



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO (T.A.P.)

FORMACIÓN DE CRISTALES DE FOSFATO DE
CALCIO EN OSTEOESFERAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

MELISSA CÓRDOVA GARNICA

TUTOR: Dra. SILVIA MALDONADO FRÍAS

ASESOR: Dr. RODRIGO CORREA PRADO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Quiero expresar mi más sincero gracias a todas las personas que me han acompañado y apoyado a lo largo de mi vida académica y realización de tesis.

En primer lugar, agradezco a la Doctora Silvia Maldonado Frías por todo su invaluable guía, apoyo y paciencia. Sus sabias enseñanzas y constante motivación han sido fundamentales para la culminación de este trabajo. Le agradezco por todo su esfuerzo, amabilidad y dedicación estos 2 años que hemos estado juntas. Muchas gracias.

Gracias al Doctor Rodrigo Correa Prado por su tiempo y conocimientos al asesorar este trabajo.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, campus UNAM Juriquilla por abrir sus puertas para poder realizar la técnica de caracterización que se aborda en este trabajo, así como a los técnicos e investigadores Dr. Manuel Aguilar, Mtro. Guillermo Vázquez y al Dr. Eric Mauricio Rivera Muñoz por la asesoría y apoyo en los laboratorios de microscopía, cómputo y difracción de rayos X.

A mis amigos y compañeros de la carrera, por su apoyo incondicional y por siempre estar ahí cuando más lo necesite. Gracias por brindarme su amor y motivación a lo largo de este camino.

Quiero agradecer también al Doctor Marco Antonio Álvarez, por su colaboración y por brindarme acceso a la infraestructura necesaria para llevar a cabo este trabajo.

A todos aquellos que, de alguna forma, contribuyeron al éxito de este proyecto, les doy mi más profundo agradecimiento.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia: Carlos Fernando, mi papá. Norma, mi mamá y mi querido hermano, Carlos Xavier. Su apoyo incondicional, amor y dedicación ha sido mi constante motivación. A todos ustedes les debo cada logro alcanzado. Su presencia y amor me han ayudado a mantenerme firme ante la adversidad y tener en mente que siempre habrá alguien que te de su amor incondicional y comprensión incluso en los momentos más difíciles.

Gracias por ser mi refugio, por estar a mi lado cuando más lo necesitaba y por siempre ofrecerme su amor y confianza.



ÍNDICE

1. RESUMEN.....	9
2. ABSTRACT	10
3. INTRODUCCIÓN.....	11
4. ANTECEDENTES.....	12
4.1 Tejido Óseo.....	12
4.1.1 Estructura.....	15
4.1.2 Metabolismo Óseo.....	17
4.1.3 Composición Inorgánica.....	20
4.1.4 Cristales de Hidroxiapatita.....	22
4.1.5 Nucleación.....	23
4.2 Bioingeniería de tejidos.....	25
4.2.1 Cultivo bidimensional vs Cultivo tridimensional.....	25
4.2.2 Esferoides en regeneración ósea.....	27
5. OSTEOESFERAS.....	29
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
7. JUSTIFICACIÓN.....	33
8. HIPÓTESIS.....	33
9. OBJETIVOS.....	33
9.1 Objetivo general.....	33
9.2 Objetivos específicos.....	33
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
10.1 Línea celular.....	34
10.2 Materiales, reactivos y equipo.....	34
10.3 Métodos.....	34
11. RESULTADOS.....	36
11.1 Estandarización de osteoeferoides.....	36
11.2 Ensayos.....	37
12. DISCUSIÓN.....	40
13. CONCLUSIÓN.....	42
14. BIBLIOGRAFÍA.....	44
15. ANEXOS	



ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo de los niveles de estructura del tejido óseo.
- Figura 2.** Morfología de las células óseas y su localización.
- Figura 3.** Esquema representativo de la estructura ósea y componentes de la osteona
- Figura 4.** Orientación estructural de las trabéculas óseas en compresión y tracción. Además de su morfología isotrópica y ortotrópica.
- Figura 5.** Disposición de la HAP conforme las fibras de colágeno.
- Figura 6.** Esquema representativo de los cultivos monocapa y los distintos sistemas de cultivo 3D (sin andamios y basados en andamios).
- Figura 7.** Esquema representativo de vista microscópica de osteoblasto en frasco de cultivo celular y osteoesfera.
- Figura 8.** Microambiente tridimensional. Se muestran tres zonas: zona de proliferación, zona de quiescencia y centro necrótico.
- Figura 9.** Formación de esferoides a diferentes concentraciones celulares durante 3, 7, 14 y 21 días.
- Figura 10.** Ensayos de viabilidad a los 21 días.
- Figura 11.** Ensayos de mineralización llevados a cabo por tinción con alizarina roja a los 21 días. MM: medio mineralizante.
- Figura 12.** Imágenes obtenidas por Microscopía de Barrido de los osteoesfereoides.



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biomoléculas involucradas en el metabolismo óseo y su función.

Tabla 2. Composición química de la HAP.

Tabla 3. Fosfatos de calcio.

Tabla 4. Características de los distintos métodos de cultivo 3D.

Tabla 5. Resultados respecto al estudio de distintas fuentes celulares en la formación de osteoesferas.

Tabla 6. Tabla x. Análisis por EDS.



ABREVIATURAS

Ca. Calcio

P. Potasio

O. Oxígeno

CaP. Fosfato de calcio

Ca²⁺. Calcio ionizado

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂(CO₃). Hidroxiapatita carbonatada

CO₃. Carbonato

ALP. Fosfatasa Alcalina

PTH. Hormona Paratiroidea

GH. Hormona del crecimiento

IGF. Factor de crecimiento similar a la insulina

PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

HAP. Hidroxiapatita

BSP. Sialoproteína ósea

OPN. Osteopontina

ON. Osteonectina

OC. Osteocalcina

2D. Bidimensional

3D. Tridimensional

DMEM. Dulbecco's modified Eagle's Medium

PBS. Solución salina tamponada con fosfato

EGF. Factor de crecimiento epidermal

bGFG. Factor de crecimiento fibroblástico básico

ATCC. American Type Culture Collection

UMB. Unidad multicelular básica



GLOSARIO

Osteoblastos. Células óseas responsables de la síntesis de matriz orgánica y mantenimiento óseo.

Osteoclastos. Células óseas las cuales su función es la remodelación ósea por medio de la lisis del hueso.

Osteocitos. Células óseas las cuales su función es la regulación de la deposición mineral local.

In Vitro. Ensayo realizado fuera de un organismo vivo

Osteoesfera. Modelo de cultivo 3D formado a partir de osteoblastos.

Autoensamblaje. Células individuales constituyen esferoides por sí mismas.

Bioingeniería de tejidos. Combinación de andamios, células y moléculas biológicamente activas para la creación de tejidos funcionales.

Subcultivos. Obtención de cultivos secundarios a partir de la transferencia de un cultivo primario.

Cultivos monocapa. Tipo de cultivo en el que las células crecen en una sola capa sobre una superficie.

Andamio. Estructura utilizada para apoyar y dirigir el crecimiento celular

Oxy-chip. Sensor de oxígeno implantable que puede detectar niveles de oxígeno mediante resonancia paramagnética electrónica

Matrigel. Matriz de membrana basal utilizada para cultivar células y tejidos in vitro.

Cámara de Neubauer. Instrumento de medición de precisión, utilizado para determinar el número de células o partículas por volumen.

American Type Culture Collection. Organización sin fines de lucro que recolecta, almacena y distribuye microorganismos, líneas celulares y otros materiales para investigación.

1. RESUMEN

El tejido óseo es un tejido conectivo que constantemente presenta cambios fisiológicos los cuales involucran células, hormonas, iones, entre otros. El tejido óseo natural se encuentra constituido por fibras orgánicas y colágeno incluidas en una matriz mineral formada de fosfato de calcio amorfo, el cual se transforma en cristales de HAP mediante un proceso de nucleación heterogénea. Para aplicación en el tejido óseo, células mesenquimales pueden ser cultivadas en modelos tridimensionales en un medio no adherente, por lo cual ha surgido la implementación de modelos tridimensionales como las osteoesferas.

A partir de cultivos en monocapa se obtuvieron esferoides a concentraciones de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL, $[0.50 \times 10^2]$ células/mL y $[1 \times 10^2]$ células/mL durante 3, 7, 14 y 21 días con el propósito de identificar la generación de osteoesferas que promuevan un modelo que permita el desarrollo de cristales de fosfato de calcio a 21 días. Se realizaron ensayos de viabilidad por medio de exclusión con azul tripano y ensayos de mineralización con alizarina roja.

A los 21 días en concentraciones de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL se formaron osteoesferas con una conformación homogénea. Las concentraciones mayores se formaron esferoides heterogéneos producto de la agregación celular.

Los esferoides generados a 21 días mostraron una mayor tinción con alizarina roja en los esferoides de $[0.50 \times 10^2]$ células/mL y $[1 \times 10^2]$ células/mL, los cuales presentaban centros necróticos y un mayor número de vesículas extracelulares. En general, se mostró que las condiciones de cultivo y densidad celular influyen directamente en la formación y funcionalidad de las osteoesferas.



2. ABSTRACT

Bone tissue is a connective tissue that constantly presents physiological changes involving cells, hormones, ions, among others. Natural bone tissue is constituted by organic fibers and collagen included in a mineral matrix formed by amorphous calcium phosphate, which is transformed into PAH crystals through a heterogeneous nucleation process. For application in bone tissue, mesenchymal cells can be cultured in three-dimensional models in a non-adherent medium, which is why the implementation of three-dimensional models such as osteospheres has arisen.

From monolayer cultures, spheroids were obtained at concentrations of $[0.25 \times 10^2]$ cells/mL, $[0.50 \times 10^2]$ cells/mL and $[1 \times 10^2]$ cells/mL for 3, 7, 14 and 21 days with the purpose of identifying the generation of osteospheres that promote a model that allows the development of calcium phosphate crystals at 21 days. Viability tests were performed by exclusion with trypan blue and mineralization tests with alizarin red.

At 21 days at concentrations of $[0.25 \times 10^2]$ cells/mL osteospheres formed with a homogeneous conformation. At higher concentrations heterogeneous spheroids were formed as a result of cell aggregation.

The spheroids generated at 21 days showed a higher staining with alizarin red in the spheroids of $[0.50 \times 10^2]$ cells/mL and $[1 \times 10^2]$ cells/mL, which presented necrotic centers and a higher number of extracellular vesicles. Overall, culture conditions and cell density were shown to directly influence osteosphere formation and functionality.



3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades degenerativas óseas incluyen diversas condiciones que impactan la estructura del hueso, reduciendo su resistencia y elevando la probabilidad de fracturas. Entre ellas, la enfermedad ósea más reconocida en el campo médico es la osteoporosis, debido a su elevada frecuencia.

Con el crecimiento de la población adulta proyectado por el cambio en la estructura de la pirámide poblacional, el riesgo de fracturas asociadas a la osteoporosis se perfila como un desafío relevante en el futuro. Por ello, se buscan herramientas en el campo de bioingeniería de tejidos y odontología que sean una solución para defectos óseos.

En la actualidad los defectos óseos representan un desafío constante ya que afectan de manera drástica la vida del paciente, estos defectos primarios ocurren por una pérdida ósea subsecuente a un traumatismo, de manera crónica por enfermedades degenerativas en el hueso y posterior a una resección amplia por un tumor. El tratamiento actual para la reconstrucción de los defectos óseos incluye injertos óseos, los cuales tienen limitaciones de presentar una alta reabsorción, el desarrollo de hueso de baja calidad y morbilidades que pueden ocurrir en el sitio donante, por lo cual se han buscado soluciones en la bioingeniería de tejidos por medio de esferoides tridimensionales de células mesenquimales.

Las osteoesferas son de gran importancia en la bioingeniería de tejidos debido a su capacidad de proporcionar un entorno fisicoquímico y procesos fisiológicos similar al in vivo además de proporcionar conocimientos valuosos en la comprensión de los procesos del tejido óseo y su aplicación en medicina regenerativa por medio de su implementación en estructuras que estimulan la regeneración ósea en lesiones o defectos óseos graves. Conocer las características de este modelo para su utilización es de vital importancia para su optimización y su futuro uso en medicina regenerativa, ya que se ven afectados por distintos factores como la difusión de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento en el medio.

4. ANTECEDENTES

4.1 Tejido Óseo

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo altamente especializado, cuyo propósito esencial es brindar soporte y estabilidad al cuerpo humano. Este tejido se compone por células especializadas y una matriz extracelular mineralizada, lo que le proporciona su rigidez y habilidad para soportar peso y resistir tensiones mecánicas. Además de su función estructural, el tejido óseo juega un papel importante en diversas funciones esenciales, tales como facilitar la locomoción al servir como anclaje para los músculos, brindar soporte y protección a tejidos blandos, actuar como un reservorio de minerales, especialmente calcio y fósforo, y albergar a la médula ósea (Figura 1), donde se lleva a cabo la hematopoyesis (1,2).

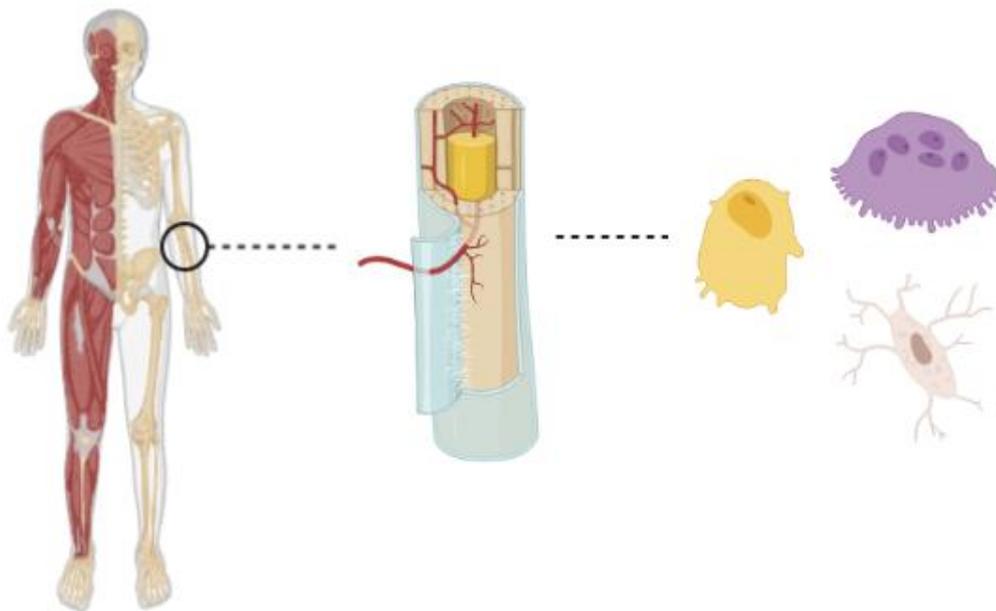


Figura 1. Esquema representativo de los niveles de estructura del tejido óseo. Tomado y modificado de Donald W. Buck Bone Biology and Physiology: Part I 2011 realizado en BioRender.

El tejido óseo se caracteriza por la presencia de diversos tipos celulares especializados que colaboran de manera sincronizada para la formación,

mantenimiento y remodelación del hueso. Estas células comprenden los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y las células del revestimiento óseo, cada una cumpliendo funciones específicas y esenciales (Figura 2). Los osteoblastos son células cuboidales ubicadas en la superficie ósea. Estas células tienen la función principal de sintetizar la matriz ósea, la cual se compone de elementos como colágeno tipo I y proteoglicanos. Este proceso de síntesis se lleva a cabo en dos principales etapas: la deposición de matriz orgánica y su subsecuente mineralización (1,2,3).

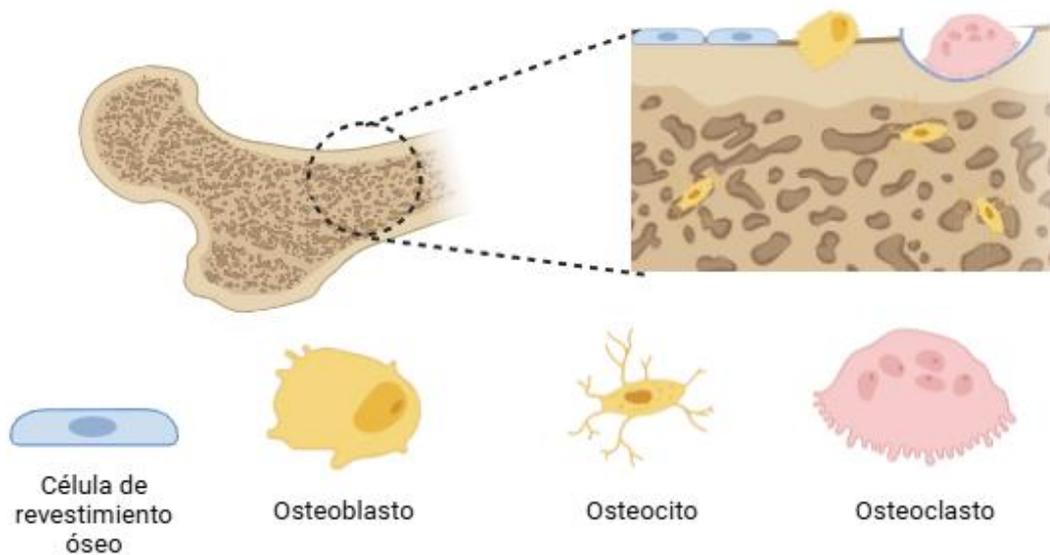


Figura 2. Morfología de las células óseas y su localización. Realizado en Biorender

Una vez que los osteoblastos quedan incluidos dentro de la matriz ósea mineralizada pasan a llamarse osteocitos y mantienen el metabolismo óseo además de controlar el remodelado. Su morfología varía dependiendo el tipo de hueso en el que se localizan. Por ejemplo, los osteocitos encontrados en el hueso cortical son más redondeados a comparación con aquellos del hueso trabecular que muestran una morfología más alargada (1).

Una vez que el osteocito madura y su cuerpo celular queda alojado en una laguna, sus prolongaciones citoplasmáticas se extienden a través de



pequeños túneles llamados canalículos. Estos forman el sistema lacuno-canalicular, que permite la comunicación con otros osteocitos, así como con los procesos citoplasmáticos de los osteoblastos y las células de revestimiento óseo (1,3).

Los osteoclastos son células multinucleadas las cuales su función principal es la reabsorción ósea. Estas células derivan de los precursores hematopoyéticos de la línea mononuclear-macrofágica y desempeñan un papel crucial en el proceso de remodelado óseo, dado que descomponen la matriz ósea mineralizada, liberando calcio y fósforo al torrente sanguíneo cuando se requiere. Durante este proceso, el osteoclasto se polariza y reacciona a interacciones moleculares que lo preparan para la resorción ósea. Esto incluye la reorganización de sus filamentos de actina en el citoesqueleto, lo que le permite formar una unión estrecha con la superficie ósea. Junto con su membrana basal, forma un compartimento hermético conocido como laguna de Howship. Este equilibrio entre la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos es fundamental para mantener la homeostasis ósea y asegurar la adaptabilidad del esqueleto a las demandas mecánicas y metabólicas a lo largo de la vida (2,3,4).

Las células de revestimiento óseo son células alargadas y aplanadas, las cuales revisten a la superficie ósea. La función de las células del revestimiento óseo no está del todo clara, pero al parecer desempeñan un papel importante en el acoplamiento de la resorción ósea con la formación de hueso. (figura 2) (1).

La matriz extracelular del tejido óseo es un bio-entorno dinámico con propiedades mecánicas, bioquímicas y mecánicas que son reguladas con precisión. Esta representa aproximadamente el 90% del volumen total del hueso y desempeña un papel fundamental en este tejido. Está conformada por componentes inorgánicos, en particular sales de calcio y fósforo combinados con iones hidroxilo que conforman cristales de hidroxiapatita, otorgándole al tejido óseo su característica dureza y resistencia; además



de componentes orgánicos principalmente colágeno tipo I y V, que le proporciona flexibilidad (5,6).

En el hueso, la matriz extracelular se encuentra involucrada en procesos tales como la regulación de la adhesión celular, la proliferación y la respuesta a factores de crecimiento, la diferenciación, y finalmente, las propiedades funcionales del hueso maduro. La matriz extracelular del tejido óseo tiene la capacidad de inducir la producción de hueso nuevo, así como propiciar la absorción ósea por los osteoclastos (7).

4.1.1 Estructura

La estructura del tejido óseo es especializada y compleja, siendo organizada en diferentes niveles jerárquicos, desde la escala microscópica hasta la macroscópica. El hueso se puede clasificar en dos tipos principales: hueso cortical y hueso trabecular (8).

El hueso cortical constituye la zona periférica o superficial del hueso. Este se caracteriza por su rigidez y resistencia ante fuerzas mecánicas. Está conformado por unidades estructurales llamadas osteonas; cada osteona consiste en conductos de Havers, a través del cual pasa un componente vasculo-nervioso. Estos conductos se encuentran recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos (Figura 3). La relación superficie/volumen en el hueso cortical es mucho menor que en el hueso trabecular, algo que cambia con el envejecimiento o la enfermedad, en los cuales se vuelve más poroso, ganando superficie, pero perdiendo fuerza (8,9).

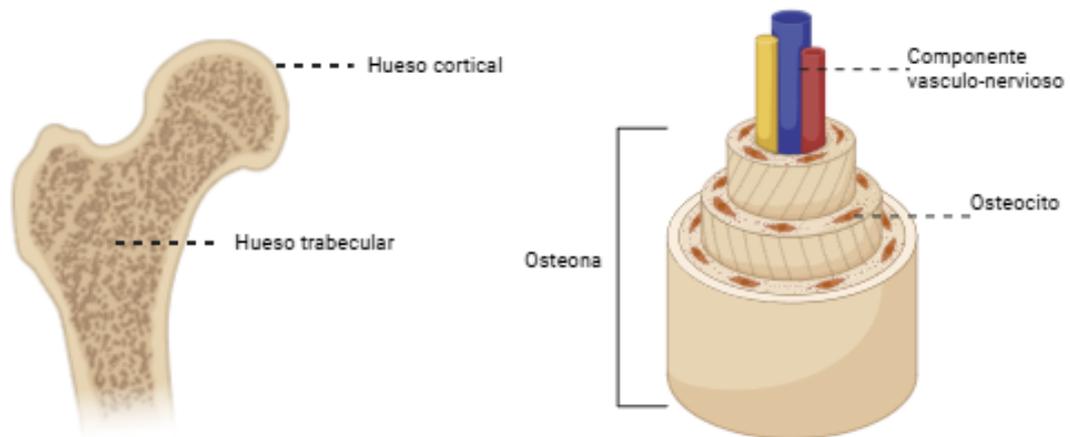


Figura 3. Esquema representativo de la estructura ósea y componentes de la osteona. Tomado y modificado de Jae-Young R et al. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone 1998 realizado en biorender

El hueso trabecular representa la zona central o interna del hueso, en la cual se aloja la médula ósea hematopoyética o amarilla. Está formado por láminas intersticiales, denominadas como trabéculas, que se disponen de manera irregular. El hueso trabecular se distingue por tener un índice de actividad metabólica y de remodelado superior al que el hueso cortical. Esta diferencia le permite responder de manera más rápida a los estímulos mecánicos, ya que las células óseas primarias, tales como osteoblastos y osteocitos, se encuentran más próximas a los factores de crecimiento y a las citocinas. Adicionalmente, el hueso trabecular desempeña un papel crucial al transferir las cargas mecánicas desde la superficie articular hacia el hueso cortical (Figura 4) (8,9).

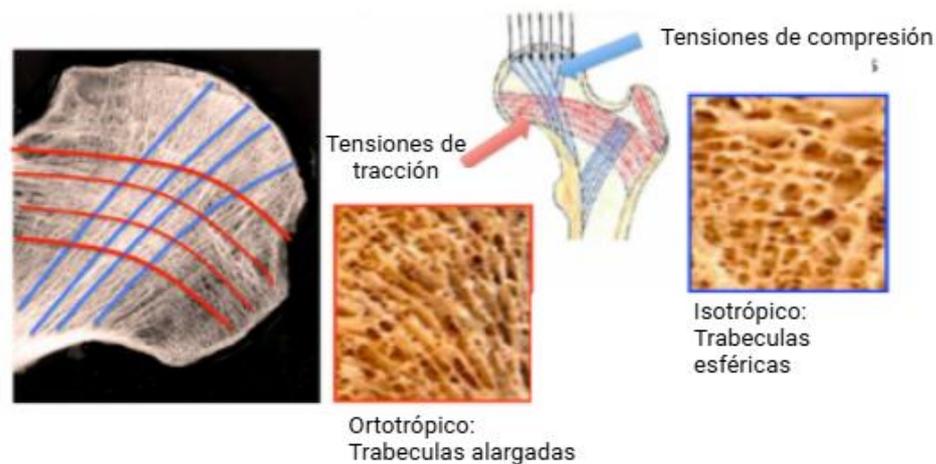


Figura 4. Orientación estructural de las trabéculas óseas en compresión (líneas azules) y tracción (líneas rojas). Además de su morfología isotrópica (compresión) y ortotrópica (tracción). Tomado y modificado de Rafaella A, Florian-Ion, Relly-Victoria P, Apicella A. Flexible Stem Trabecular Prosthesis 2016

4.1.2 Metabolismo óseo

El hueso es uno de los tejidos conjuntivos más metabólicamente activos en el cuerpo humano, en contraposición a la percepción habitual que se tiene del hueso como un tejido que no experimenta cambios tras su formación. No obstante, el hueso se encuentra en un constante remodelado el cual permite repararse a sí mismo ante una fractura y adaptarse ante un requerimiento mecánico mayor (10,11).

El metabolismo óseo es un proceso dinámico y complejo que comprende actividades como el desarrollo, el mantenimiento estructural y funcional del hueso, además de la regulación de la homeostasis mineral. Este proceso depende de la interacción coordinada de diversos tipos celulares, tales como los osteocitos, que actúan como sensores mecánicos; los osteoclastos, responsables de la resorción ósea; y los osteoblastos, encargados de la formación del tejido óseo nuevo. Además, el metabolismo óseo está influenciado por fuerzas mecánicas externas que estimulan la remodelación del hueso para adaptarse a las demandas funcionales. Asimismo, está regulado por diversas señales bioquímicas, como la hormona paratiroidea (PTH) y hormona del crecimiento (GH), además de citocinas, junto con factores locales como el factor de crecimiento derivado



de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Todos estos elementos trabajan en conjunto para garantizar la integridad estructural y metabólica del tejido óseo a lo largo de la vida. (Tabla 1) (11,12).

Los factores de tasa de remodelación, matriz colágena, tamaño, estructura, densidad y geometría se combinan para establecer las propiedades mecánicas del hueso, que incluye la resistencia, flexibilidad y capacidad para soportar cargas. La relación entre estos parámetros es esencial para garantizar un equilibrio entre la formación y resorción ósea, lo cual permite mantener un tejido óseo saludable y funcional. Sin embargo, cuando se producen alteraciones o defectos en alguno de estos aspectos, pueden surgir enfermedades óseas significativas. Por ejemplo, la osteoporosis osteopetrosis, la enfermedad de Paget y osteogénesis imperfecta (11).

Los estudios muestran que el proceso de remodelado óseo es esencial para la renovación del tejido óseo, concediendo que alrededor del 5% del hueso cortical y el 20% del hueso trabecular se renueven anualmente. A pesar de que el hueso cortical constituye una porción mayor en el cuerpo humano, el ritmo de renovación del hueso trabeculares considerablemente superior debido a su mayor actividad metabólica y su estructura más porosa. Este proceso constante de renovación resulta en un recambio anual del 5-10% del total del hueso en el cuerpo, garantizando su funcionalidad y capacidad de adaptación a las fuerzas mecánicas a lo largo de la vida. no obstante que este remodelado ocurre durante toda la vida, su balance solo es positivo durante las tres primeras décadas de la vida (5,14).

En circunstancias normales, la resorción ósea y deposición de matriz para su posterior osificación son procesos íntimamente vinculados que siempre suceden en la misma secuencia y son llevados a cabo por un conjunto de osteoclastos y osteoblastos que forman la unidad multicelular básica (UMB). Los osteoclastos inician el proceso de resorción en respuesta a señales relacionadas con daño local y/o muerte de osteocitos. En



consecuencia, osteoblastos son reclutados para depositar matriz ósea, la cual posteriormente se mineraliza (15).

Tabla 1. Biomoléculas involucradas en el metabolismo óseo y su función (11,12,13).

Hormonas tiroideas	A través de los osteoblastos promueven la formación de la matriz osteoide y su mineralización, además de generar un efecto opuesto al fomentar la reabsorción a través del incremento en la cantidad y función de los osteoclastos.
Calcitonina	Produce una inhibición temporal de la reabsorción ósea debido a la disminución del número y actividad de osteoclastos.
Hormona paratiroidea (PTH)	Regula la homeostasis del calcio a mediante la transferencia de calcio del hueso al torrente sanguíneo e incrementa la excreción de fosfatos por medio de la orina. No obstante, recientes investigaciones han demostrado su función estimulante en la formación ósea a través de la síntesis de IGF-I y TGF-b.
Calcitriol	Promueve la mineralización de los huesos al promover la absorción de calcio y fosfato en el intestino.
Andrógenos	Producen la estimulación de receptores en osteoblastos y funcionan como mediador en el pico de GH durante la etapa de pubertad.



Estrógenos	Promueve la formación ósea al aumentar la cantidad y función de los osteoblastos.
Progesterona	Posee un rol en el remodelamiento óseo, tanto directamente mediante los osteoblastos como indirectamente a través de la competencia por los receptores osteoblásticos.
Hormona del crecimiento (GH)	Incrementa la actividad de los osteoblastos, lo que resulta en un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. Incrementa de manera indirecta la síntesis de IGF-I y II, lo que conduce a un incremento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos.
Factores de crecimiento	<p>IGF-I Promueven la proliferación celular cartilaginosa y síntesis de su matriz celular.</p> <p>IGF-11</p> <p>PDGF Promueve la formación de células óseas, además de inducir la síntesis de colágena tipo I por medio de los osteoblastos maduros.</p>
Citocinas	Promueven la resorción ósea (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11) e inhiben la resorción ósea (IFN-K , IL-4)

4.1.3 Composición inorgánica

Como anteriormente se mencionó, el hueso es un tejido dinámico y altamente especializado, cuya composición está diseñada para cumplir con las demandas estructurales y metabólicas del organismo. Su fase mineral está constituida principalmente por sales de calcio y fósforo, las cuales combinadas con iones hidroxilo forman la hidroxiapatita (HAP). Este

biocristal hexagonal representa aproximadamente el 70% del peso del hueso y es fundamental para conferirle su característica rigidez y resistencia (11).

La hidroxiapatita se encuentra organizada en forma de pequeños cristales que se distribuyen y alinean cuidadosamente en el interior del tejido óseo. En particular, estos cristales se orientan de manera que sus ejes longitudinales corren paralelos a las fibras de colágeno del hueso. Esta disposición estructural, lejos de ser aleatoria, está íntimamente ligada a los requerimientos biomecánicos del tejido. La alineación de los cristales y las fibras de colágeno refleja la dirección de las fuerzas de carga mecánica y el patrón de crecimiento del hueso, proporcionando una combinación ideal de resistencia y flexibilidad. (Figura 5) (11).

Esta arquitectura organizada es fundamental para que el hueso cumpla con su función de soporte, permitiendo que resista tensiones y deformaciones durante la locomoción, la carga y otros esfuerzos físicos. Además, la relación entre los cristales de HAP y las fibras de colágeno no solo contribuye a la integridad mecánica del hueso, sino que también desempeña un papel en la capacidad para remodelarse y adaptarse a los cambios funcionales a lo largo del tiempo (14).

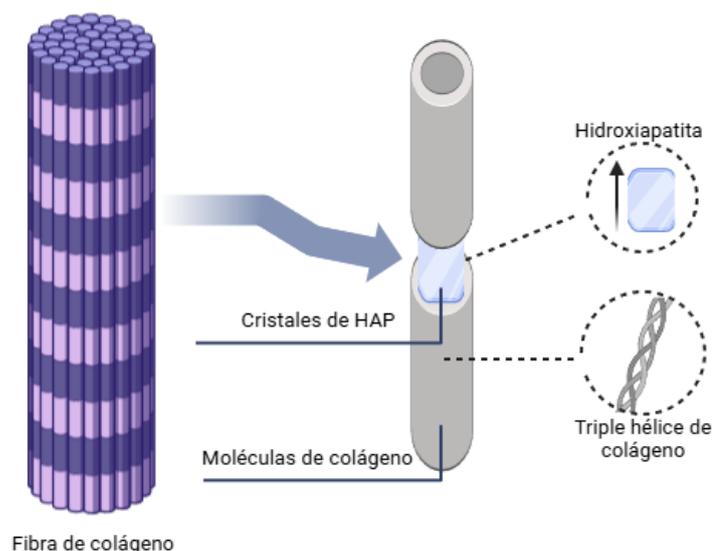




Figura 5. Disposición de la HAP conforme las fibras de colágeno. Tomado y modificado de Jae-Young R et al. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone 1998 realizado en biorender.

4.1.4 Cristales de HAP

La hidroxiapatita (HAP) es un componente estructural esencial de los tejidos mineralizados del organismo humano, tales como el hueso y el esmalte dental. Este es un biocristal compuesto principalmente por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, y se manifiesta como una estructura cristalina de forma hexagonal. Su configuración altamente organizada contribuye a la resistencia y rigidez de los tejidos donde se encuentra presente (16).

Desde el punto de vista químico, los cristales de hidroxiapatita están compuestos principalmente por calcio y fosfato, en una proporción estequiométrica que le otorga estabilidad. Sin embargo, la HAP en su estado natural también incluye pequeñas cantidades de otros elementos como sodio, cloruro, carbonato y magnesio, los cuales desempeñan un rol crucial en la función de remodelación del hueso (Tabla 2) (16).

Tabla 2. Composición química de la HAP. (8)

Elemento	Porcentaje en peso	Moles
Ca	41,06 μm	1,0244
P	18,55 μm	0,5990
O	40,36 μm	--

La biomineralización es un proceso que conlleva el crecimiento controlado de cristales a partir de soluciones acuosas, y se generan matrices orgánicas propias para actuar como huésped para el proceso de nucleación y crecimiento. Los grupos funcionales de estas matrices y sus combinaciones son esenciales para inducir la nucleación superficial y promover la formación de HAP (15)

El hueso alberga grandes cantidades de proteínas séricas, incluida la albúmina y α -HS-glicoproteína, junto con proteínas sintetizadas por las



células óseas como la osteonectina (ON), la osteopontina (OPN), la osteocalcina (OC) y la sialoproteína ósea (BSP); todas estas son proteínas ácidas que se unen al calcio. (17,18)

Estudios han evidenciado que la BSP es una potente inductora de la nucleación. En cambio, la OPN es un potente inhibidor de la formación de HAP (19).

4.1.5 Nucleación

El tejido óseo es el principal almacén de calcio y fósforo para el organismo, y estos elementos se encuentran principalmente en forma de minerales de fosfato de calcio, que representan aproximadamente el 70% de la masa ósea. Los fosfatos de calcio forman parte de una amplia familia de minerales que poseen iones de calcio (Ca^{2+}), combinados con aniones de fosfato (Tabla 3) (20).

Tabla 3. Fosfatos de calcio (CaP)

Ortofosfatos

Fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Fosfato octacálcico $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Fosfato de calcio amorfo

Apatitas

Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$

Oxiapatita

Fluorapatita

El tejido óseo natural se encuentra constituido fundamentalmente por fibras orgánicas y colágeno inscritas en una matriz mineral conocida como fosfato de calcio apatítico polisustituido, ya que uno de los iones que se puede sustituir es el carbonato (CO_3). Esta modificación da como resultado una apatita parcialmente sustituida o apatita deficiente en calcio, que se conoce como hidroxiapatita carbonatada. Para ser considerada una HAP carbonatada su fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2(\text{CO}_3)$ y relación molar de $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ (20).



El principal componente mineral del hueso es la HAP carbonatada (la concentración de carbonato varía entre el 2 y el 9%) con una estructura cristalina predominantemente hexagonal. La HAP se asocia con las fibrillas de colágeno (minerales intrafibrilares) o se sitúa en el espacio entre las fibrillas (minerales extrafibrilares). La mineralización comienza en el espacio entre las fibrillas, en el cual se sitúan las proteínas ácidas no colágenas (las cuales tienen el papel de iniciar este proceso) y el primer mineral que se forma durante la osificación intramembranosa o endocondral es el fosfato de calcio amorfo, que luego se transforma en cristales de HAP mediante un proceso de nucleación, crecimiento y agregación. El entorno químico circundante (factores que afectan al pH) y los estímulos mecánicos determinan la velocidad, el tamaño y la morfología del crecimiento de los cristales (20,21).

La unión de un ion de calcio al grupo carboxilato del colágeno es uno de los factores clave para el inicio de la nucleación de los cristales de HAP (21).

La formación de la HAP es resultado de una nucleación heterogénea, ya sea en otra fase mineral o en la matriz orgánica. En el segundo caso, es posible que la matriz orgánica ofrezca una conformación idónea de unión de átomos de ligando a los iones de calcio en el paso de crecimiento de cristales inicial, el cual comienza siempre que las condiciones del medio, como pH básico lo permitan, formando cristales hexagonales de gran tamaño con un espacio grupal P63/m (patrón que se repite en tres dimensiones) (22,23).

La mineralización es un proceso biológico complejo y regulado en gran medida que desempeña un rol esencial en el mantenimiento de la fuerza e integridad del sistema esquelético. Este proceso es responsable del depósito de sustancias mineralizadas dentro de la matriz ósea, proporcionando dureza y resistencia al tejido óseo (21).



4.2 Bioingeniería de tejidos

Hoy en día, la investigación en células troncales se ha convertido un tema que ha generado muchas expectativas para su utilización en medicina. Una de sus aplicaciones con gran potencial es el desarrollo de modelos *in vitro* que permitan el análisis de diferentes procesos que suceden durante el desarrollo embrionario tales como diferenciación celular, interacción celular y la inducción de señales. Estos modelos no sólo resultan útiles para la investigación básica, sino que también constituyen herramientas valiosas para entender diversas patologías (24,25).

Además, actualmente se busca obtener células mesenquimales de diversas fuentes para su aplicación en la bioingeniería de tejidos la cual es un campo emergente que se presenta como un método alternativo para la sustitución de tejidos dañados (24).

La funcionalidad de un tejido desarrollado a través de la bioingeniería de tejidos puede abarcar aspectos tanto estructurales como metabólicos, o bien, fusionar ambas características de manera conjunta. Las células empleadas en este proceso pueden integrarse un sistema de cultivo o ser reclutadas *in vivo*, apoyándose en el uso de biomateriales y/o biomoléculas (25).

Uno de los componentes fundamentales de la bioingeniería de tejidos es la generación de una gran cantidad de células que conserven su identidad histológica similar al *in vivo*. Esto implica establecer cultivos celulares óptimos, amplificar las poblaciones celulares a través de los subcultivos utilizando diversos factores en los medios nutritivos, así como también considerar la cantidad celular, dado que es importante la interacción entre célula y célula (24).

4.2.1 Cultivo bidimensional vs cultivo tridimensional

Los cultivos celulares son una herramienta *in vitro* ampliamente usada para profundizar nuestra comprensión de la biología celular y morfología tisular, además de constituir un campo de investigación en el desarrollo de la bioingeniería de tejidos (26).



Los cultivos pueden realizarse en condiciones adherentes (monocapas o bidimensionales) o no adherentes (tridimensionales). En los cultivos 2D, las células se desarrollan como una monocapa adherida a una superficie tratada para el anclaje celular. Los beneficios de los cultivos 2D están vinculados con un mantenimiento simple y relativamente económico, en el cual nos permite la realización de diversos protocolos. Las desventajas comprenden la limitación del estudio a un solo tipo de célula, y en el cual la célula solo tiene contacto con otra célula en un área limitada de su superficie (26).

Los modelos 3D se pueden categorizar según su método de preparación en: cultivos en suspensión sobre placas no adherentes, cultivos en medio concentrado o sustancias tipo gel y cultivos en un andamio (Figura 6) (26).

Los modelos basados en andamios utilizan estructuras que imitan la composición de la matriz extracelular para simular el microambiente celular nativo. En los sistemas sin andamios, las células se autoensamblan formando esferoides (27).

En todos los sistemas de cultivo 3D, las células crecen en un medio que regula su fenotipo y función, lo que hace a los cultivos 3D una mejor representación de los procesos que ocurren in vivo en comparación con los cultivos monocapa (28).

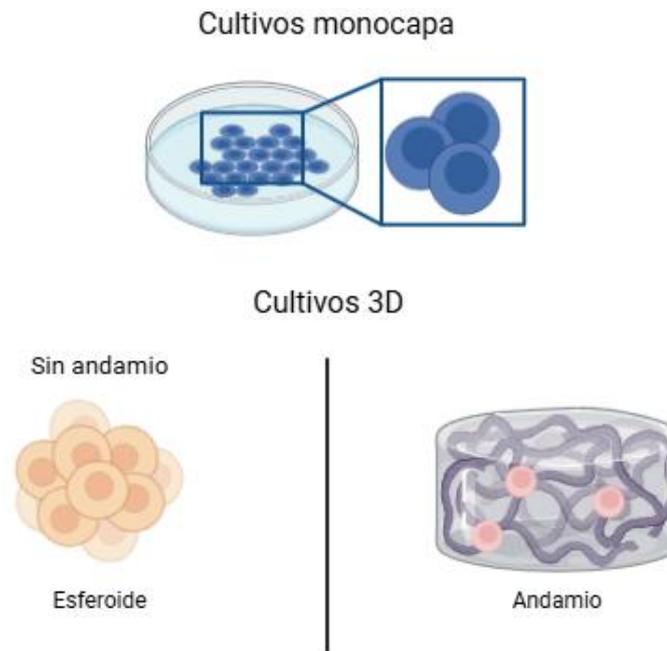


Figura 6. Esquema representativo de los cultivos monocapa y los distintos sistemas de cultivo 3D (sin andamios y basados en andamios). Tomado y modificado de Figueroa 3D Cell Culture Models in COVID-19 Times: A Review of 3D Technologies to Understand and Accelerate Therapeutic Drug Discovery. Biomedicines. 2021

4.2.1 Esferoides en regeneración ósea

En cultivos en suspensión las células tienden a agregarse y pasar por un proceso de autoensamblaje. Los esferoides se pueden ver afectados por distintos factores incluido el gradiente de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento en el medio. El medio de cultivo celular penetra en el interior de los esferoides por difusión. Cuanto mayor es el tamaño alcanzado por los esferoides, más difícil se vuelve para el medio llegar al núcleo de los esferoides (29).

Los esferoides de células mesenquimales secretan niveles más altos de citocinas y quimiocinas, estos afectan la proliferación, viabilidad y migración de las células y también secretan una angiogénesis más alta que las secretadas en aquellas cultivadas en monocapa, por lo que una de sus utilidades es en medicina regenerativa (30).



Tabla 4. Características de los distintos métodos de cultivo 3D.

Modelo 3D	Descripción	Ventajas	Desventajas
Cultivos en suspensión sobre placas no adherentes	Las células individuales se siembran en placas no adherentes con medio.	Las células pueden extraerse fácilmente del medio y utilizarse para experimentos posteriores.	Las capas cubiertas con materiales no-adherentes son costosas.
Cultivos en medio concentrado o sustancias tipo gel	Las células individuales crecen en un medio que contiene sustancias con propiedades gelificantes.	Las células cultivadas en matrigel se pueden recuperar fácilmente para su posterior análisis, tienen interacciones tridimensionales con el entorno local y forman estructuras similares a los tejidos.	Dificultad para obtener esferas para ciertas líneas, preparación inconveniente y lenta de las dos capas de agar y requisito de cultivos a largo plazo. Baja repetibilidad de los resultados.
Cultivos en andamio	Las células pueden migrar entre las fibras y adherirse al andamio, hecho de materiales biodegradables como seda, colágeno, laminina, alginato.	El sistema es compatible con las pruebas funcionales disponibles en el mercado, así como con los kits de aislamiento de ADN/ARN y proteínas. Fácil de preparar para el análisis inmunohistoquímico.	Las células adheridas a los andamios se aplanan y se propagan como las células cultivadas en condiciones adherentes. La observación y extracción de las células es restringida.

Después de la implantación de los esferoides, las células mesenquimales pueden ser inducidas a diferenciarse en células apropiadas para reconstruir el sitio. El potencial de diferenciación de los esferoides ha sido demostrado *in vitro* (30).

5. OSTEOESFERAS

Para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo, las células mesenquimales multipotentes (CMM), derivadas comúnmente de médula ósea, tejido adiposo u otras fuentes, pueden ser cultivadas en modelos tridimensionales en un medio sin anclaje (Figura 7). Estas agrupaciones de células que crecen en condiciones no adherentes son llamadas osteoesferas (31).

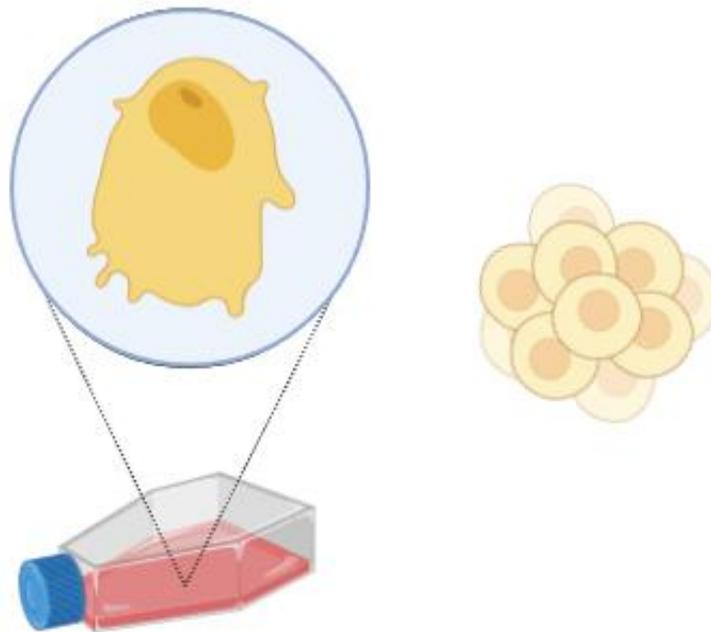


Figura 7. Esquema representativo de vista microscópica de osteoblasto en frasco de cultivo celular y osteoesfera. Realizado en Biorender.

Las osteoesferas representan un sistema tridimensional simple, en el cual no se requiere un andamio ni material de soporte para el crecimiento celular en 3D. Este sistema tiene ventajas relevantes como facilitar la interacción célula-célula y célula-matriz, proporcionar un entorno fisicoquímico similar



al *in vivo*, secretar citoquinas, quimiocinas y factores angiogénicos y mantener propiedades fenotípicas intrínsecas exactas a las *in vivo* (32).

Se encuentran varios métodos disponibles para la generación de osteoesferas, cada uno con sus propias ventajas y limitaciones. Algunos de los métodos más utilizados incluyen el cultivo en matraces giratorios, el método de caída colgante, las placas de baja fijación y la microfabricación. Estos métodos permiten el cultivo de células en condiciones tridimensionales que simulan mejor las interacciones celulares en los tejidos nativos en comparación con los cultivos bidimensionales tradicionales (33).

El cultivo en matraces giratorios es uno de los métodos más comunes, ya que favorece la formación de esferoides al permitir que las células se agrupan espontáneamente mientras están suspendidas en el medio de cultivo. Similarmente, el método de caída colgante involucra la formación de gotas de suspensión celular que caen de una plataforma, permitiendo que las células se agrupen en esferoides bajo condiciones de gravedad. Las placas de baja fijación, por su parte, proporcionan un sustrato que favorece el crecimiento celular en 3D sin un anclaje firme, lo que facilita la formación de osteoesferas. La microfabricación, por otro lado, permite crear estructuras y plataformas a escala microscópica, proporcionando un control preciso sobre la forma y el tamaño de las osteoesferas (34).

Sin embargo, independientemente del método utilizado, se ha observado que el tamaño de los agregados celulares tiene un impacto significativo en las respuestas celulares dentro del microambiente tridimensional. Los estudios sugieren que el tamaño de las osteoesferas influye en diversos factores, como la proliferación celular y la diferenciación osteogénica (Figura 8) (35).

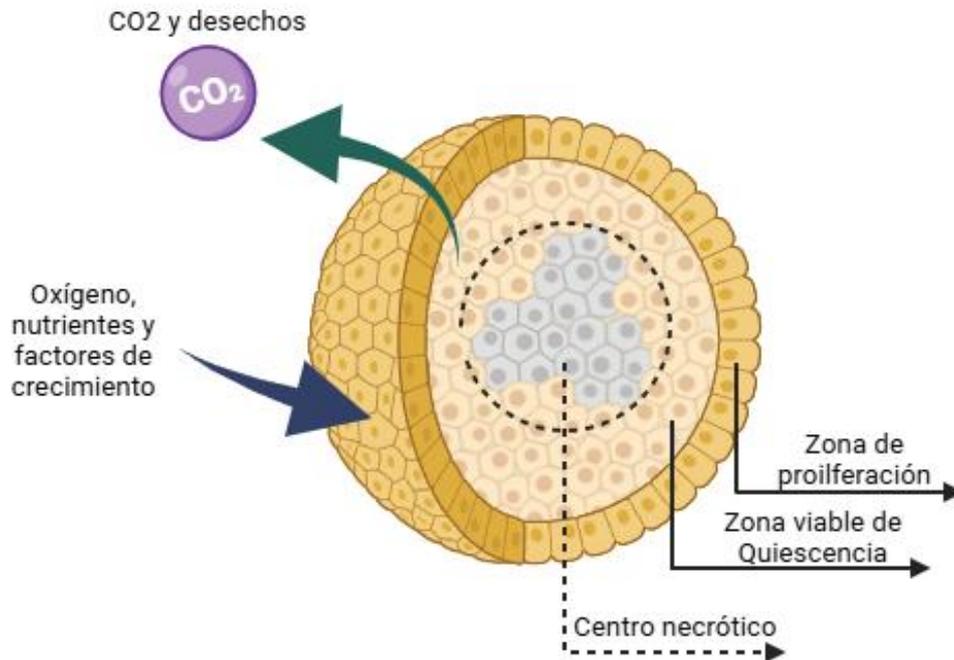


Figura 8. Microambiente tridimensional. Se muestran tres zonas: zona de proliferación, zona de quiescencia y centro necrótico. Tomada y modificada de Lin R-Z, Chang H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research 2008

El estudio de las osteoesferas en regeneración ósea se ha convertido un tema con bastantes desafíos, por lo que se ha surgido el desarrollo de técnicas de cultivo que optimizan la morfología del esferoide celular enfocándose en un tamaño uniforme, en combinación con el desarrollo de dispositivos que optimizan la permeabilidad de nutrientes y oxígeno dentro de la estructura como un Oxy-chip (36).

De acuerdo con recientes artículos, este tipo de modelo 3D muestra que el origen celular es una variable para considerar. Las células más utilizadas a menudo son células mesenquimales de médula ósea debido a que son las que tienen el nivel más alto de caracterización, sin embargo, su obtención es una limitación importante cuando se considera la posible aplicación odontológica clínica, por lo que el uso de células tales como células mesenquimales derivadas del tejido adiposo, células troncales craneales



de ratón, células mesenquimales de ligamento periodontal y odontoblastos humanos primarios se ha convertido en objeto de análisis (Tabla 4) (37,38,39).

Tabla 5. Resultados respecto al estudio de distintas fuentes celulares en la formación de osteoesferas.

Células	Técnica	Células/mL	Resultados
células troncales craneales de ratón	Cultivo de baja adherencia	2×10^5	Su regulación con inhibidores químicos específicos de las vías de señalización de PI3K/AKT modula la reparación ósea craneal al dirigirse a células troncales específicas en los tejidos locales.
Osteoblastos humanos primarios	Cultivo de baja adherencia	5×10^4	Exhiben una alta viabilidad y desarrollan rápidamente una vascularización funcional después del trasplante.

En cuanto a las osteoesferas formadas a partir de osteoblastos, recientes estudios han mostrado que, bajo condiciones específicas de cultivo, es posible inducir la formación de nódulos mineralizados que simulan el proceso de osteogénesis. En particular, se ha determinado que cuando las células se cultivan en suspensión en un medio inductor durante un período de 14 días, se establecen las condiciones óptimas para la formación de nódulos por deposición de calcio, un proceso clave en la mineralización ósea (40).

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los defectos óseos causados por traumatismos, enfermedades, cirugías o malformaciones congénitas se han convertido en un importante problema de salud a nivel mundial. El estándar todavía utiliza autoinjertos y aloinjertos, sin embargo, tienen la desventaja de presentar una alta reabsorción y, a veces, el desarrollo de hueso es de baja calidad y las morbilidades pueden ocurrir en el sitio donante. Estas complicaciones inherentes a los injertos trasplantados han generado interés en la ingeniería



de tejidos para el desarrollo de osteoesferas con el propósito de su utilización en medicina regenerativa.

7. JUSTIFICACIÓN

En años recientes el uso de modelos celulares tridimensionales en el campo de la investigación biomédica ha tomado relevancia dado que ofrecen un microambiente celular arquitectónico y funcional más parecido a lo que se observa en el cuerpo humano. Los estudios referentes al uso de osteoesferas es reciente y la información que existe hasta hoy es insuficiente. No existe en la literatura reportes de la formación y caracterización de los cristales de fosfato de calcio que se están formando en estos modelos por lo cual identificar su formación y caracterización nos proporciona un indicio de la posibilidad de utilizar osteoesferas en regeneración ósea y así promover una solución para los defectos óseos.

8. HIPÓTESIS

Los osteoesferoides estandarizados son capaces de formar cristales de fosfatos de calcio.

9. OBJETIVOS

9.1 General

- Identificar las condiciones de cultivo en suspensión para obtener osteoesferas que promuevan la producción de cristales de fosfato de calcio.

9.2 Específicos

- Identificar la concentración celular de osteoblastos que promuevan la formación de osteoesferoides viables a 21 días.
- Determinar la viabilidad de osteoesferoides a 21 días de formación.
- Identificar la formación de cristales de fosfato de calcio por microscopía de barrido.



10. MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular. Se utilizó una línea celular establecida de osteoblastos fetales (hFOB 1.19) adquirida con American Type Culture Collection (ATCC).

Materiales. Frascos de cultivo celular adherente 25 mL³, pipetas 5 y 10 mL, puntas para micropipeta 1000, 100, 10 µL, tubos clínicos de 15 y 50 ml, placas de ultra baja adherencia de 24 pozos (Corning Incorporated®, Corning, NY, USA)

Equipo. Campana de flujo laminar (Biobase®, Biobase, China), micropipetas Unicanal (sinLabs), incubadora (Luzeren®, Luzeren, USA)

Reactivos. Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, por las siglas de Dulbecco's Minimum Essential Medium) y Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), suero bovino fetal (SBF) (GIBCO®/ Thermofisher Scientific Inc. New York, USA), sustituto de suero, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (βFGF) (Biolegend, France), glutamina, tripsina-EDTA, β-glicerofosfato (10mM) + ácido ascórbico (50 µg/ml) (Sigma Aldrich-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), Azul tripano al 4%, alizarina roja.

10.3 Métodos

Cultivos en monocapa. Osteoblastos (hFOB 1.19) se crecieron en frascos que permiten la adherencia con medio DMEM, suplementado con 10% de suero bovino fetal a 37° C y 5% de CO₂ y una humedad relativa de 95%. Se cambió medio fresco cada tercer día y se llevó a confluencia del 75% para realizar los ensayos.

Estandarización de esferoides. A partir de los cultivos en monocapa se obtuvieron suspensiones celulares y se cuantificó la concentración celular mediante exclusión de azul tripano con cámara de Neubauer. En una placa de 24 pozos de baja adherencia se colocó medio DMEM F12 suplementado con 10 mM de glicerofosfato sódico, 50 µg mM de L-ascorbato, factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento fibroblástico básico



(FGF) y se sembraron tres concentraciones celulares [0.25 X10²], [0.5 x10²], [1 x10²] células/mL con la finalidad de determinar cuál favorece la formación de esferas viables y homogéneas a los 3, y 7, 14 y 21 días de crecimiento. Se evaluó el tamaño de los esferoides, mediante la adquisición y análisis de imágenes con el programa ImageJ.

Tinción con alizarina roja. Con la finalidad de saber si los osteoesferoides son capaces de formar cristales de fosfatos de calcio, se obtuvieron esferoides en suspensión a concentraciones de [0.25 X10²], [0.5 x10²], [1 x10²] células/mL y cada condición se lavó en dos ocasiones con PBS 1X para ser fijados con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 10 minutos. Se lavaron en tres ocasiones con PBS 1X y se sometieron a una tinción con alizarina roja al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con PBS 1X para visualizar la deposición de calcio en la matriz extracelular.

Análisis estadístico. Los datos que se presentan corresponden a la media \pm error estándar del número de observaciones (n=3). Las comparaciones estadísticas se ejecutaron por la prueba ANOVA seguido por el análisis de Tukey utilizando Excel. La disparidad entre las medias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

Análisis con microscopía de barrido

Se utilizó un microscopio electrónico de Barrido (SEM) marca Hitachi SU8230 con la finalidad de realizar el análisis ultraestructural de los esferoides, las muestras se recubrieron con una capa de oro en un equipo Sputter Coater EMS 550. Las muestras fueron visualizadas utilizando un voltaje de aceleración a 5 kV mediante electrones secundarios. Así mismo, fue realizado el análisis de dispersión de energía de rayos X (EDS) utilizando un detector Bruker X flash 6/60 con la finalidad identificar compuestos químicos presentes en las muestras.

11. RESULTADOS

Estandarización de esferoides

Bajo condiciones de cultivo en suspensión con las concentraciones utilizadas de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL, $[0.50 \times 10^2]$ células/mL y $[1 \times 10^2]$ células/mL, se forman estructuras esferoidales a partir de las primeras 24 horas. Se observa una variación en el tamaño de los osteoesferoides según la concentración celular: en la concentración de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL, respecto a $[0.50 \times 10^2]$ células/mL, la diferencia de tamaño es del 12%, mostrando una mayor homogeneidad en su conformación conforme avanza el tiempo. Por otro lado, en la concentración de $[0.50 \times 10^2]$ células/mL respecto a $[1 \times 10^2]$ células/mL, la variación de tamaño es del 4%, con la formación de esferoides de tamaño superior a $380 \mu\text{m}$.

A partir del séptimo día, se comienzan a observar esferas de diversos tamaños en las concentraciones de $[0.50 \times 10^2]$ células/mL y $[1 \times 10^2]$ células/mL. Esto incrementa durante los 14 y 21 días tanto en condiciones de control como en presencia de medio inductor (Figura 9).

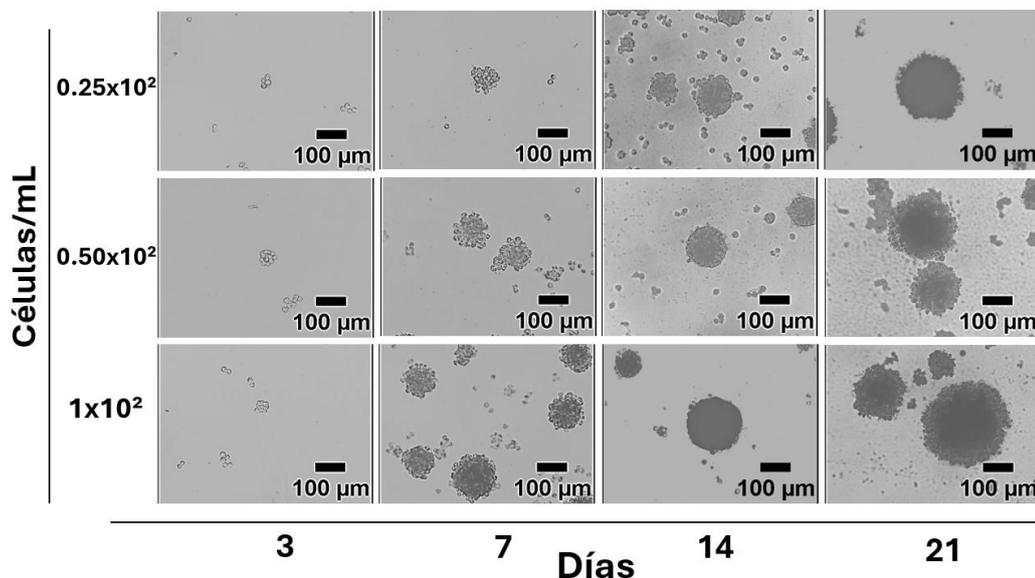


Figura 9. Estandarización de tres condiciones para la formación de osteoesferoides de las líneas celulares hFOB 1.19 a diferentes concentraciones celulares durante 3, 7, 14 y 21 días. Aumento 25X.

La viabilidad celular es un parámetro importante en la bioingeniería de tejidos, esencial en el desarrollo de protocolos para modelos tridimensionales y la comprensión de procesos biológicos.

Las concentraciones de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL, $[0.50 \times 10^2]$ células/mL y $[1 \times 10^2]$ células/mL fueron sometidas a tinción con azul tripano para evaluar su viabilidad por medio de exclusión en una cámara de Neubauer a los 21 días. Los resultados mostraron que la viabilidad independiente del tiempo es superior al 60% en las 3 concentraciones, aunque se mostró una discrepancia entre los cultivos que crecieron en medio basal y medio inductor en concentraciones de $[0.25 \times 10^2]$ y $[1 \times 10^2]$ (Figura 10).

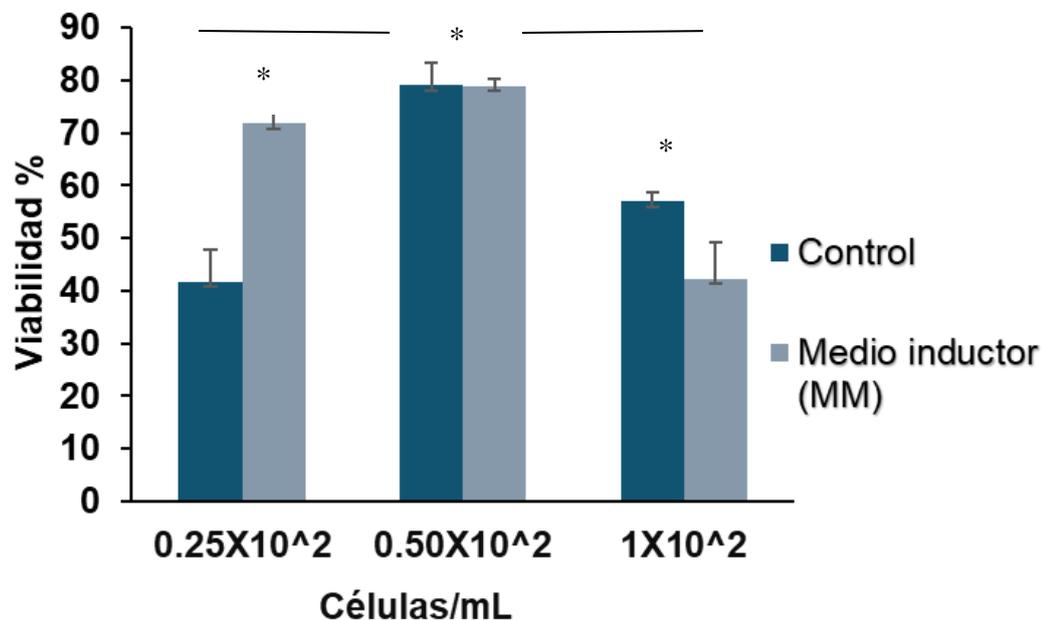


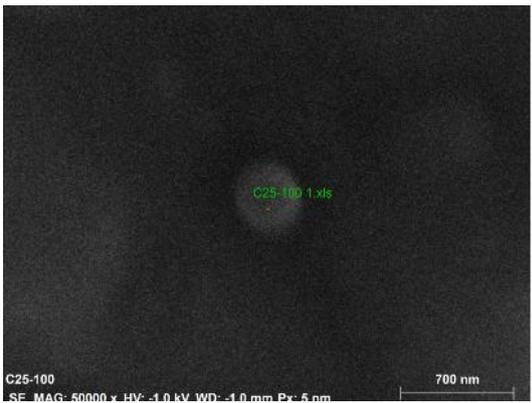
Figura 10. Ensayos de viabilidad a los 21 días. Los datos son presentados como la media \pm ES (n=3). Los asteriscos indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) determinada por la prueba de ANOVA y un post hoc de Tukey

Para los ensayos de detección de nódulos mineralizados a 21 días, los esferoides en la concentración $[0.25 \times 10^2]$ células/mL muestran centros de mineralización y zona de proliferación tanto en control como en medio inductor, mientras que esferoides en concentraciones $[0.50 \times 10^2]$ células/mL y $[1 \times 10^2]$ células/mL muestran una mayor tinción en alizarina roja pero la presencia de centros necróticos y mayor número de vesículas (Figura 6). Las micrografías obtenidas por SEM (Figura 11), permitieron

observar nano vesículas en la superficie de las osteoesferas con tamaños aproximados de 200 a 500 nanómetros, las cuales presentan bordes bien delimitados, de forma redondeada y distribuidas regularmente sobre su superficie en las tres concentraciones y en ambas condiciones. Por otro lado, las imágenes obtenidas por microscopía de luz permitieron identificar estructuras con un posible patrón cristalino de hasta 500nm en el medio (Figura 12). El análisis de EDS muestra la presencia de elementos como C, O y N correspondientes a elementos orgánicos y elementos como Ca y P correspondientes a una posible formación de matriz mineralizante (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis por EDS de una nano vesícula formada sobre la superficie de un osteoesferoide.

Elemento	% Atómico
C	69.07
O	20.67
N	9.64
NA	0.45
P	0.79
S	0.27
Cl	0.08
Ca	0.03
Total:	100%



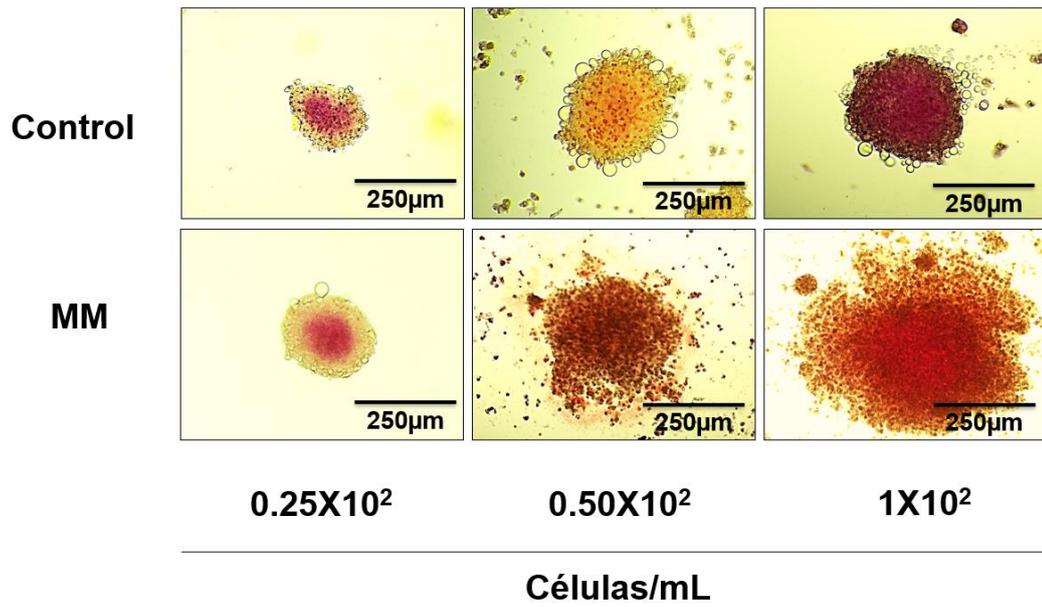


Figura 11. Ensayos de mineralización llevados a cabo por tinción con alizarina roja a los 21 días. MM: medio mineralizante

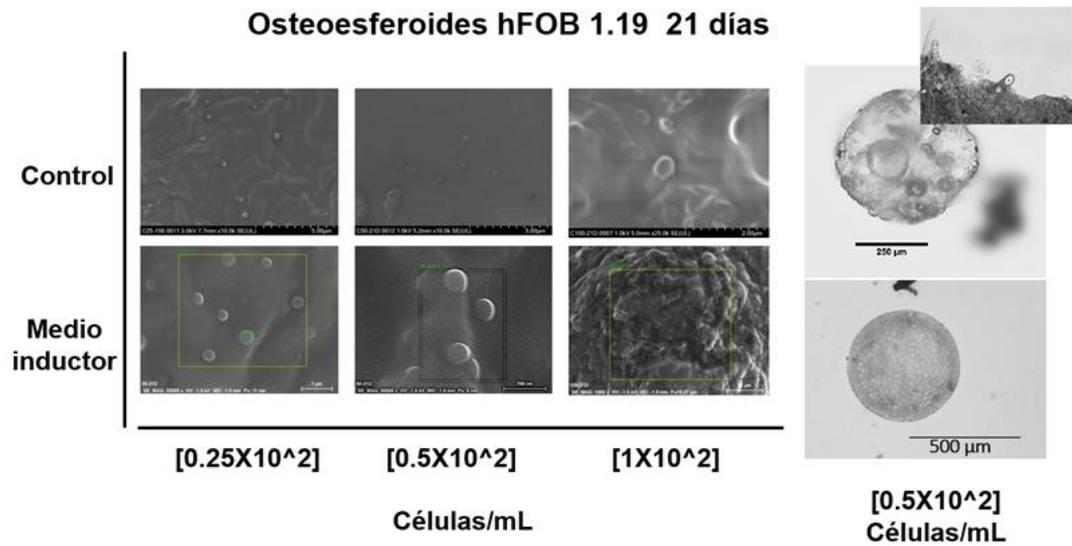


Figura 12. Imágenes obtenidas por Microscopía de Barrido de los osteoesfereoides (control y con medio inductor) utilizando diversas ampliaciones.



12. DISCUSIÓN

Estudios ya realizados utilizan concentraciones celulares mayores tales como $[1 \times 10^3]$ células/mL y $[5 \times 10^4]$ células/mL, evaluando si el incremento en la densidad de células en los esferoides permite mantener la actividad osteogénica a lo largo de un mayor periodo de tiempo. Los resultados muestran que no se genera un modelo continuo y genera efectos sobre la expresión celular (41,42).

Referente a la concentración, no existe un criterio para el protocolo de las condiciones de formaciones de modelos de estudio, depende de la capacidad de proliferación celular, por lo cual se usan indistintamente las concentraciones.

El presente estudio tuvo como objetivo identificar la concentración celular óptima para la formación de cristales de fosfato de calcio en osteoesferas viables a 21 días, evaluando su morfología, viabilidad y capacidad de mineralización en condiciones de medio de cultivo y medio inductor.

Se observó la formación de estructuras esferoidales a partir de las 24 horas en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, se evidenció que la concentración celular influyó significativamente en la homogeneidad y el tamaño de los esferoides. Las osteoesferas generadas a partir de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL mostraron una mayor homogeneidad en su conformación en comparación con las concentraciones más altas de $[0.50 \times 10^2]$ células/mL y $[1 \times 10^2]$ células/mL en las cuales se formaron mayor número de esferoides de mayor tamaño y forma heterogénea, superando los $380 \mu\text{m}$, lo cual podría atribuirse a que las osteoesferas de la concentración mayor formaban osteoesferas por agregación celular. Estudios muestran que esferoides de un tamaño grande presentan patrones irregulares y múltiples esferoides en el mismo pozo. Además, tienden a presentar necrosis e inhibición de la proliferación celular por lo ideal es la formación de esferas de un menor tamaño (43,46,47).

En cuanto a la viabilidad celular a los 21 días se observó positividad en las tres condiciones evaluadas. Sin embargo, en las osteoesferas de



[0.25×10^2] células/mL hubo una discrepancia atribuible a un fallo en la disgregación, lo que pudo influir en la evaluación con azul tripano. Estudios recientes muestran que la senescencia celular puede ser cuantificada por medio de tinción con negro Sudán B, este colorante se usa para teñir la lipofuscina, un producto lisosomal que se acumula dentro de las células después de la disfunción lisosomal, fenómeno que ocurre generalmente en células senescentes. Análisis cuantitativo mostró que esferoides grandes mostraban mayor número de células teñidas aumentó significativamente, lo que sugiere que el tamaño del esferoide puede influir en la senescencia celular. Por otro lado, los niveles de senescencia celular disminuyen en esferoides pequeños en comparación con cultivos 2D y esferoides grandes (46).

A los 21 días, los ensayos de mineralización mostraron diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. Las osteoesferas en concentraciones de [0.25×10^2] células/mL mostraron la formación de centros de mineralización y zonas de proliferación tanto en condiciones control como en medio mineralizante, indicando un equilibrio entre la proliferación celular y diferenciación osteogénica. En contraste, las osteoesferas formadas a partir de concentraciones mayores presentaron una mayor tinción, pero con presencia de centros necróticos y un mayor número de vesículas extracelulares, lo cual es un hallazgo novedoso que sugiere que los centros hipóxicos promueven el depósito de minerales sin la necesidad de inductores osteogénicos. Los resultados obtenidos coinciden parcialmente con estudios previos que destacan la influencia del tamaño de los esferoides en el transporte de nutrientes y la viabilidad celular. Se ha mostrado que esferoides mayores a $450 \mu\text{m}$ muestran un transporte de oxígeno y nutrientes poco difusivo, lo que causa un mayor riesgo de desarrollo de centros hipóxicos y necrosis. (41,44,45)

Las vesículas extracelulares presentes en la superficie de las osteoesferas en las tres concentraciones y condiciones sugieren un posible rol en la mineralización. La identificación de estructuras cristalinas de hasta $500 \mu\text{m}$ en el medio podría significar que las osteoesferas podrían estar



favoreciendo la formación de cristales fuera de su estructura, lo cual podría representar un mecanismo de cristalización asociado con la mineralización extracelular, estos datos los atribuimos a la presencia de iones como Ca, P mostrados en el análisis de EDS. Estos resultados concuerdan con información reciente que habla sobre la secreción de vesículas extracelulares por parte de osteoblastos. Estas vesículas se encuentran envueltas por una membrana plasmática además de contener enzimas, proporcionando un microambiente nutritivo para la nucleación de fosfato de calcio y posterior crecimiento de los cristales. La mineralización comienza cuando un fosfato de calcio cristalino (HAP), aparece dentro de las vesículas, creciendo y finalmente rompiendo la membrana para formar nódulos mineralizados, también conocidos como glóbulos calcificantes (48).

Estos hallazgos muestran la relevancia de la formación de un criterio uniforme en la elección de la concentración celular, ya que una limitación es la comparación directa entre estudios. Las osteoesferas en concentración de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL destacan como una opción prometedora debido a sus resultados positivos en viabilidad, mineralización y homogeneidad en su conformación. Sin embargo, el descubrimiento de la relación entre las condiciones hipóxicas y la mineralización en osteoesferas de mayor tamaño abre nuevas interrogantes.

13. CONCLUSIÓN

Las enfermedades degenerativas óseas, traumas, fracturas y defectos óseos representan un desafío constante. Esto es especialmente cierto en donde el tejido faltante supera la capacidad de formación ósea. El tratamiento estándar para la reconstrucción de los defectos óseos involucra el uso de injertos óseos. Sin embargo, este enfoque está limitado por las fuentes disponibles de injertos y el daño secundario en el sitio donante. En caso de injertos alogénicos, aunque tiene características biológicas y propiedades mecánicas similares a las del hueso autógeno estos conllevan



el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y la posibilidad de rechazo inmunitario. Por esta razón, la bioingeniería de tejidos, a través de esferoides tridimensionales de células mesenquimales, se ha convertido en una alternativa prometedora. Aunque el número de estudios que emplean modelos tridimensionales ha aumentado en los últimos años, una de las principales limitaciones es la falta de información comparativa entre los diferentes enfoques, especialmente en lo que respecta a modelos que utilizan osteoblastos.

El presente estudio permitió identificar la influencia de la concentración celular en la formación, viabilidad y capacidad de mineralización en osteoesferoides a 21 días.

Se demostró que las osteoesferas formadas a partir de $[0.25 \times 10^2]$ células/mL presentaron mayores beneficios, posicionándose como una opción óptima para su uso futuro en bioingeniería de tejidos. Además de obtener un resultado innovador relacionado a la formación de depósitos minerales mayores en condiciones hipóxicas sin la presencia de inductores osteogénicos y la presencia de estructuras cristalinas en el medio.

El impacto de este trabajo en la bioingeniería de tejidos es significativo, ya que proporciona conocimiento innovador para el diseño de osteoesferas para su futuro uso para defectos óseos. Futuros estudios podrían enfocarse en la evaluación funcional de las osteoesferas en modelos preclínicos, con el fin de avanzar hacia su implementación clínica.



1. BIBLIOGRAFÍA

- 1-Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed 2015
- 2-Hernández-Tresguerres, Hernández-Gil I, Alobera-Gracia M, Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. Med. oral patol. oral cir.bucal 2006 Vol 11(1): 47-51
- 3-Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. Biomaterials. 2018 Vol 185:240-75
- 4-Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003 Vol 423(6937):337-42
- 5-Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia A, Canto Pingarrón L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. Medicina oral patología oral 2006 Vol 11(2):151-157.
- 6-El Sayed SA, Nezwek TA, Varacallo MA. Physiology, Bone.: StatPearls Publishing 2024
- 7-Donald W. Buck, Gregory A. Dumanian. Bone Biology and Physiology: Part I. The Fundamentals PRSJournal 2012 Vol 129(6)
- 8-Ott SM. Cortical or Trabecular Bone: What's the Difference? Am J Nephrol. 2018 Vol 47(6):373-375.
- 9-Baskey AL, Coleman R. Aging and Bone J Dent Res 2010 Vol 89(12):1333-1348
- 10-Takehito O, Tomioki N. Oral Bone Biology Journal of Oral Biosciences 2022 Vol 64:8-17
- 11-Mohamed A. An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. Malays J Med Sci. 2008 Vol 15(1):4-12.
- 12-López Valdés F, Vázquez-Sanz C, Victoria Rodríguez I, Forriol F. Mechanical properties variations of immature bone in the earliest stages of development. Elsevier 2024 Vol 63(8):271-279



- 13-Chapurlat R, Confavreux C. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*. 2016 Vol 55(10):1714-25.
- 14-Alcantar-Luna A. Estructura y metabolismo del tejido óseo. *Ortho-tips* 2010 Vol 6(1)
- 15-Klein-Nulend, J., Bacabac, R. G., & Mullender, M. G. Mechanobiology of bone tissue. *Pathologie Biologie* 2005 Vol 53(10):576–580.
- 16-García Garduño M. Reyes Gasga J. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 2006 Vol 9(2):90-95
- 17-Wenguo C, Xiaohong L, Chengying X, Huihui Z, Shaobing Z, Jie W. Hydroxyapatite nucleation and growth mechanism on electrospun fibers functionalized with different chemical groups and their combinations 2010 Vol 31(17): 4620-4629.
- 18-Kuo T-R, Chen C-H. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark Res.* 2017;5(1):18
- 19-Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*. 1996 Vol 317
- 20-Tzavellas AN, Katrilaka C, Karipidou N, Kanari M, Pitou M, Koliakos G, Cheva A, Choli-Papadopoulou T, Aggeli A, Tsiridis E. The “Forgotten” Hydroxyapatite Crystals in Regenerative Bone Tissue Engineering: A Critical Review. *Crystals*. 2024 Vol 14(5):448
- 21-Xin Y, Qi Z, Xinyue M, Yewen Z, Hengni T, Sui M, The mechanism of biomineralization: Progress in mineralization from intracellular generation to extracellular deposition. *Japanese Dental Science Review*. 2023 Vol 59,181-190
- 22-Rhee SH, Lee JD, Tanaka J. Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemical Interaction with Collagen. *Journal of the American Ceramic Society*. 2000 Vol 83: 2890-2892.



- 23-Nancollas GH, Mohan MS. The growth of hydroxyapatite crystals, Archives of Oral Biology. Vol 15(8): 731-745
- 24-Merentes E. Células Madre en la Bioingeniería de Tejidos. 2023 Vol 43(2)
- 25-Mrunal S. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities., Journal of Biomedical Materials Research. 2000 Vol 53(6):617-620
- 26-Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. Arch Med Sci. 2018 Vol 14(4):910-919
- 27-Mueller-Klieser, W. Multicellular spheroids. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1987 Vol 113:101–122.
- 28-de Dios-Figueroa GT, Aguilera-Marquez JdR, Camacho-Villegas TA, Lugo-Fabres PH. 3D Cell Culture Models in COVID-19 Times: A Review of 3D Technologies to Understand and Accelerate Therapeutic Drug Discovery. Biomedicines. 2021; Vol 9(6):602
- 29-Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. Cells. 2019 Vol 8(12):1620
- 30-Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnol. 2014; 14:105.
- 31-Upal Basu R, Basilico C, Mansukhani A. Sphere Formation (Osteosphere/Sarcosphere) Assay. Bio-protocol. 2012 Vol 2(24)
- 32-Gaitán-Salvatella I, López-Villegas EO, González-Alva P, Susate-Olmos F, Álvarez-Pérez MA. Case Report: Formation of 3D Osteoblast Spheroid Under Magnetic Levitation for Bone Tissue Engineering. Front Mol Biosci. 2021 Vol 21(8):672518.
- 33-Asthana, A., and Kisaalita, W. S. (2012). Microtissue Size and Hypoxia in HTS with 3D Cultures. Drug Discov. 2012 Vol 17(15-16): 810–817
- 34-Cuevas-Gonzalez M, Suaste-Olmos F, Cuevas-Gonzalez, Alvarez-Perez M. 3D spheroid cell cultures and their role in bone regeneration: a systematic review. Odovtos. 2022 Vol.24(1)



- 35-Linero M, Doncel A, Chaparro O. Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomédica*. (2014). Vol 34(1): 67-78.
- 36-Takuo K, Takahisa A, Yukari, Teruko TY, Osamu S, An oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) promotes osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells, *Sensors and Actuators.B: Chemical*. 2016 Vol 232(75-83)
- 37-Rumiński S, Kalaszczyńska I, Lewandowska-Szumieł M. Effect of cAMP Signaling Regulation in Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2020 Vol 9(7):1587
- 38-Moritani Y, Michihiko U, Sano K, Nakazawa K. Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Research Gate* .2018 Vol 53(5)
- 39-Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y, Takato T, Ushida T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Vol 26 (11): 254.
- 40-Sánchez Escamilla JL. Esferoides: Unidades Biológicas para la regeneración ósea. Tesis de licenciatura. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2021
- 41-Gaitán-Salvatella I, López-Villegas E, González-Alva P. *et al*. Case Report: Formation of 3D Osteoblast Spheroid Under Magnetic Levitation for Bone Tissue Engineering. *Frontiers*. 2021 Vol 8
- 42-Marozin S, Simon-Nobbe B, Huth A. *et al*. Aggregation of human osteoblasts unlocks self-reliant differentiation and constitutes a microenvironment for 3D-co-cultivation with other bone marrow cells. *Sci Rep* 2023 Vol 14
- 43-McKee C, Chaudhry GR. Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.2017;159:6
- 44-Lin R-Z, Chang H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. octubre de 2008 Vol 3(9-10):1172-84.



45-Mohammed H, Jörgen C. Proliferation and Viability in Cellular Spheroids of Human Origin. *Cancer Res* (1978) Vol 38 (5): 1457–1464.

46-Rovere M, Reverberi D, Arnaldi P, Federica-Palama M, Gentili C. Spheroid size influences cellular senescence and angiogenic potential of mesenchymal stromal cell-derived soluble factors and extracellular vesicles *Bioeng. Biotechnol.* 2023 Vol 11

47-Restle L, Costa-Silva D, Stellet E, Freitas-Bachinski R, Batista A, Ribeiro-Linares A, Gomes-Alves G. *A 3D Osteoblast In Vitro Model for the Evaluation of Biomedical Materials* Wiley 2015

48-Hasegawa T, Yamamoto T, Tsuchiya E, Hongo H, Tsuboi K, Kudo A, Abe M, Yoshida T, Nagai T, Khadiza N, Yokoyama A, Oda K, Ozawa H, Luiz de Freitas P, Li M, Amizuka N. Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Japanese Dental Science Review.* 2017 Vol 53(2):34-45