es el tamaño máximo que pueden alcanzar los organoides, es decir, en el caso de (Lewis, et al., 2016) al alcanzar su máximo desde el día 1 es de suponer que el tamaño máximo de los organoides poseen una media de 10.000 células, donde se ha comprobado en este mismo trabajo con la misma cantidad de células, llegando a la conclusión que el organoide llega desestabilizarse y empieza a separarse las células. Una de las causas probables de este hallazgo se encuentra descrita por (Lancaster, et al., 2013) donde lo que podría ocurrir es que el flujo de oxígeno al interior del organoide ya no sea el ideal, por lo que las células del interior del organoide empiezan a morir y empiezan a separarse las células, por lo que en la curva de proliferación empieza a bajar. Otro dato comparable a nuestros resultados es el tamaño del organoide de (Jeong, et al., 2016), en donde encontraron que el tamaño máximo registrado fue en el día 5, al igual que en nuestro caso. Otro de los motivos por el que nuestro organoides no se desestabilizaron y no fue degradado, fue debido a que las NPM estaban tratadas con ácido ascórbico (vitamina C), el cual es un antioxidante soluble en agua que cumple una función predominantemente protectora, encargado de promover la formación de colágeno, y como finalidad evita que las células que forman parte del organoide no se separen (Gallie, 2013). Cabe destacar que la adición de ácido ascórbico no influye en los crecimientos de los organoides y no poseen ningún tipo de influencia en la proliferación (Cai, et al., 2018).

En la curva de proliferación comparativa entre los grupos “imán” y “sin imán”, queda en evidencia las diferencias en cuanto a crecimiento de las células, comparable a la curva comparativa de (Lewis, et al., 2016), donde las diferencias comienzan a ser significativas a partir del día 1. En nuestro caso, debido a que la distribución de los datos no es normal, se ha utilizado una prueba no paramétrica de comparación de dos grupos (U de Mann-

Whitney) para evaluar la diferencia entre ambos grupos. Como resultado, existen diferencias significativas en cuanto a utilizar placas con imán o cultivar las células en monocapa, resultando ser más eficiente el crecimiento en las placas con imán. El motivo principal de observar mayor crecimiento de los organoides formados en levitación magnética es el hecho de que se encuentran cultivados en 3D, lo que implica una expansión de las células en las tres dimensiones, sin embargo en el caso de la monocapa tiene una limitante muy importante y es el hecho de que su crecimiento depende del tamaño del fondo de la placa, por lo que las células proliferan hasta el límite de la propia placa, y al alcanzar dicho límite dejan de proliferar y con la falta de espacio llegan a bajar su viabilidad (Bumpers, et al., 2015).

La comparación entre la curva de proliferación de organoides cultivados en medio normal (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio) y medio osteogénico, mostró un mayor crecimiento en el organoide cultivado en medio “normal”, mientras que en el organoide en medio osteogénico se observó un pico al día 3, sin embargo, en los otros días de cultivo se observó mayor crecimiento en el organoide del medio de cultivo “normal”. No existen estudios en la literatura sobre organoides formados de OB, por lo que no es posible realizar una comparación con otros estudios, sin embargo, nuestros resultados pueden ser explicados por la comparación de tamaños entre ambos grupos. Los organoides cultivados en medio osteogénico proliferan para aumentar de tamaño en el día 3, y en el día 5, bajan su proliferación debido a que poseen todos los inductores necesarios para formar matriz mineralizada y comienzan a depositarla, por el contrario, en el caso de los organoides cultivados en medio normal, han de proliferar primero, hasta alcanzar un máximo en el día 5, posteriormente bajan su proliferación por el comienzo de una diferenciación tardía y con la consiguiente formación del tejido mineralizado. La comparación estadística de U de Mann-Whitney mostró que las diferencias no son significativas, sin embargo, no podemos concluir que es un resultado negativo, se trata de un resultado esperado, dado que no es necesario de la utilización de inductores de formación de matriz mineralizada

para la formación de esta matriz, en otras palabras, no es necesario la utilización de medio osteogénico para la formación de dicha matriz.

Se ha realizado un análisis sobre la localización de las proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización como la BSP, OPN y OCN (Clines, 2011).

No existen estudios en la literatura acerca de análisis de la expresión génica de organoides formados mediante OB, sin embargo, en cuanto a otras técnicas 3D, como la utilización de andamios, (Jing, et al., 2017) analizaron las proteínas OCN y BSP por medio qRT-PCR y de inmunofluorescencia al igual que en nuestro trabajo. En el caso de la OCN (Jing, et al., 2017) utilizaron una dilución del anticuerpo primario de 1:200, mientras que en nuestro caso utilizamos una dilución 1:100. En los resultados analizados con microscopio de fluorescencia se puede observar una expresión positiva de la proteína de OCN. Para el caso de la BSP, (Jing, et al., 2017) utilizaron una dilución del anticuerpo primario 1:500 y en nuestro caso igualmente fue de 1:100, obteniendo una señal igualmente positiva. En el caso de (Li, et al., 2017) evaluaron por RT-PCR la expresión génica cuyos productos proteínicos son RUNX2, ALP, OPN y OCN, donde encontraron una expresión positiva para la proteína OPN, al igual que nuestro caso, donde se puede observar que a una dilución del anticuerpo primario 1:100 se encontraron señales positivas para dicha proteína.

En el caso de los organoides cultivados en medio osteogénico, dado que poseen todos los inductores necesarios para la creación de matriz mineralizada, se trata de un comportamiento normal el hecho de que se hayan mostrado señales positivas para dichas proteínas típicas de la regeneración ósea (Clines, 2011), es por ello que fue tratado como control de tipo positivo. En el caso de los organoides cultivados en medio normal, se trata de un caso más interesante, dado que, al no poseer los inductores necesarios, mediante interacciones entre las células del organoide han llegado a formarse las proteínas típicas de la regeneración ósea, llegando a formar matriz mineralizada, observada con mayor detalle en las imágenes SEM. Dichas imágenes muestran la morfología general de los organoides mostrando con mayor detalle las interacciones celulares existentes dentro del organoide.

En las imágenes SEM se pueden observar dichas interacciones con mayor detalle, sin embargo, el fenómeno más importante observable en las imágenes es la formación de

matriz osteoide. Si empezamos a comparar entre los organoides cultivados en medio osteogénico y en medio normal, las diferencias entre ambos organoides es la cantidad de MEC. Cabe resaltar que los osteoblastos nunca han sido observados en un organoide a través de SEM, es por ello por lo que la comparación de tejidos mineralizados mostrados en otras técnicas 3D como los andamios difieren a nuestras morfologías. Es decir, en el caso de (Gómez-Lizárraga, et al., 2017) al estar los OB adheridos a los andamios se pueden observar las distintas prolongaciones típicas de los OB, en cambio, en nuestro caso los OB no se encuentran adheridos a ningún otro material, por lo que su morfología es más parecida a la que se encuentran *in vivo*, permitiendo su crecimiento en 3D y finalmente unas prolongaciones típicas hacia otros OB. Otras comparaciones realizadas es la de los determinados cristales aparecidos con mayor cantidad en los organoides cultivados en medio osteogénico, dichos cristales pueden ser comparados a los depósitos de calcio a partir de la actividad de la ALP mostrados por (Hejazi & Mirzadeh, 2016), sin embargo, también son observados en otras técnicas 3D como el caso de la utilización de andamios, por lo que es la primera vez que matriz mineralizada formada a partir de OB humanos es mostrada en imágenes SEM a partir de organoides cultivados en un medio que no posee los inductores como en el caso de medio osteogénico.

Finalmente para la evaluación de viabilidad por medio de CellTracker™ green se comparó la viabilidad de los organoides cultivados en medio “normal” y en medio osteogénico, encontrando mayor tamaño de organoides en medio “normal” comparado con los cultivados en medio osteogénico. Mediante este ensayo se ha demostrado que todas las partes de los organoides cultivados hasta el día 14 se encuentran viables, tanto en la periferia del organoide, como en núcleo del propio, por lo tanto, una de las problemáticas a tener en cuenta, como lo es la falta del flujo de nutrientes al interior del organoide, queda descartada a diferencia que en el caso de (Lancaster, et al., 2013). Como comparativa en la bibliografía solo se ha reportado un único caso de utilización de CellTracker™ green en organoides formados por células cardíacas procedentes de un corazón de rata neonata (Iyer, et al., 2009). En dicho caso se realizaron los análisis al día 7 del cultivo de los organoides mostrándose una viabilidad de hasta el 80%, debido que

en dicho caso el objetivo del análisis era mostrar tanto los cardiomiocitos vivos como los muertos realizando un ensayo live/dead.

Por primera vez se han realizado organoides a partir de OB humanos, que además, demostraron poseer la capacidad de formación de microtejido mineralizado sin la necesidad de los inductores para la formación de dicha matriz, como lo posee la utilización del medio osteogénico. Los organoides formados permanecieron estables, en ningún punto comenzaron a separarse las células y crecieron en tres dimensiones. Los organoides en su totalidad se encontraron vivos tanto en la periferia como en el núcleo del organoide, demostrando que el flujo de nutrientes y de gases es el ideal para el crecimiento de los organoides y la proliferación de los OB humanos.

Por tal motivo, esta técnica utilizada en este trabajo de investigación permite la formación de organoides de OB humanos, sin embargo, la técnica puede ser utilizada para cualquier otro tipo celular, por lo que dicha técnica puede ser utilizada para la formación de organoides de otras líneas celulares, permitiendo más investigaciones, lo que significaría un acercamiento a la aplicación clínica de los organoides, no solo de OB o líneas celulares propias de tejido óseo, sino de otros tejidos, lo que conllevaría a uno de los grandes objetivos de la investigación que es el intento de salvar vidas, ya sean humanas o de otras especies.

Capítulo 7:

Conclusiones

- I. Se formaron organoides de células (osteoblastos humanos) a partir de la técnica de cultivo 3D bajo levitación magnética.
- II. La técnica de levitación magnética es una técnica novedosa y fiable para formar organoides 3D, que posee varias ventajas frente a otros métodos de formación de organoides. Dicha técnica permite, mediante un cambio en el tamaño del imán, cambiar el tamaño de los organoides y, por tanto, el tamaño de los organoides puede ser manipulable y controlable. Además la técnica permite la formación de organoides sin importar el origen celular o el tipo celular.
- III. El cultivo de organoides en medio osteogénico no influye en la proliferación, viabilidad o creación de matriz mineralizada, en comparación con los organoides cultivados en medio normal sin inductores. Este grupo experimental demostró poseer un mejor crecimiento en comparación del cultivado en monocapa, y un crecimiento sin diferencias significativas en comparación al cultivado en medio osteogénico, por lo que, los organoides cultivados en medio normal poseen la misma capacidad de formar matriz mineralizada.
- IV. Los datos indican que las células que forman parte del organoide se encuentran vivas, tanto en la periferia como en el núcleo del organoide, demostrando que los organoides pueden permanecer vivos hasta más de 14 días en cultivo.

Capítulo 8:

Bibliografía

- A. B., 2014. Biocompare. [En línea]
Available at: <https://www.biocompare.com/Life-Science-News/156967-Ultra-Low-Adhesion-Plates-For-Superior-3D-Spheroid-Cell-Culture/>
[Último acceso: 21 04 2018].
- Akbarzadeh, A., Samiei, M. & Davaran, S., 2012. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7(144).
- Anon., 1988. *National Science Foundation*. [En línea]
Available at: <https://www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/who.pdf>
[Último acceso: 13 Febrero 2019].
- Anon., 2017. *Sociedad Española de Geriatría y Gerontología*. [En línea]
Available at: <https://www.segg.es/institucional/2017/02/23/en-espa%C3%B1a-la-osteoporosis-afecta-a-3-millones-y-medio-de-personas>
[Último acceso: 26 Enero 2019].
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G., 2015. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*, 16(3), pp. 5517-5527.
- Asthana, A. & Kisaalita, W., 2012. Microtissue size and hypoxia in HTS with 3D cultures. *Drug Discov. Today*, Volumen 17, p. 810–817.
- Bailey, S., Karsenty, G., Gundberg, C. & Vashishth, D., 2017. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci*, 1409(1), pp. 79-84.
- Bissell, M., 1981. The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a “normal” cell in culture. *Int Rev Cytol*, Volumen 70, p. 27–100.
- Boyan, B. y otros, 2000. Porcine fetal enamel matrix derivative enhances bone formation induced by demineralized freeze dried bone allograft in vivo. *J. Periodontol*, 71(8), p. 1278–1286.
- Brawner, A., Xu, R., Liu, D. & Jiang, P., 2017. Generating CNS organoids from human induced pluripotent stem cells for modeling neurological disorders.. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 9(3), p. 101–111.
- Bumpers, H. L. y otros, 2015. Nanomagnetic Levitation 3-D Cultures of Breast and Colorectal Cancers. *J Surg Res.*, 194(2), p. 319–326.
- Bumpers, H. L. y otros, 2015. Nanomagnetic Levitation 3-D Cultures of Breast and Colorectal Cancers. *J Surg Res.*, 194(2), pp. 319-326.
- Burr, D. B., Bellido, T. & White, K. E., 2015. Bone structure and function. En: M. C. Hochberg, y otros edits. *Rheumatology (Sixth Edition)*. s.l.:Mosby, pp. 42-55.
- Cai, T. y otros, 2018. Effects of six common dietary nutrients on murine intestinal organoid growth. *PLoS One*, 13(2).
- Campos, D. M., Santos, E. j., Kuromoto, N. K. & Soares, G. A., 2007. Preliminary Results of Osteoblast Adhesion on Titanium Anodic Films. *Revista Matéria*, 12(1), pp. 150-155.
- Carletti, E., Motta, A. & Migliaresi, C., 2011. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods Mol. Biol.*, Volumen 695, p. 17–39.

- Carrera, A., 2013. *Academia.Edu*. [En línea]
Available at: https://www.academia.edu/4972682/ELASTICIDAD_Y_DUREZA_DE_LOS_HUESOS
[Último acceso: 18 Enero 2019].
- Chan, B. P. & Leong, K. W., 2008. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.*, 17(4), p. 467–479.
- Chebat, D., 2014. *Researchgate*. [En línea]
Available at:
https://www.researchgate.net/publication/263661376_Cell_Culture_Technology_Bioreactors
[Último acceso: 1 Marzo 2019].
- Cho, H. y otros, 2012. Neural stimulation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by extremely low frequency electromagnetic fields. *Biotechnol Progress*, Volumen 28, pp. 1329-1335.
- Choi, Y. y otros, 2014. Stimulation of Neural Differentiation in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields Incorporated with MNPs. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(4), p. 1233–1245.
- Cicuendez, M., Portoles, M., Izquierdo-Barba, I. & Vallet-Regi, M., 2012. New nanocomposite system with nanocrystalline apatite embedded into mesoporous bioactive glass. *C Hem Mater*, Issue 24, pp. 1100-1106.
- Clines, G. A., 2011. Prospects for Osteoprogenitor Stem Cells in Fracture Repair and Osteoporosis. *Curr Opin Organ Transplant*, 15(1), pp. 73-78.
- Cortés-Medina, L. V. y otros, 2019. Neuronal Transdifferentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells from Neonatal and Adult Sources by a Small Molecule Cocktail. *Stem Cells International*, pp. 1-13.
- Cruz, M., 2014. *Blogspot*. [En línea]
Available at: <http://biologiaustabuca.blogspot.com/2014/05/>
[Último acceso: 27 Febrero 2019].
- Daquinag, A. C., Souza, G. R. & Kolonin, M. G., 2013. Adipose Tissue Engineering in Three-Dimensional Levitation Tissue Culture System Based on Magnetic Nanoparticles. *Tissue Eng. Part C. Methods*, Volumen 19, p. 336–344.
- Dean, D., Watson, J., Moed, B. & Zhang, Z., 2009. Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture. *Front Biosci*, Volumen 14, p. 2878–2888.
- Deluzio, T. G., Seifu, D. G. S. & Mequanint, K., 2013. 3D scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine: beyond structural templates?. *Pharm. Bioprocess.*, 1(3), p. 267–281.
- Feng, X., 2009. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol*, 3(2), p. 189–196.
- Fennema, E. y otros, 2013. Spheroidculture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.*, 31(2), pp. 108-115.

- Fey, S. J. & Wrzesinski, K., 2013. Determination of Acute Lethal and Chronic Lethal Dose Thresholds of Valproic Acid Using 3D Spheroids Constructed from the Immortal Human Hepatocyte Cell Line HepG2/C3A. *Pure*, pp. 141-165.
- Fitzgerald, K. y otros, 2015. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J Control Release*, 10(215), pp. 39-54.
- Foty, R., 2011. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *JoVE*, Volumen 51, pp. 1-4.
- Freed, L. & Vunjak-Novakovic, G., 2002. Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues.. *Adv Space Biol Med*, Volumen 8, pp. 177-195.
- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A., 2009. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach.. *Nat. Protoc.*, Volumen 9, p. 961–78 .
- Frost, H. M., 1973. Bone remodeling and its relationship to metabolic bone disease. En: C. C. Thomas, ed. *Physical Therapy*. Springfield: s.n., p. 1146.
- Fuller, K. y otros, 1998. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*, Volumen 188, pp. 997-1001.
- Gallie, D. R., 2013. L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. *Scientifica*, Volumen 2013, pp. 1-24.
- Gallón, Nausa, J. & Castro, D. E. H., 2017. Caracterización morfológica y Evaluación clínica de sustitutos óseos de origen porcino de la casa 3Biomat para su aplicación en lesiones óseas bimaxilares. *Nova [online]*, 15(27), pp. 11-23.
- Gazdag, A., Lane, J. & Glaser, D. F. R., 1995. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthoped*, Volumen 3, pp. 1-8.
- Geckil, H. y otros, 2011. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)*, 5(3), p. 469–484.
- Gilbert, T. R. & Budinskaya, 2017. New Frontier in Biomaterials. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.*, 29(1), pp. 105-115.
- Gómez-Lizárraga, K. y otros, 2017. Polycaprolactone- and polycaprolactone/ceramic-based 3D-bioploted porous scaffolds for bone regeneration: A comparative study. *Materials Science and Engineering: C*, Volumen 79, pp. 326-335.
- Gravallese, E., 2003. Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest*, 112(2), p. 147–149.
- Gregory, A. & Clines, M., 2011. Prospects for Osteoprogenitor Stem Cells in Fracture Repair and Osteoporosis. *Curr Opin Organ Transplant*, 15(1), pp. 73-78.
- Grenier S, S. M. H. D. M. K., 2009. Interactions of coronary artery smooth muscle cells with 3D porous polyurethane scaffolds.. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 89(2), p. 293–303.
- Gutiérrez, J. G., 2008. El proceso de remodelación ósea. *medigraphic*, 4(3), pp. 170-176.
- Gu, X., 2015. Progress and perspectives of neural tissue engineering. *Frontiers of Medicine*, 9(4), pp. 401-411.

Gwathmey, J. K., Tsaion, K. & Hajjar, R. J., 2009. Cardionomics: a new integrative approach for screening cardiotoxicity of drug candidates. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, Volumen 5, p. 647–660.

Hägewald, S. y otros, 2004. Effects of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 98(2), pp. 243-249.

Haisler, W. L. y otros, 2013. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nature Protocols*, Volumen 8, p. 1940–1949.

Hall, B. K., 2015. *Bones and Cartilage*. Segunda ed. United States of America: Elsevier.

Hammer, B. E., Kidder, L. S., Williams, P. C. & Xu, W. W., 2009. Magnetic Levitation of MC3T3 Osteoblast Cells as a Ground-Based Simulation of Microgravity. *Microgravity Sci Technol.*, 21(4), p. 311–318.

Harrison, R. G., Greeman, M. J., Mall, F. P. M. & Jackson, C. M., 1907. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat Rec*, 1(5), pp. 116-128.

Hejazi, F. & Mirzadeh, H., 2016. Novel 3D scaffold with enhanced physical and cell response properties for bone tissue regeneration, fabricated by patterned electrospinning/electrospraying. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(143).

Hernández, F. S., Marichi, F. J. & Alvarez, M., 2011. Determinación de sialoproteína ósea en ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodóncicas. *Revista Odontológica Mexicana*, 15(1), pp. 21-26.

Hernandez-Gil, I. F.-T., ALOBERA GRACIA, M. A. & CANTO PINGARRON, M. d. y. B. J. L., 2006. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo.. *Med. oral patol. oral cir.bucal*, 11(1), pp. 47-51.

Holtfreter, J., 1944. A study of the mechanism of gastrulation.. *J. Exp. Zool.*, Volumen 95, pp. 171-212.

Ikeshima-Kataokaa, H., Matsuic, Y. & Uede, T., 2018. Osteopontin is indispensable for activation of astrocytes in injured mouse brain and primary culture. *NEUROLOGICAL RESEARCH*, 40(12), p. 1071–1079.

Iyer, R., Chui, J. & Radisic, M., 2009. Spatiotemporal tracking of cells in tissue-engineered cardiac organoids. *J Tissue Eng Regen Med*, 3(3), pp. 196-207.

Jeong, y otros, 2016. A scaffold-free surface culture of B16F10 murine melanoma cells based on magnetic levitation. *Cytotechnology*, Volumen 68, p. 2323–2334.

Jing, Z. y otros, 2017. Carbon Nanotube Reinforced Collagen/Hydroxyapatite Scaffolds Improve Bone Tissue Formation In Vitro and In Vivo. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(9), p. 2075–2087.

Jin-Young, K. y otros, 2015. 3D spherical microtissues and microfluidic technology formulti-tissue experiments and analysis. *Journal of Biotechnology*, Issue 205, pp. 24-35.

Johansson, H. y otros, 2011. Increasing age-and sex-specific rates of hip fracture in Mexico: a survey of the Mexican institute of social security. *Osteoporos Int*, 22(8), pp. 2359-2364.

- Kankilic, B. y otros, 2016. Mesenchymal Stem Cells and Nano-Bioceramics for Bone Regeneration. *Current Stem Cell Research & Therapy*, Issue 11, pp. 487-493.
- Kassem, M. & Abdallah, B., 2008. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res*, Issue 331, p. 157–163.
- Klokkevold, P. & Jovanovic, S., 2002. Advanced Implant Surgery and Bone Grafting Techniques. En: M. Newman, H. Takei & F. Carranza, edits. *Carranza's Clinical Periodontology*. Philadelphia: W.B. Saunders. , pp. 907-908.
- Koledova, Z., 2017. 3D Cell Culture. En: Z. Koledova, ed. *3D Cell Culture: An Introduction*. Nueva York: Methods in Molecular Biology.
- Kotela, I. y otros, 2009. Polymer nanocomposites for bone tissue substitutes. *Ceramics International*, 35(6), pp. 2475-2480.
- Kuo, C.-T. y otros, 2017. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. *Scientific Reports*, 7(4363), pp. 1-10.
- Lancaster, M. A. y otros, 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephal. *Nature*, 501(373), p. 373–379.
- Lee, J., Cuddihy, M. J. & Kotov, N. A., 2008. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *TISSUE ENGINEERING*, 14(1), pp. 61-88.
- Lee, S., Lee, K., Kim, S. & Jung, Y., 2017. Enhanced Cartilaginous Tissue Formation with a Cell Aggregate-Fibrin-Polymer Scaffold Complex. *Polymers*, 9(8), p. 348.
- Leslie p., G. & Hiatt, J. L., 2008. *Texto Atlas de Histología*. Ciudad de México: McGraw-Hill Interamericana.
- Lewis, E. E. L. y otros, 2016. A Quiescent, Regeneration-Responsive Tissue Engineered Mesenchymal Stem Cell Bone Marrow Niche Model via Magnetic Levitation. *ACS Nano*, 10(9), pp. 8346-8354.
- Li, J. y otros, 2017. Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds Coated with Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma for Bone Regeneration. *Materials*, 10(1), p. 831.
- Li, X. y otros, 2016. Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications. *J Biomed Mater Res Part A*, p. 1285– 1296.
- Lowe, J. S. & Anderson, P. G., 2015. Musculoskeletal System. En: J. S. Lowe & P. G. Anderson, edits. *Stevens & Lowe's Human Histology*. Mosby: Elsevier, pp. 239-262.
- Lu, X. y otros, 2016. Preparation, characterization and in vitro dissolution behavior of porous biphasic α/β -tricalcium phosphate bioceramics. *Materials Science and Engineering*, C(59), p. 1007–1015.
- Manabe, T. y otros, 2007. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys. *Bone*, 40(6), pp. 1475-1482.
- Mandalunis, P. M., 2006. Remodelación ósea. *Actualiz Osteología*, 2(1), pp. 16-18.

- Mardoukhi, S., Mohammad, A. A. & Ayat, H., 2015. *The application of cell survival biology systems*. s.l., La primera conferencia futurista sobre tecnologías modernas.
- McMahon, R., Wang, L., Skoracki, R. & Mathur, A., 2013. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration.. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 101(2), pp. 387-397.
- Meseguer, J. M. y otros, 2015. Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Revista Eubacteria*, Issue 34, pp. 15-20.
- Mims, C., 2011. *MIT Technology review*. [En línea]
Available at: <https://www.technologyreview.com/s/426363/bio-assembling-in-3-d-with-magnetic-levitation/>
[Último acceso: 22 04 2018].
- Misch, C. & Diets, F., 1993. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent*, 3(2), pp. 158-167.
- Morgan, E., Barnes, G. & Einhorn, T., 2008. Osteoporosis. En: R. Marcus, D. Feldman, D. Nelson & Rosen, edits. San Diego: Academic Press, pp. 3-240.
- Mueller-Klieser, W., 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications.. *Am J Physiol.*, Volumen 273, pp. 1109-1123..
- Navran, S., 2006. *Genetic Engineering & biotechnology news*. [En línea]
Available at: <https://www.genengnews.com/gen-articles/rotating-bioreactors-for-manufacturing/1899>
[Último acceso: 21 04 2018].
- Nicks, K., Fowler, T. & Gaddy, D., 2010. Reproductive hormones and bone. *Curr Osteoporos Rep*, 8(2), pp. 60-67.
- Nordin, F., 2004. *Biomecánica básica del sistema musculoesquelético*. Tercera ed. Zaragoza: M. Graw-Hill.
- O'Brien, F. J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materialstoday*, 14(3), pp. 88-95.
- Panseri, S. y otros, 2012. Innovative magnetic scaffolds for orthopedic tissue engineering. *J. Biomed. Mater 100A*, pp. 2278-2286.
- Park, J., Wetzel, I., Dréau, D. & Cho, H., 2018. 3D Miniaturization of Human Organs for Drug Discovery. *Advanced Healthcare Materials*, pp. 1-26.
- Paul, W. & Sharma, C. P., 2012. Bioceramic Scaffold – Bone Tissue Engineering. En: G. Khang, ed. *Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Singapore: Pan Stanford, pp. 85-104.
- Peinado, P. y otros, 2006. A new immobilization method and their applications.. *Enzyme Microb Tech*, Volumen 40, pp. 79-84.
- Penland, N. P., Choi, E., Perla, M. P. J. & Kim, D.-H., 2017. Facile fabrication of tissue-engineered constructs using nanopatterned cell sheets and magnetic levitation. *Nanotechnology*, Volumen 28, pp. 1-8.

- Phillips, M., Darr, J., Luklinska, Z. & Rehman, I., 2003. Synthesis and characterization of nano-biomaterials with potential osteological applications. *J Mater Sci Mater Med*, Issue 14, pp. 875-882.
- Radtke, A. & Herbst-Kralovetz, M., 2012. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. *J Vis Exp.*, 3(62).
- Ren, J. y otros, 2018. A novel morphometry system automatically assessing the growth and regeneration of intestinal organoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(4), pp. 1052-1058.
- Ricklefs, M., Korossis, S., Axel, H. & Schilling, T., 2017. Polymeric Scaffolds for Bioartificial Cardiovascular Prostheses. En: F. Baino, ed. *Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications*. s.l.:IntechOpen, pp. 267-293.
- Ruiz, G. y otros, 2017. Polymeric Scaffolds For Skin. *Macromolecular Symposia*, 374(1).
- Rus, G. & Melchor, J., 2014. *Mecánica Tisular Ultrasónica y Biorreactores*. Granada, Workshop AE & NDT.
- Saha, K., Pollock, J., Schaffer, D. & Healy, K., 2007. Designing synthetic materials to control stem cell phenotype.. *Curr Opin Chem Biol*, 11(4), p. 381–387.
- Sambale, F. y otros, 2015. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *Journal of Biotechnology*, Volumen 205, pp. 120-129.
- San Julián, M. & Valentí, A., 2006. Trasplante óseo. *Anales Sis San Navarra*, pp. 125-136.
- Schmidt, C. E. & Leach, J. B., 2003. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Volumen 5, pp. 293-347.
- Shafa, M. y otros, 2012. Derivation of iPSCs in stirred suspension bioreactors. *Nature Methods*, Volumen 9, p. 465–466.
- Shri, M. y otros, 2017. Hanging Drop, A Best Three Dimensional (3D) Culture Method for Primary Buffalo and Sheep Hepatocytes. *Sci Rep.*, 7(1203), pp. 1-14.
- Soker, S. & Skardal, A., 2017. *Tumor Organoids*. Cham, Switzerland: Humana Press.
- Sóto, S. G. & Taxis, M. G. G., 2005. Injertos óseos. Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. *Rev Cubana Estomatol*, 42(1).
- Souza, G. R. y otros, 2010. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat. Nanotechnol.*, Volumen 5, pp. 291-296.
- Statista, 2016. *Statista*. [En línea]
Available at: <https://es.statista.com/estadisticas/539897/numero-de-accidentes-de-trabajo-con-fracturas-de-huesos-en-espana/>
[Último acceso: 26 Enero 2019].
- Stevenson, S., 1999. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am*, Volumen 30, pp. 543-552.
- Teitelbaum, S. L., 2000. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science*, 289(5484), p. 1504–1508.

- Tibbitt, M. W. & Anseth, K. S., 2009. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnol Bioeng.*, 103(4), p. 655–663.
- Tseng, H. y otros, 2013. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation.. *Acta Biomater*, 10(1), pp. 173-182.
- Tseng, H. y otros, 2013. Assembly of a Three-Dimensional Multitype Bronchiole Coculture Model Using Magnetic Levitation. *TISSUE ENGINEERING: Part C*, 19(9), p. 665–675.
- Tseng, H. y otros, 2015. A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. *Scientific Reports*, 5(13987).
- Väänänen, H., Zhao, H., Mulari, M. & Halleen, J., 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*, 113(3), p. 377–381.
- van Rijt, S. & Habibovic, P., 2017. Enhancing regenerative approaches with nanoparticles. *J R Soc*, 14(129).
- Wang, D., Liu, W., Han, B. & Xu, R., 2005. The bioreactor: a powerful tool for large-scale culture of animal cells.. *Curr Pharm Biotechnol.*, 6(5), pp. 397-403.
- Wang, Y., Tan, H. & Hui, X., 2018. Biomaterial Scaffolds in Regenerative Therapy of the Central Nervous System. *Hindawi*, Volumen 2018, pp. 1-19.
- Wang, Y., Tan, H. & Hui, X., 2018. Biomaterial Scaffolds in Regenerative Therapy of the Central Nervous System. *Biomed Res Int*, pp. 1-19.
- Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. & McCauley, L. K., 2011. Cancer to bone: A fatal attraction. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), pp. 411-425.
- Welsch & Ulrich, 2010. *Histología*. Segunda ed. España: Panamericana.
- Whang, P. & Wang, J., 2003. Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine J*, Volumen 3, pp. 155-165.
- Wiesman, H. & Meyer, U., 2004. biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering Part II. *Int J Oral Maxillofac*, Issue 33, pp. 523-530.
- Winter, C. C. y otros, 2016. Transplantable living scaffolds comprised of micro-tissue engineered aligned astrocyte networks to facilitate central nervous system regeneration. *Acta Biomater*, pp. 44-58.
- Wiseman, B. & Werb, Z., 2002. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, 296(5570), p. 1046–1049.
- Zárate, B. K. & Reyes, A. S., 2006. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Ciruj*, Volumen 74, pp. 217-222.
- Zhang, Q. y otros, 2018. 3D bio-printed scaffold-free nerve constructs with human gingiva-derived mesenchymal stem cells promote rat facial nerve regeneration. *Scientific Reports*, 8(6634).

