



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

ESFEROIDES: UNIDADES BIOLÓGICAS PARA LA  
REGENERACIÓN ÓSEA

**TRABAJO TERMINAL ESCRITO DEL PROGRAMA DE  
TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANO DENTISTA**

P R E S E N T A:

JOSÉ LUIS SÁNCHEZ ESCAMILLA

Vo. Bo.

TUTORA: Dra. SILVIA MALDONADO FRÍAS  
ASESOR: Dr. HERIBERTO ABRAHAM VALENCIA GONZÁLEZ



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 / DEDICATORIAS**

A lo largo de mi formación académica, la odontología se ha convertido en mi pasión y estoy profundamente agradecido de finalmente estar concluyendo esta etapa profesional. Fue un gozo para mi poder cursar todas sus asignaturas, gracias antes que nada a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Gracias a mis padres Yolanda Escamilla Loeza y José Sánchez Rosas, que me han dado su apoyo incondicional. Soy el fruto de su encuentro, soy todo lo que me dejaron y lo que he construido con eso. Gracias.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Doctora Silvia Maldonado Frías, una excelente profesionista y persona, que ha dedicado su trayectoria académica a las ciencias médicas. Le agradezco por su trabajo y sus conocimientos, pero sobre todo por su gentileza y sencillez, y el haberme dedicado el tiempo para poder realizar este trabajo. Gracias.

Gracias al Doctor Heriberto Abraham Valencia González por haber asesorado este trabajo, por su tiempo, conocimientos y atención.

Este trabajo se realizó en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología en el laboratorio de Bioingeniería de tejidos. Agradecemos al Dr. Marco Antonio Álvarez y al Dr. Alejandro García Carrancá las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta investigación.

*Al forjador de mi camino, al que me acompaña y siempre me levanta de mi continuo tropiezo.*

## RESUMEN

Los avances en la medicina siguen generando impacto en la vida media de los seres humanos, pero datos recientes indican un crecimiento en el número de pacientes con enfermedades y lesiones que afectan los sistemas esquelético y muscular, lo que ha aumentado significativamente el número de procedimientos quirúrgicos invasivos que afectan al hueso. La medicina regenerativa es una disciplina amplia que incorpora la ingeniería de tejidos a través de la investigación y el conocimiento de las ciencias biomédicas donde el uso del cultivo celular tridimensional (3D) es prometedor en la terapia de vanguardia. Este trabajo propone el desarrollo de esferoides con la finalidad de ser utilizados como tratamiento en terapia médica para la regeneración de tejidos y órganos afectados por diversas enfermedades.

Se realizaron cultivos en suspensión para obtener esferoides de osteoblastos a diferentes concentraciones y observar el comportamiento de estos cultivos a 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días, e identificar la mejor condición para realizar ensayos de mineralización. La viabilidad celular de los esferoides se cuantificó mediante exclusión con azul tripano y se llevaron a cabo ensayos clonogénicos para determinar el efecto del medio mineralizante en la formación de estas estructuras. La formación de nódulos mineralizados fue detectada mediante tinción con alizarina roja. Finalmente, los esferoides se embebieron en parafina y se obtuvieron secciones (4-5  $\mu\text{m}$ ) y se depositaron en portaobjetos, para su posterior tinción con hematoxilina y eosina.

Los datos muestran que altas concentraciones celulares de cultivo en suspensión para los primeros días de tratamiento generó grandes esferoides por coagregación celular, pero no por crecimiento clonal,  $5 \times 10^2$  células/mL es la mejor condición para el desarrollo clonogénico en los esferoides a tiempos largos como 21 días, sin embargo, la viabilidad celular de estos depende del tiempo y disminuye hasta un 70% en el último día de

prueba. En los ensayos clonogénicos, se observan diferencias tanto en la morfología como en el número de colonias con el medio inductor. Los esferoides a los 7 y 14 días muestran zonas con alta intensidad de tinción con alizarina roja sugiriendo que estas estructuras están formando deposiciones de calcio. Finalmente, las secciones teñidas con hematoxilina y eosina mostraron estructuras esferoides en formas celulares organizadas concéntricas y subestructuras celular bien definida como núcleos y citoplasma. El desarrollo de estos osteo-esferoides es prometedor. Los avances futuros en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos nos permitirán ofrecer alternativas de terapia personalizada, donde se pueden tomar células troncales mesenquimales (MSC) del paciente para dirigirlas hacia un linaje celular que favorezca el tipo de tejido a regenerar.

## ABSTRACT

Advances in medicine had impacted the average lifetime of humans, but recent data indicate an increase in the number of patients with diseases and injuries affecting the skeletal and muscular systems, which has significantly increased the number of invasive surgical procedures affecting the bone. The regenerative medicine is a broad discipline that incorporates tissue engineering through research and knowledge of biomedical sciences where the use of three-dimensional (3D) cell culture is promising in the vanguard therapy. This work proposes the development of spheroid culture as therapies fort involve the regeneration of tissues and organs affected by various diseases.

Were perform spheroid culture in suspension with osteoblast a different concentration to observe the behavior of these three-dimensional culture at 1, 3, 5, 7, and 14 days, and identify the best condition for mineralization assay. The cell viability of spheroid culture was quantified by trypan blue exclusion. The clonogenic assay was used to know the effect of inductor culture medium of mineralized nodules in the colony formation. The detection of nodules in these spheroid structures was made by alizarin red assay. Finally, the spheroid cultures were paraffin-embedded, and sections (4-5  $\mu\text{m}$ ) were obtained and deposited onto slides the, for later hematoxylin & eosin staining.

The data showed that in high cell concentration of the suspension culture for the first days of treatment, were generated big spheroid structures by congregate cells but not by clonal growing,  $5 \times 10^2$  cells/mL is the best condition for development clonogenic of spheroid cultures at long time as 21 days, but the cell viability of spheroid structures is time depended decreasing up to 70% in the last day of test. In the clonogenic assays, the differences are observed in the shape and number of spheroid structures with the inductor culture medium and these structures at 7 and 14 day showed intensity greeted of staining with alizarin red, suggesting calcium deposition in these conditions. Finally, the sections with hematoxylin & eosin

staining showed spheroid structures in concentric organized cell shapes and cellular substructures well defined as nuclei and cytoplasm.

The development of this osteo-spheroids is promising. Future advances in the field of regenerative medicine and tissue engineering will allow us to offer personalized therapy alternatives, where mesenchymal stem cells (MSCs) can be taken from the patient to direct them towards a cell lineage that favors the type of tissue to be regenerated.

**Keywords;** Spheroids, three-dimensional culture, mineralized nodules, bone regeneration, stem cell.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
2.1. Epidemiología	13
<b>3. TEJIDO ÓSEO</b>	<b>15</b>
3.1. Composición	15
3.1.1. Osteoblastos	16
3.1.2. Osteocitos	17
3.1.3. Células de revestimiento óseo	17
3.1.4. Osteoclastos	18
3.1.5. Matriz ósea	18
3.2. Remodelación y regeneración	19
3.3. Biomarcadores de regeneración	19
<b>4. NUEVAS PROPUESTAS EN MEDICINA REGENERATIVA</b>	<b>23</b>
4.1. Ingeniería de tejidos	24
4.1.1. Cultivo celular	24
<b>5. MODELOS TRIDIMENSIONALES (3D)</b>	<b>26</b>
5.1. Esferoides	26
5.2. Diferencias entre cultivo 2D y 3D	27
5.3. Microambiente dentro de los esferoides	28
5.4. Osteo-esferoides	29
<b>6. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>31</b>
<b>7. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>31</b>
<b>8. HIPÓTESIS</b>	<b>32</b>
<b>9. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>

<b>10. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>10.1. Materiales</b>	<b>32</b>
<b>10.1.1. Línea celular</b>	<b>32</b>
<b>10.1.2. Reactivos</b>	<b>33</b>
<b>10.1.3. Materiales</b>	<b>33</b>
<b>10.1.4. Equipo</b>	<b>33</b>
<b>10.2. Métodos (ensayos <i>in vitro</i>)</b>	<b>33</b>
<b>11. RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>12. DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>13. CONCLUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>14. PERSPECTIVAS</b>	<b>46</b>
<b>15. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47</b>
<b>16. ANEXOS</b>	<b>52</b>

## ABREVIATURAS

- ALP.** Fosfatasa alcalina.
- BMP.** Proteínas morfogenéticas óseas.
- BSPII.** Sialoproteína ósea.
- CATK.** Catepsina K.
- CMOp.** Células mesenquimales osteoprogenitoras.
- Col I.** Colágena I.
- CTM.** Célula troncal mesenquimatosa.
- C2D.** Cultivos bidimensionales.
- C3D.** Cultivos tridimensionales.
- Dlx5.** Homeobox distal 5.
- FN.** Fibronectina.
- G.F.** Factor de crecimiento.
- IE.** Índice de envejecimiento.
- IGF-1.** Factor de crecimiento de insulina 1.
- M-CSF.** Factor estimulante de colonias de macrófagos.
- MMP-9.** Metaloproteínasa de la matriz 9.**OCN.** Osteocalcina.
- OCN.** Osteocalcina.
- ON.** Osteonectina.
- OP.** Osteopontina.
- Osx.** Osterix.
- Sema4D.** Semaforina 4D.
- Sema3A.** Semaforina 3<sup>a</sup>.
- SIVEPAB.** Sistema de vigilancia epidemiológica de patologías bucales.
- TRAP.** Fosfatasa acida tártaro resistente.
- UMB.** Unidad multicelular básica.
- .

## GLOSARIO

**Célula troncal.** Aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas. Pueden clasificarse según su potencial de diferenciación.

**Cicatrización.** Es la reparación de una herida con tejido fibroso mediante un proceso biológico complejo resultado de movimiento, división y síntesis proteica celular, lo cual genera un producto final de tejido no funcional denominado cicatriz.

**Cultivo tridimensional (3D).** Técnica de cultivo celular con ambiente creado artificialmente, en el cual células biológicas se les permite crecer o interactuar con su entorno en las tres dimensiones.

**Cultivo celular.** Proceso mediante el que células, ya sean células procariontas o eucariotas, pueden cultivarse en condiciones controladas.

**Esferoides.** Modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia natural a agregarse que muestran muchos tipos celulares, para crear masas multicelulares de forma esferoidal, que son objeto de cultivo in vitro.

**Factor de crecimiento.** Moléculas las cuales, la mayoría son de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular.

**Ingeniería de tejidos.** Campo de la medicina que aplica principios de medicina regenerativa para restablecer la función de varios órganos al combinar células con biomateriales.

**Matriz extracelular.** Representa una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo. Constituye un filtro biofísico de protección, nutrición e inervación celular y el terreno para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular.

**Medicina regenerativa.** La medicina regenerativa es un campo de la medicina que incluye la ingeniería de tejidos, incorpora la investigación sobre auto curación, donde el cuerpo usa sus propios sistemas, algunas veces con el uso de algún biomaterial.

**Microambiente.** En el ámbito de la biología, son las células, moléculas y estructuras (como los vasos sanguíneos) que rodean y sostienen otras células y tejidos.

**Organoide.** Estructura celular tridimensional proveniente de un tejido que mimetiza las características de origen.

**Regeneración.** Proceso por el que se recupera la estructura y la función de órganos o partes del cuerpo dañados.

**Tejido mesenquimal.** Tejido mesenquimal, genéricamente denominado mesénquima, es el tejido del organismo embrionario, de conjuntivo laxo: con una abundante matriz extracelular, compuesta por fibras delgadas y relativamente pocas células.

**Tejido óseo.** Tejido especializado del tejido conjuntivo, constituyente principal de los huesos en los vertebrados.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los avances en medicina han incrementado el promedio de vida de los seres humanos, generando una pirámide poblacional en nuestro país que indica que el número de adultos mayores está incrementando más respecto a otros grupos poblacionales. Datos recientes indican un incremento en la cantidad de individuos con un diagnóstico de enfermedades y traumatismos que afectan al sistema musculo esquelético, lo cual ha incrementado significativamente el número de procedimientos quirúrgicos invasivos que afectan al hueso.

La medicina regenerativa es una amplia disciplina, que incorpora la ingeniería de tejidos a través de la investigación y el conocimiento de las ciencias biomédicas donde el uso de células o biomateriales son utilizados para la reproducción celular y regeneración de tejidos. En la ingeniería de tejidos, el cultivo celular se emplea con la finalidad de obtener linajes celulares en un medio artificial para su análisis.

En la mayoría de las investigaciones biomédicas predomina el uso de cultivos bidimensionales (2D) debido a que es una técnica confiable para simular el crecimiento y desarrollo de los indistintos linajes celulares, sin embargo, recientemente se ha mostrado un interés creciente en tener cultivos celulares que imiten las características estructurales y fisiológicas de los tejidos de estudio. El cultivo celular tridimensional (3D) es uno de ellos, tiene la ventaja que el crecimiento celular se da en condiciones donde las células se encuentran suspendidas, favoreciendo modelos esferoidales que arquitectónicamente simulan las características de crecimiento y proliferación de los tejidos como sucede en el cuerpo humano. Esta nueva propuesta de cultivo es prometedora y alentadora para el desarrollo de nuevas terapéuticas que involucren la regeneración de tejidos y órganos afectados por las patologías asociadas al sistema óseo.

El trabajo continuo en esta línea de investigación es alentador, en un futuro los avances en el campo de la medicina regenerativa e ingeniería de

tejidos nos permitirá ofrecer alternativas de terapia personalizada, donde se podrán tomar CTM del paciente para encaminarlas hacia un linaje celular a favor del tejido que se quiera regenerar.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Epidemiología.

Datos recientes indican un incremento en la cantidad de individuos con un diagnóstico de enfermedades y traumatismos que afectan al sistema musculo esquelético, los cuales son considerados como un grave problema de salud pública, debido a su magnitud, impacto y trascendencia. (1–3)

Las proyecciones demográficas indican que la esperanza de vida en México incrementará de 75.34 a 76.97 años en 2030. En género, los hombres enfrentan una menor esperanza de vida que las mujeres: para 2030, esta cifra apunta 74.64 años para ellos, y la esperanza de vida de ellas es de 79.41 años (**Fig. 1**). (4)



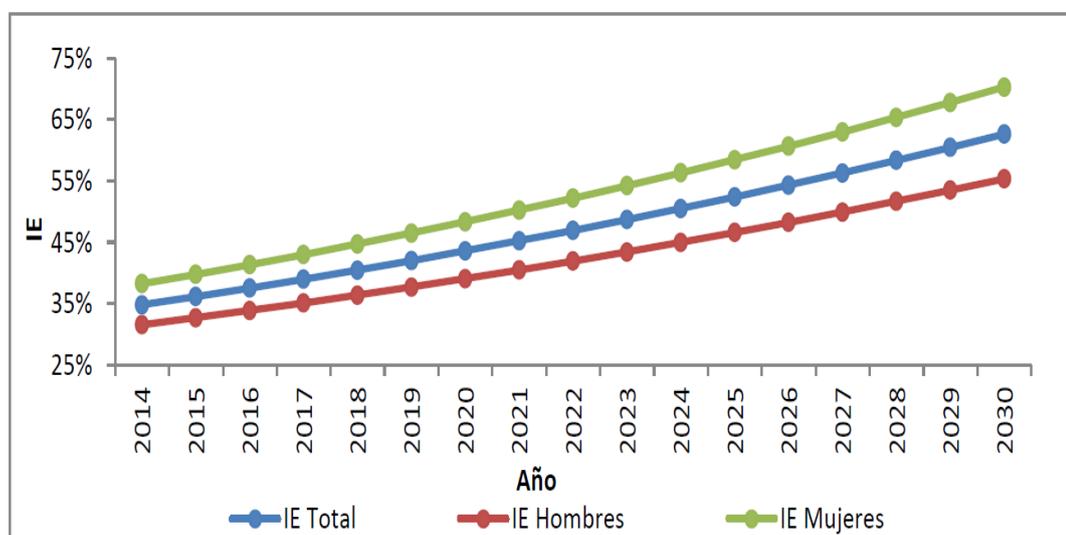
Fuente: elaboración de la Dirección General de Análisis y Prospectiva con información de las Proyecciones de Población del CONAPO.

**Figura 1.** Esperanza de vida en la población en México. Tomado de SIVEPAB 2019.

El aumento de la esperanza de vida se asocia al progreso científico y tecnológico, así como al mejoramiento de las condiciones de desarrollo y bienestar en la población; además, junto con la disminución de la tasa de

natalidad, traerá consigo un incremento en el envejecimiento de la población. Este fenómeno demográfico ha tenido una importante repercusión sobre el sistema sanitario, en algunos servicios médicos y quirúrgicos debido a la alta prevalencia de procesos crónicos y degenerativos (enfermedades cardiovasculares, respiratorias, metabólicas, etc.). (5)

De acuerdo con los datos de las proyecciones poblacionales del consejo nacional de población (CONAPO), el índice de envejecimiento (IE) se incrementará notablemente. En 2014 el IE indicaba que en el país había 35 adultos mayores por cada cien menores de 15 años, cifra que aumentaría a 63 en 2030. Para la población masculina, el índice de envejecimiento aumentará en casi 24 puntos porcentuales, de 31.54% a 55.32%. En el caso de las mujeres la variación es mayor ya que por cada cien menores de 15 años en 2030 habrá 70 mujeres mayores, en comparación con las 38 registradas en 2014 (**Fig. 2**). (5)



Fuente: elaboración de la Dirección General de Análisis y Prospectiva con información de las Proyecciones de Población del CONAPO.

**Figura 2.** Índice de envejecimiento en la población 2014-2030. Tomado de SIVEPAB 2019.

La mayoría de los conocimientos actuales sobre los mecanismos asociados a las patologías que involucran al tejido óseo (osteoporosis, periodontitis, y artrosis) se ven relacionadas directamente con la edad del

paciente, y se considera que la estructura inadecuada de este tejido constituye un factor de riesgo primordial en la pérdida de masa y calidad de este, lo que trae como consecuencia un aumento de la incidencia de fracturas. (4,5)

Es en la tercera edad donde el balance del metabolismo óseo se inclina hacia la reabsorción y una limitada capacidad regenerativa de los tejidos, por lo tanto, existen daños extensos y factores de riesgo como malos hábitos, neoplasias y defectos óseos ya sea por enfermedades degenerativas o secuelas post quirúrgicas. Según se ha reportado por el sistema de vigilancia epidemiológica de patologías bucales (SIVEPAB) en México, la tendencia a degeneración ósea como la atrofia de los maxilares es característica de adultos mayores que padecen de edentulismo, consecuente a su situación son portadores de prótesis la cual puede contribuir a la degeneración del reborde alveolar la cual podrá tornarse en algún momento incapacitante. (4,5)

Tras la problemática demográfica expuesta, es imperativo el desarrollo de tecnologías eficaces que promuevan la regeneración ósea, cuyo producto sea un tejido anatómico y funcionalmente idéntico al anterior. Esta premisa ha representado la base para el desarrollo de cultivos que mimeticen tanto la estructura y función del tejido, para el desarrollo y aplicación de distintas terapias de vanguardia.

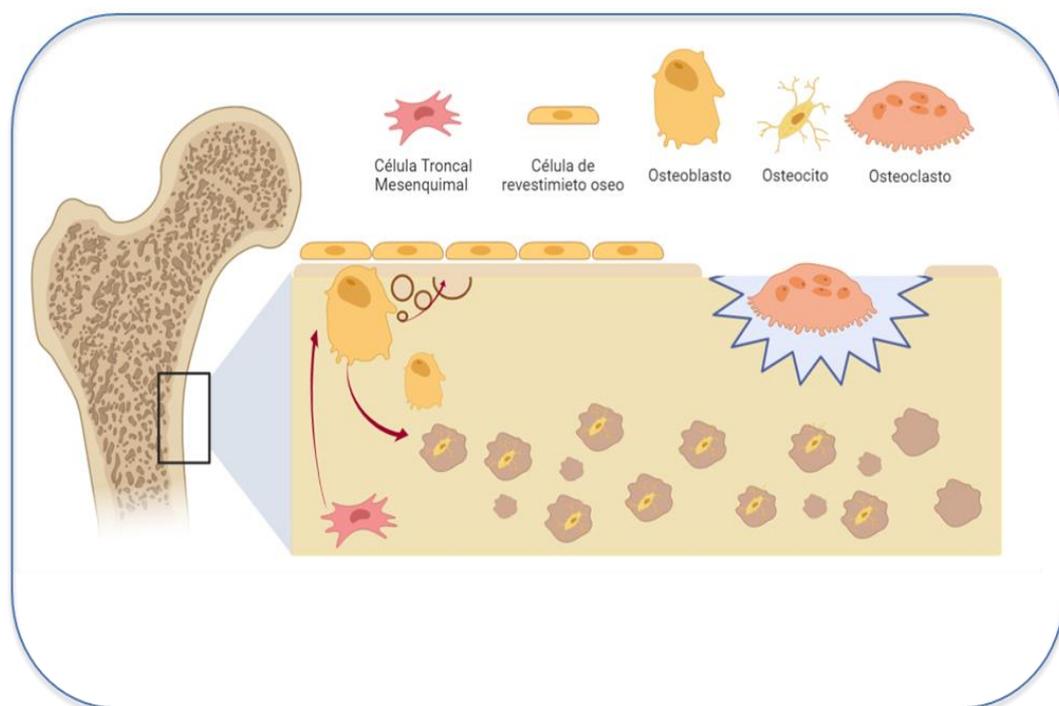
### **3. TEJIDO ÓSEO**

#### **3.1. Composición**

El hueso está compuesto por tejido conectivo especializado mineralizado proveniente del mesodermo, así como otros tejidos derivados del mesénquima embrionario, incluidos el tejido hematopoyético y el tejido adiposo, en el también encontramos vasos sanguíneos y nervios. Como parte esencial del sistema musculo esquelético, ejerce funciones

importantes en el cuerpo como soporte, protección de órganos, la locomoción y almacenamiento de minerales como calcio y fosfato. (6,7)

El tejido óseo exhibe cuatro tipos de células en una estrecha relación con su matriz mineralizada: osteoblastos, células de revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos (**Fig.3**). Estas, le darán la propiedad de ser un órgano altamente dinámico que es continuamente reabsorbido por osteoclastos y nuevamente formado por osteoblastos. (6,7)



**Figura 3.** Las células del tejido óseo tienen una estrecha relación con su matriz mineralizada: célula troncal mesenquimal, osteoblastos, células de revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos. Biorender (8).

### 3.1.1. Osteoblastos

Los osteoblastos son células cuboidales ubicadas a lo largo de la superficie ósea y comprenden del 4 al 6% del total de células óseas residentes las cuales muestran características morfológicas de las células sintetizadoras de proteínas, que incluyen abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi prominente, así como varias vesículas

secretoras. Su función principal es secretar la matriz orgánica sin mineralizar (osteóide) hacia la matriz ósea. (6,7,9)

### **3.1.2. Osteocitos**

Los osteocitos, son las células más abundantes y longevas, con una vida útil de hasta 25 años. Comprenden un 90 a 95% del total de las células óseas. Se encuentran dentro de lagunas rodeadas por una matriz ósea mineralizada, donde su morfología difiere según el tipo de hueso, por ejemplo, los osteocitos del hueso trabecular son más redondeados que los del hueso cortical, donde muestran una morfología alargada, mientras que los osteocitos del cortical muestran una morfología dendrítica. (6,7,9,10)

Al final de un ciclo de formación ósea, una subpoblación de osteoblastos se convierte en osteocitos incorporados en la matriz ósea. Una vez que el osteocito madura y su cuerpo celular se encuentra dentro de una laguna, sus procesos citoplasmáticos cruzan pequeños túneles que se originan en el espacio de estos llamados canalículos, formando el sistema lacunocanalicular donde se comunicarán con otros similares, así como a procesos citoplasmáticos de osteoblastos y células de revestimiento óseo. (6,7,9,10)

### **3.1.3. Células de revestimiento óseo**

Las células de revestimiento óseo son células alargadas y aplanadas las cuales revisten a la superficie ósea cuando el hueso no se encuentra en la fase de formación ni resorción. Muestran pocos signos de actividad sintética como lo demuestra su contenido de orgánulos, sin embargo, son considerados osteoblastos. Al cubrir la superficie ósea, la protegen de cualquier actividad reabsorbente de los osteoclastos. Pueden reactivarse para formar osteoblastos. (7,10)

### **3.1.4. Osteoclastos**

Los osteoclastos son células multinucleadas diferenciadas terminalmente, que se originan a partir de células mononucleares del linaje hematopoyético. Migran de la medula ósea a un sitio óseo específico o pueden permanecer como células mononucleares para constituir a un grupo precursor para su reclutamiento futuro.(9–11)

Tras su maduración, los osteoclastos son activados mediante señales, que lo dirigen a realizar su función principal, la reabsorción dentro del proceso de remodelado óseo. El osteoclasto, se polariza y responde ante interacciones moleculares que, lo preparan a la resorción ósea mediante la modificación de sus filamentos de actina dentro de su citoesqueleto para formar una unión estrecha con la superficie ósea y su membrana basal, ambas forman un compartimento hermético (laguna de Howship). (11,12)

### **3.1.5. Matriz ósea**

Está constituida por materia orgánica la cual contiene proteínas colágenas en un 90%, predominantemente colágeno tipo I, y proteínas no colágenas, incluidas osteocalcina (OCN), osteonectina (ON), osteopontina (OP), fibronectina (FN), sialoproteína ósea II (BSP II), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factores de crecimiento (GFs), proteoglicanos ricos en leucina como decorina, biglucano, lumican y proteínas séricas. La materia inorgánica de la matriz está constituida predominantemente en iones fosfato y calcio que forman por un proceso de nucleación los cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), existen también otros elementos presentes en cantidades significativas como el bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio. Junto con el colágeno, las proteínas de la matriz no colágena forman un andamio para el depósito de hidroxiapatita, dicha

asociación es responsable de la rigidez y resistencia típicas del tejido óseo. (6,7,9)

### **3.2. Remodelación y regeneración**

El hueso tiene la capacidad de regeneración como parte del proceso de remodelación continua en respuesta al desarrollo esquelético a lo largo de la vida y de reparación en respuesta de alguna lesión. La regeneración ósea se compone de una serie de procesos biológicos que involucran a diferentes linajes celulares y vías de señalización molecular tanto intracelulares como extracelulares. (12,13)

Aunque los procesos de reparación normalmente restauran el órgano esquelético dañado a su composición celular, estructura y función biomecánica previas a la lesión, cabe señalar que los daños críticos a este no sanarán normalmente. (13).

Durante el proceso de regeneración, la remodelación ósea interviene con una serie de fases y células que tendrán como función principal orquestar una serie de eventos coordinados de señalización en los cuales intervendrán osteocitos, osteoblastos, células de revestimiento y osteoclastos, los cuales tendrán como objetivo regular la expresión de proteínas colágenas y no colágenas para formar una adecuada matriz orgánica y procesos de nucleación de cristales de hidroxapatita. (14,15)

### **3.3. Biomarcadores de regeneración**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en coordinación con las Naciones Unidas y la Organización Internacional del Trabajo, ha definido un biomarcador como "cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda medirse en el cuerpo o sus productos e influir o predecir la incidencia del resultado o enfermedad ". (14)

En el hueso, es en la matriz ósea donde se encuentran las biomoléculas resultantes de la constante actividad celular, estas biomoléculas tienen un papel importante en la regulación de diferenciación celular, actividad de factores de crecimiento y homeostasis del tejido en general (**Tabla 1**). (15,16)

**Tabla 1.** Proteínas de la MEC implicadas en la formación y regeneración ósea y otros tejidos mineralizados y su ubicación. (15-22)

Proteína	Localización fisiológica	Función biológica
Fibronectina (FN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hueso y otros tejidos conectivos.</li> <li>Fluidos corporales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adhesión, crecimiento, migración y diferenciación de células.</li> <li>Involucrado en la formación de hueso.</li> <li>Diferenciación de <b>osteoblastos</b>.</li> </ul>
Colágeno tipo I (Col-I)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hueso, tendón, piel, ligamentos, córnea.</li> <li>Tejidos intersticiales (a excepción del cartílago hialino, el cerebro y el cuerpo vítreo).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regulación de los fenotipos de células óseas.</li> <li>Define las propiedades biomecánicas relativas a la carga, la resistencia a la tracción y la rigidez a la torsión.</li> <li>Diferenciación de <b>osteoblastos</b>.</li> </ul>
Osteonectina (ON)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hueso.</li> <li>Matriz pericelular que rodea a los osteoblastos y los osteocitos</li> <li>Riñón.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diferenciación y supervivencia de los <b>osteoblastos</b>.</li> <li>Inhibición de la adipogénesis.</li> <li>Regula el diámetro de las fibrillas de colágeno.</li> <li>Difusión celular.</li> <li>Fibrilogénesis de colágeno.</li> <li>Unión de Ca<sup>2+</sup> e hidroxapatita.</li> </ul>
*Osteocalcina (OCN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Matriz extracelular de áreas de hueso recién formado, es decir, en la región subperióstica.</li> <li>Osteoide de formación de hueso, sintetizada por <b>osteoblastos</b>.</li> <li>Riñón.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recambio óseo.</li> <li>Regula los <b>osteoclastos</b>.</li> <li>Inhibe la formación de hueso.</li> <li>Unión de calcio.</li> </ul>
Sialoproteína ósea (BSP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hueso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mineralización de matriz.</li> <li>Diferenciación, adhesión y función de osteoblastos y osteoclastos.</li> <li>Estimula la resorción ósea inducida por osteoclastos.</li> <li>Promoción de la angiogénesis.</li> <li>Media la unión celular.</li> </ul>
Osteopontina (OPN)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hueso.</li> <li>Riñón.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promueve la <b>resorción ósea</b> (diferenciación osteoclastos).</li> <li>Unión con hidroxapatita.</li> <li>Apoya la adhesión de las células óseas a la matriz mineralizada.</li> <li>Inhibición del crecimiento de cristales.</li> <li>Inhibe la mineralización.</li> </ul>

Fosfoproteína ácida 1 de matriz de dentina ( <b>DMP1</b> )	• Hueso y dentina.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unión de Ca<sup>2+</sup></li> <li>• Inicio de la nucleación de hidroxapatita cristalina.</li> <li>• Montaje de matriz de dentina.</li> <li>• Marcador de <b>osteocitos</b> robusto.</li> <li>• Regula el metabolismo del fosfato.</li> <li>• Involucrado en la función de los osteocitos.</li> </ul>
Fosfatasa alcalina ( <b>ALP</b> )	• Hueso • Hígado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Marcador de actividad osteoblastos y actividad hepática.</li> <li>• <b>Principal indicador de actividad osteoblástica.</b></li> <li>• Presencia en saliva y fluido crevicular es indicativo de la inflamación y/o destrucción de tejidos periodontales.</li> </ul>
Procolágeno 1 propéptido terminal N ( <b>P1NP</b> )	• Hueso • Suero	• Proteína sintetizada por <b>osteoblastos y fibroblastos</b> , indicador de la deposición (temprana) de colágeno tipo 1 sin embargo su presencia en suero está relacionada con actividad de <b>osteoclastos</b> .
Procolágeno tipo 1 propéptido terminal C ( <b>P1CP</b> )	• Hueso • Suero	• Proteína sintetizada por <b>osteoblastos y fibroblastos</b> , indicador de la deposición (temprana) de colágeno tipo 1.
Esclerostina	• Hueso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicoproteína, producida por el gen SOST su expresión está relacionada con <b>osteocitos, cementocitos y condrocitos.</b></li> <li>• Reduce la formación ósea.</li> </ul>

\*El biomarcador por excelencia para osteoblastos es la osteocalcina (OCN). En cavidad oral se han realizado estudios con fosfatasa alcalina ósea (ALP) la cual ha resultado ser de gran utilidad para evaluar el metabolismo óseo. (16–21)

Se ha revisado la liberación de factores celulares (biomarcadores) estándar liberados durante la regeneración ósea. La regeneración ósea comienza inmediatamente después de la lesión e implica una cascada de eventos celulares en los que las CTM responden a una variedad de estímulos reguladores donde proliferan se diferencian y sintetizan la MEC.(17,18)

Recientemente se ha buscado la asociación en la expresión de estos marcadores de tejidos mineralizados con el linaje de CTM SOX2 y OCT4, los cuales son necesarios para evaluar su potencial de diferenciación como células osteoprogenitoras. (17,18)

Para la formación de hueso impulsada por la osificación endocondral, algunos factores bioquímicos deben estar presentes en momentos específicos de la diferenciación de condrocitos a osteoblastos, estos incluyen Sox9, Sox5, Sox 6, FGF-3, BMPs, entre otros. (17,19,22)

Cuando los huesos largos ya están formados, se liberan BMP-2,3,4,5 y 7 en el pericondrio donde BMP 2 y 6 son producidas por condrocitos hipertróficos y BMP 7 por condrocitos proliferativos. Se ha demostrado que, para una formación ósea exitosa, los condrocitos hipertróficos deben expresar altos niveles de fosfatasa alcalina (ALP), osteonectina (ON), osteopontina (OP), sialoproteína ósea (BSP) y osteocalcina (OCN). (18–20)

Los factores de crecimiento pueden regular diferentes pasos dentro de la regeneración ósea. Estudios recientes confirman que las funciones reguladoras del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) se encuentran dentro de este proceso (**Tabla 2**). (19–21)

**Tabla 2.** Biomoléculas relacionadas con el metabolismo óseo. (17, 20-21)

Biomolécula	Relacionado a formación ósea	Relacionado a resorción ósea
<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	<b>BMP-2</b> <b>BMP-4</b> <b>BMP-6</b> <b>BMP-7</b>	Induce a las células mesenquimales para diferenciación en osteogénesis y cartílago.
	<b>IGF-I</b> <b>IGF-II</b>	Promueve la proliferación celular cartilaginosa y la síntesis de su matriz celular.
	<b>TFG-B</b>	Mejora la capacidad de inducción ósea de las BMPs.
		<b>TNF</b> <b>EGF</b> <b>PDGF</b> <b>FGF-23</b> <b>M-CSF</b> <b>GM-CSF</b>
		Inducen diferenciación y proliferación de osteoclastos.
		Inhiben síntesis de colágeno, OCN.
		Inhiben síntesis de colágeno de fibroblastos y proteoglicanos del cartílago.

	<b>FGF</b>	Estimula la proliferación y diferenciación de células endoteliales vasculares, células del tejido óseo y formación de tejido de granulación.	
	<b>PDGF</b>	Promueve la diferenciación de las células óseas, induce síntesis de colágena tipo I por osteoblastos maduros. Acelera la formación de hueso.	
<b>CITOCINAS</b>			<b>IL-1</b> <b>IL-6</b> <b>IL-8</b> <b>IL-11</b>  <b>IFN-K</b> <b>IL-4</b>
			Promueven resorción ósea.  Inhiben la síntesis de colágeno tipo I y la actividad de ALP.  Inhiben resorción ósea.
<b>GENES</b>	<b>Runx 2</b> <b>Osx</b> (osterix) <b>Col1A1</b> <b>BSB</b> <b>BGLAP</b> <b>OCN</b>	Implicados en la diferenciación de CTM a osteoblastos.	

\*Regulan diversas vías incluyendo proliferación y diferenciación de osteoclastos y osteoblastos.

#### 4. NUEVAS PROPUESTAS EN MÉDICINA REGENERATIVA

La medicina regenerativa o ingeniería de tejidos es un campo relativamente nuevo que utiliza células vivas, materiales biocompatibles y factores bioquímicos (por ejemplo, factores de crecimiento) y físicos (por ejemplo, carga mecánica cíclica) adecuados, así como combinaciones de estos, para crear estructuras similares a tejidos. Con mayor frecuencia, su objetivo principal es la implantación de estas construcciones de tejido en el

cuerpo para reparar una lesión o reemplazar la función de un órgano defectuoso. (23,24)

El termino medicina regenerativa es utilizado a menudo como sinónimo de ingeniería de tejidos, sin embargo, la medicina usualmente implica el uso de células troncales (stem cells).(23)

Hoy en día, la medicina regenerativa se enfoca al desarrollo del soporte vital extracorpóreo especializado en sistemas que contienen células (por ejemplo, hígado y riñón bioartificiales), así como unidades de tejido que se pueden utilizar para cribado diagnóstico. Además de sus aplicaciones clínicas, otros usos incluyen pruebas de fármacos para eficacia y toxicología, así como estudios básicos sobre el desarrollo y morfogénesis de tejidos. (23,24)

#### **4.1. Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo proporcionar técnicas alternativas para la regeneración de tejidos. Actualmente, esta disciplina tiene tres principios básicos aplicados normalmente para este fin: (1) el uso de andamios en forma de un biomaterial diseñado para imitar las propiedades físicas de la matriz extracelular del tejido, al tiempo que proporciona apoyo funcional para iniciar formación tisular, (2) el cultivo de células en la superficie de andamios para adherir y colonizar el área a regenerar *in vitro* / *in vivo* y (3) la provisión de factores de crecimiento para dirigir el destino celular a través de la proliferación y diferenciación. (25)

##### **4.1.1. Cultivo celular**

El cultivo celular se refiere a métodos de laboratorio mediante el cual se toman células provenientes de un tejido animal o vegetal colocándolas en un medio de crecimiento dentro de un ambiente artificial. Estas células pueden ser directamente removidas de un tejido o disgregadas mediante

mecanismos enzimáticos o mecánicos antes de su cultivo o estas pueden provenir de líneas celulares ya establecidas. (25)

Su origen se puede encontrar a principios del siglo XX cuando se introdujo para estudiar el crecimiento y la maduración de los tejidos, la biología de virus, el desarrollo de vacunas, el papel de los genes en la enfermedad y la salud, hasta llegar a el uso de líneas celulares híbridas a gran escala para generar productos farmacéuticos. (24,26)

Las aplicaciones experimentales son tan diversas como los tipos de células que pueden cultivarse *in vitro*, sin embargo, en un contexto clínico, el cultivo celular está comúnmente relacionado con la creación de sistemas modelo que estudian la biología celular básica, replican los mecanismos de la enfermedad o investigan la toxicidad de nuevos compuestos farmacológicos. Una de las ventajas de utilizar el cultivo celular para estas aplicaciones es la viabilidad de manipular genes y rutas moleculares.(26)

Es común que, en un cultivo celular, las células se propagan como una monocapa en placas de cultivo de plástico bidimensionales (2-D) y, a menudo, requieren materiales indefinidos o xenogénicos que incluyen, entre otros, sustratos de unión, citocinas y factores de crecimiento, así como suero. Este tipo de cultivo se ha utilizado para la diferenciación dirigida de CTM en muchas células especializadas, incluidas las células del linaje óseo. Sin embargo, el cultivo 2-D a menudo resulta en una falta de derivados funcionales. Los estudios también han demostrado que el cultivo en monocapa 2-D no reproduce con precisión la fisiología, y, en general, sus condiciones carecen de complejidad necesaria para imitar microambientes tridimensionales dinámicos y especializados, responsables de la regulación del destino de las células *in vivo*. La escasa previsibilidad de los cultivos en monocapa 2D y su falta de precisión al momento de reflejar la complejidad *in vivo* de los sistemas biológicos suelen citarse como uno de los principales factores que contribuyen al costo de desarrollo de investigación. (27,28)

## **5. MODELOS TRIDIMENSIONALES (3D)**

Tradicionalmente, los cultivos celulares en modelos bidimensionales son utilizados por su fácil mantenimiento y bajo costo en cuanto a la realización de ensayos de rutina, desafortunadamente en este método de cultivo, las interacciones célula-célula, así como célula-MEC no son representativas como lo estrían *in vivo* sin mencionar la pérdida de la polaridad tras su crecimiento adherente lo cual cambia significativamente su respuesta ante procesos de comunicación. La comunicación celular es responsable de la diferenciación, proliferación, viabilidad y la expresión de genes y proteínas, por lo tanto, las alteraciones que presentan las células en modelos bidimensionales y sus desventajas han sido motivo de la implementación de modelos de cultivo alternativos. (27–29)

### **5.1. Esferoides**

La generación de esferoides se basa en el principio básico común del autoensamblaje. Durante el desarrollo embrionario, las células se someten a un autoensamblaje biológico para formar tejidos complejos con arquitectura 3D y contactos intensivos entre células. Estos contactos son importantes para mantener las funciones intracelulares ya que es el microambiente contiene una distribución específica de oxígeno, nutrientes y metabolitos además de proveer señales que activan mecanismos de señalización cruciales para una respuesta celular específica, con la finalidad de mantener la homeostasis y preservar la vida. (30,31)

Los esferoides imitan los procesos naturales que ocurren durante la embriogénesis, morfogénesis y organogénesis. Por lo tanto, estos pueden imitar las características arquitectónicas y funcionales del tejido a reproducir; por ejemplo, se ha reportado que los esferoides de los cardiomiocitos laten con un ritmo similar al del corazón. (32,33)

## 5.2. Diferencias entre cultivo 2D y 3D

El cultivo celular en 3-D basado en esferoides es una técnica en donde no son utilizados andamios, en comparativa con el cultivo celular 2-D, los cultivos de esferoides se asemejan más a los microambientes del tejido fisiológicos en varios aspectos. Se ha reportado incremento en la expresión de biomarcadores en cultivos 3-D lo que lleva a una comunicación celular más eficaz y facilita la señalización intercelular (**Tabla 3**). (32,34)

**Tabla 3.** Comparación entre modelos de cultivo en monocapa 2D y 3D. (28-30, 32)

Tipo de cultivo	Monocapa 2D	Esferoide 3D
<b>Tiempo de formación de cultivo</b>	• Minutos a horas	• Horas a días
<b>Calidad de cultivo</b>	• Ensayos de rutina. • Alto rendimiento. • Reproducibilidad, cultivo a largo plazo. • Fácil interpretación	• No uso en ensayos de rutina • Escaso rendimiento y reproducibilidad. • Compleja interpretación.
<b>Complejidad</b>	• Baja; fácil uso	• Media
<b>Capacidad de imitación de estructuras <i>in vivo</i></b>	• No imita estructura natural de tejido.	• Reproduce calidad de tejido <i>in vivo</i> en forma esferoidal 3D.
<b>Interacción-comunicación celular</b>	• Nula comunicación intercelular. • Nula comunicación célula-MEC.	• Presencia de comunicación celular. • Presencia de comunicación célula-MEC.
<b>Presencia de microambiente</b>	• Nulo	• Presente
<b>Características morfológicas de las células</b>	• Morfología modificada. • Fenotipo y polaridad diverso.	• Morfología conservada. • Fenotipo y polaridad diversos

<b>Acceso a compuestos esenciales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acceso limitado a oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización.</li> <li>• Diferente a <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acceso variable oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización.</li> <li>• Similar a <i>in vivo</i></li> </ul>
<b>Mecanismos moleculares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios en expresión génica y proteica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión génica y proteica similar a <i>in vivo</i>.</li> </ul>
<b>Costo de mantenimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Económica, menos tiempo, amplia gama de pruebas disponibles en el mercado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Más cara, requiere más tiempo, menos pruebas disponibles comercialmente.</li> </ul>

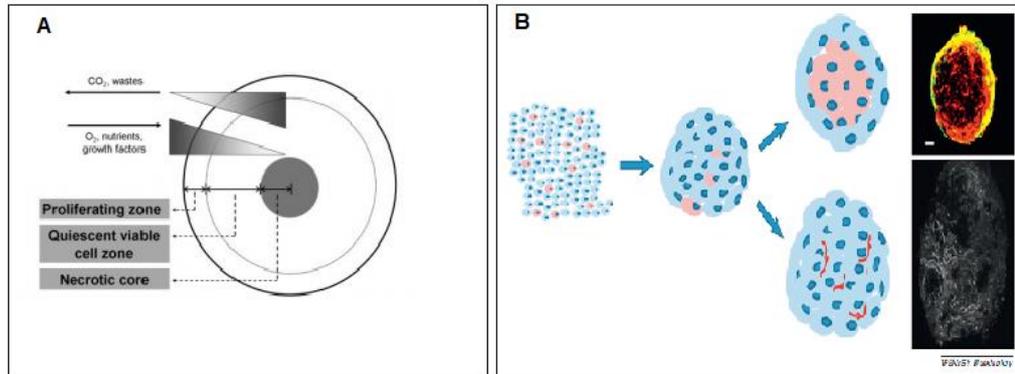
Cabe mencionar que las células en cultivos tridimensionales se mantienen comunicadas entre ellas y con proteínas de la matriz extracelular en todas dimensiones a diferencia de las células cultivadas en monocapa (2D). Esto mantiene un mayor contacto intercelular y favorece a que la matriz extracelular actúe como andamio y modulador de crecimiento, proliferación y diferenciación celular. (32,34)

Este microambiente es de gran relevancia ya que funciona como medio de señalización bioquímica y acoplamiento intercelular que influye en la forma celular, motilidad, proliferación y diferenciación, así como expresión de biomarcadores. (34)

### 5.3. Microambiente dentro de los esferoides

Existen varios reportes que indican los cambios que se suceden en los modelos tridimensionales. Algunos autores indican que estas estructuras avasculares tiene limitaciones de difusión particularmente O<sub>2</sub> en estructuras de hasta 200  $\mu\text{m}$  incluso se indica que hay un transporte masivo ineficiente conduciendo a la acumulación de desechos metabólicos por lo que un tamaño superior a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro suele mostrar una estructura en forma de capa que comprende un núcleo necrótico rodeado por un borde viable, que consta de una capa interna de células inactivas o quiescentes y una capa externa de células en proliferación, sin embargo en otras

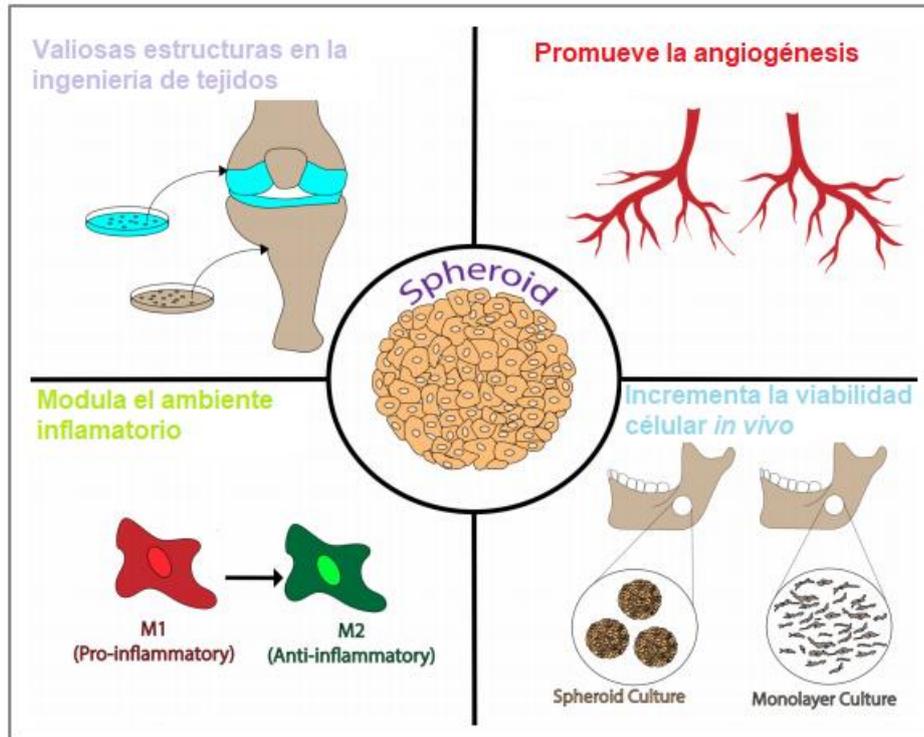
propuestas se observa el cocultivo con células endoteliales creando un ambiente que favorece la microvasculatura (**Fig. 4**). (35–38)



**Figura 4.** Microambiente del esferoide. A. Se muestran tres zonas en los esferoides, proliferación, quiescencia y centro necrótico. B Se muestran un cocultivo celular mostrando en la caricatura esferoidal en color rojo el desarrollo de vasos endoteliales y microfotografía del esferoide con una imagen de infrarrojo mostrando en amarillo la viabilidad celular. Tomada y modificadas de Lin, RZ. y Chang, HY (2008) y Fennema E., et al. (2013).

#### 5.4. Osteo-esferoides

El estudio para la ingeniería de tejido óseo basado en el uso de células como alternativas viables a los injertos óseos, materiales sintéticos y enfoques farmacológicos incrementa día a día. En comparación con las células individuales, la agregación de células en esferoides da como resultado una mayor viabilidad celular, junto con un mayor potencial proangiogénico, antiinflamatorio y de formación de tejidos (**Fig. 5**). Además, el trasplante de células utilizando materiales de ingeniería permite la entrega localizada en el sitio objetivo al tiempo que brinda la oportunidad de guiar el destino celular *in situ*, lo que resulta en mejores resultados terapéuticos en comparación con la inyección sistémica o localizada. (39)



**Figura 5.** Los esferoides son estructuras valiosas en la formación de tejidos. Secretan niveles aumentados de factores tróficos proangiogénicos, muestran un potencial inmunomodulador y exhiben una mayor viabilidad y persistencia celular. Tomado y modificado de Gionet-Gonzales MA. and Leach K (2018).

A pesar de que existe datos que muestran las limitaciones de estas estructuras tridimensionales, los avances recientes muestran que son una propuesta prometedora y de vanguardia. En el campo de la regeneración ósea, se ha demostrado que los esferoides tienen una diferenciación osteogénica acelerada *in vitro* en comparación con el cultivo en monocapa, se ha observado que los osteoblastos sufren un complejo proceso de diferenciación en el que las células cambian su morfología fibroblastoide a una forma cuboidal y comienzan a producir matriz extracelular típica del tejido óseo, con colágeno tipo I y varias proteínas específicas como OP y OC. (32,34)

En modelos tridimensionales, se ha reportado aumento en la osteogénesis, tanto *in vivo* como *in vitro*, en comparativa con los cultivos bidimensionales, debido a las interacciones en el microambiente ya

mencionadas. Se ha reportado que en este microambiente la diferenciación osteogénica, maduración y mineralización son procesos presentes y prometedores dentro de este tipo de cultivo. (32,34)

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las enfermedades óseas son una constante en adultos mayores, estas están asociadas a múltiples factores de riesgo y afectan al 80% de la población mundial. La homeostasis e integridad de los tejidos de soporte son importantes para el adecuado funcionamiento del organismo, no obstante, los factores de riesgo contribuyen a la degeneración y pérdida inoportuna del tejido.

El número de pacientes de la tercera edad que proyecta nuestra pirámide poblacional incrementará considerablemente en los próximos años y el incremento en la presencia de enfermedades óseo-degenerativas en estos grupos etarios, generan un problema de salud pública que tendrá un impacto importante en el sistema de salud nacional, por lo que el desarrollo de propuestas de vanguardia para el tratamiento de estas enfermedades es imperativo.

## **7. JUSTIFICACIÓN**

Si bien la medicina regenerativa ha permitido el avance e innovación de diversas terapéuticas dentro de la regeneración de tejidos, la biomedicina aún no ha logrado tener terapias predictivas y exitosas en su totalidad en dichos procesos.

La propuesta actual se dirige al uso de células con características de troncalidad y estructuras tridimensionales que mimeticen completamente el microambiente que se orchestra en los procesos de regeneración. Contar con la tecnología tridimensional de vanguardia que permita reproducir un ambiente anatómico-fisiológico *in vitro* personalizado, nos dará mayor fidelidad en el comportamiento de los tejidos ante las

diferentes terapéuticas, con lo cual se puede tener una alternativa de tratamiento más eficaz y ofrecer a los pacientes tratamiento predictivos sobre los procesos de regeneración.

## **8. HIPÓTESIS**

Si la línea establecida de osteoblastos hFOB 1.19 se crece en condiciones de suspensión, entonces será capaz de formar esferoides que sirvan de modelos de estudio en los procesos de regeneración ósea.

## **9. OBJETIVOS**

General

- Identificar las condiciones de cultivo para generar esferoides como modelos de estudio para la regeneración ósea.

Específicos

- Caracterizar la formación de esferoides dependientes del tiempo y la concentración celular en la línea de osteoblastos hFOB 1.19.
- Determinar la viabilidad celular de los esferoides.
- Identificar el efecto del medio inductor de nódulos mineralizados en la formación de esferoides.
- Observar la conformación celular al interior de las esferas.

## **10. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **10.1. Materiales**

#### **10.1.1. Línea celular**

Línea celular hFBO3 obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

### 10.1.2. Reactivos

Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) y Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12). suero fetal bovino (SBF), sustituto de suero, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), glutamina, tripsina-EDTA, Azul tripano 4%, diaminobencidina (Invitrogen, Carlsbad CA); PBS 1X (0.14 M NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% (w/v) pH 7.3) (Gibco, Thermo Fisher Scientific); β-glicerofosfato (10mM) + ácido ascórbico (50 µg/ml), alizarina roja, triton (Sigma Aldrich Corporation Chicago); paraformaldehído (Científica Senna, S.A. de C.V). Entellan® | 107960 (Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Alemania).

### 10.1.3. Materiales

Placas de 100 mm x 20 mm y 96 pozos, adherentes y de baja adherencia, tubos clínicos de 15 mL, puntas para micropipeta (1000, 100, 10 µL), tubos eppendorf (1.5 y 0.5 mL) pipetas (1, 2, 5 y 10 mL) (Corning Incorporated ®, Corning, NY, USA); laminillas y cubreobjetos (Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Alemania).

### 10.1.4. Equipo

Micropiteas Unicanal (0.5-10, 0.5-2, 10-100, 100-1000) (Olab); Prepipeta (Termifisher scientific); balanza analítica 120g-0.001g/PW124) (Clay Adam); pHmetro (Hanna); Agitador orbital, cámara de Neubauer (Boeco, Imlab.); campana de flujo laminar (Biobase); incubadora (New Brunswick), microscopio invertido.

## 10.2. Métodos (Ensayos *in vitro*).

**Cultivos en monocapa.** Se utilizó una línea celular establecida de osteoblastos (hFOB), utilizando placas de 100 mm x 20 mm, que permiten la adhesión de las células a la superficie (Corning Incorporated®, Corning, NY, USA), con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM),

suplementados con 10% de suero bovino fetal incubando a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos en estas condiciones se denominan cultivos en monocapa o cultivos heterogéneos (2D).

**Ensayo de formación esferoides.** A partir de los cultivos en monocapa de la línea celular hFBO3 confluentes en un 75% se obtiene una suspensión de células en PBS 1X. Se colocarán células viables y adecuadamente disgregadas por mililitro (mL) de medio, en una placa de 96 pozos de baja adherencia. El medio para crecimiento celular consistió en Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), suplementado con factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y suplementos. Los cultivos se incubaron a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron 5X10<sup>2</sup>, 1X10<sup>3</sup>, 2X10<sup>3</sup>, 3X10<sup>3</sup>, 4X10<sup>3</sup>, 6X10<sup>3</sup>, 8X10<sup>3</sup> y 10X10<sup>3</sup> células/mL para determinar qué concentración favorece la eficiencia de formación de esferas a los días 1, 3, y 5 de crecimiento. Para los ensayos asociados a procesos de mineralización se sembraron 5X10<sup>2</sup>, 1X10<sup>3</sup>, 2X10<sup>3</sup>, 3X10<sup>3</sup>, 4X10<sup>3</sup>, 6X10<sup>3</sup> células/mL a los 3, 7, 14 y 21 días. Para ambos ensayos se evaluó el tamaño de las esferas formadas, mediante la adquisición de imágenes que se analizaron con el programa ImageJ.

**Ensayo de viabilidad celular por exclusión de azul tripano.** A partir de cultivos de esferoides se obtiene una suspensión celular disgregada de hFBO3. Para ello el cultivo de esferoides fue colocado en tubos y se centrifugo 5 min a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante y concentrado celular se lavó con tampón de fosfato salino PBS 1X en tres ocasiones. El concentrado celular es suspendido en PBS 1X y se tomaron 20 µL y 20 µL de azul de tripano y se colocaron en un tubo eppendorf. Se realizó conteo celular, utilizando una cámara de Neubauer (BOECO, IMLAB). Para observar la distribución celular viable en los esferoides, estos se concentraron por centrifugación y se sometieron a tinción con azul tripano. El conteo celular y la distribución de la viabilidad, por exclusión de azul tripano de los esferoides, se observó bajo microscopio invertido.

**Ensayo clonogénico.** Para determinar el efecto del medio mineralizante en la formación de esferoides, la formación de colonias de la línea celular hFBO3 se realizó para monitorear el crecimiento independiente de anclaje en condiciones basales y con medio mineralizante. Se preparó una solución 1:1 de agar al 6% y al 1% en DMEM 2X y DMEM 2X +  $\beta$ -glicerofosfato (10mM) + ácido ascórbico (50  $\mu$ g/ml) (medio mineralizante), suplementados con 10% SBF. Inicialmente se colocó agar al 6% como base en cajas de 6 pozos, posteriormente se preparó el agar semilla (agar al 1%) sembrando  $5 \times 10^2$  células/mL. En ambas condiciones los cultivos se dejaron crecer 3, 7 y 14 días y se agregó medio cada tercer día, según cada condición del ensayo. Al final de los ensayos se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta al 0.05%. Se contaron manualmente las esferas formadas en 3 campos diferentes por cajas de 6 pozos observadas a 4X en un microscopio invertido.

**Ensayos de mineralización.** Para los ensayos de cultivos bidimensionales (control), se colocaron cajas de 6 pozos y se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo. Se crecieron en DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal y se esperó hasta la confluencia del 70 al 80 %. Se llevaron a cabo tratamientos durante 3, 7 y 14 días con medio basal o medio mineralizante (DMEM +  $\beta$ -glicerofosfato [10mM] + ácido ascórbico [50  $\mu$ g/ml] + 2% SBF). En el caso de los cultivos tridimensionales se sembraron  $5 \times 10^2$  células/mL bajo las condiciones anteriormente descritas para formar esferoides y también se trataron con medio basal o medio mineralizante durante 3, 7 y 14 días, adicionando medio cada tercer día. Los cultivos se incubaron a 37 °C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado el tiempo de tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 10 minutos y se realizó la tinción con una solución de alizarina roja al 2% durante 2 horas a temperatura ambiente para visualizar la deposición de calcio en la matriz extracelular. Posteriormente, se realizaron lavados con buffer de fosfato salino y finalmente con agua desionizada. Se tomaron las imágenes en microscopio invertido.

**Tinción Hematoxilina & Eosina (H&E).** Para observar disposición y características celulares de las osteo-esferas, a partir de cultivos bidimensionales se sembraron  $5 \times 10^2$  células/mL bajo las condiciones anteriormente descritas para formar esferoides y también se trataron con medio basal o mineralizante durante 3, 7 y 14 días, adicionando medio cada tercer día. Los cultivos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y un 5% de  $\text{CO}_2$ . Terminado el tiempo de tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%. Terminado el tratamiento se lavaron durante 3 ocasiones con PBS 1X. Posteriormente, se colocaron en una matriz de agar al 1% para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes de  $4\ \mu\text{m}$  y se tiñeron con H&E. Las laminillas se montaron con Entellan® para ser observadas al microscopio invertido.

**Análisis estadístico.** Los datos presentados corresponden a la media  $\pm$  error estándar del número de observaciones ( $n=3$ ). Las comparaciones estadísticas se realizaron por la prueba ANOVA seguido por el análisis de Tukey-Kramer o Fisher utilizando Excel. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

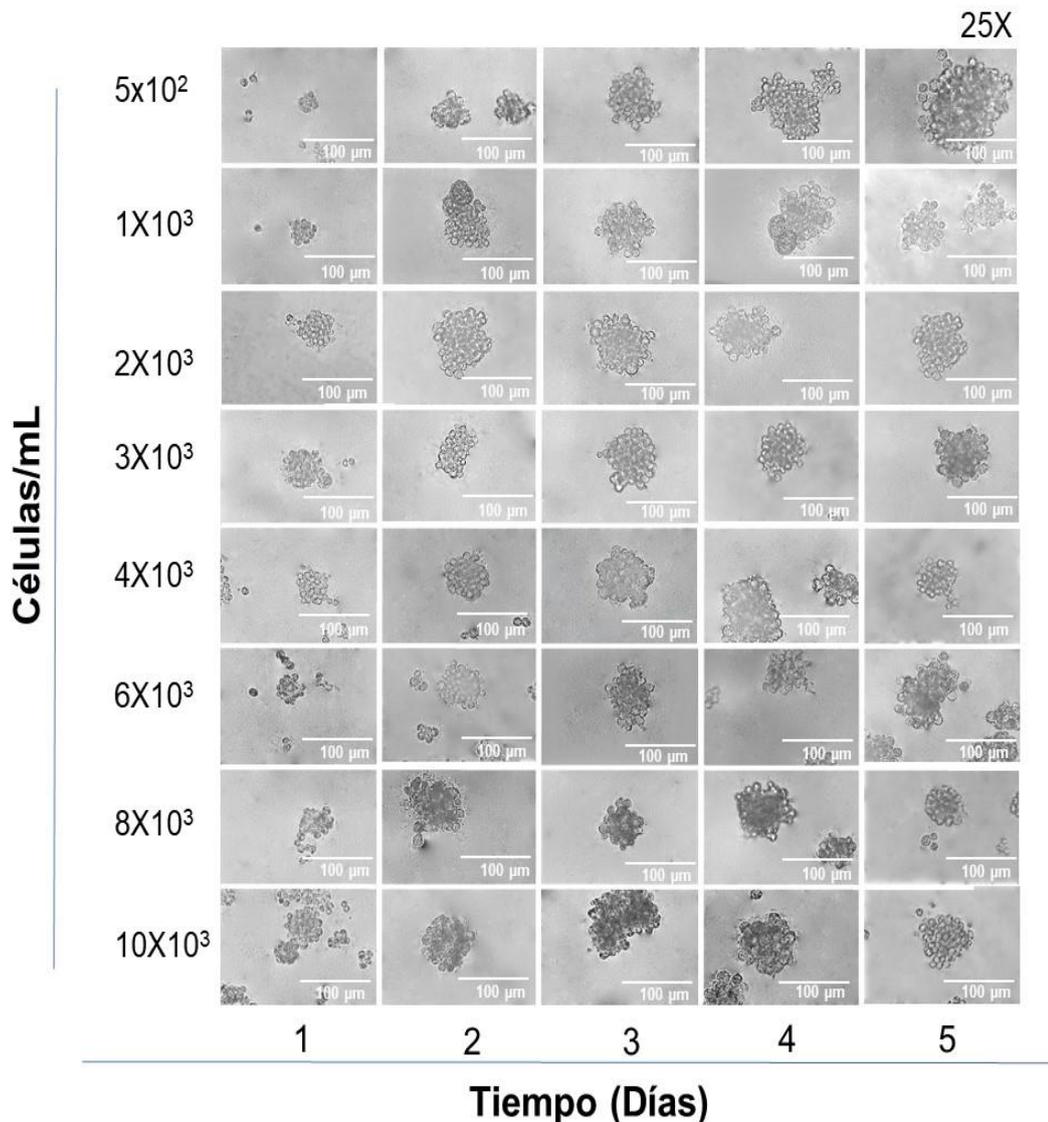
## 11. RESULTADOS

### Formación de esferoides de la línea celular hFOB 1.19

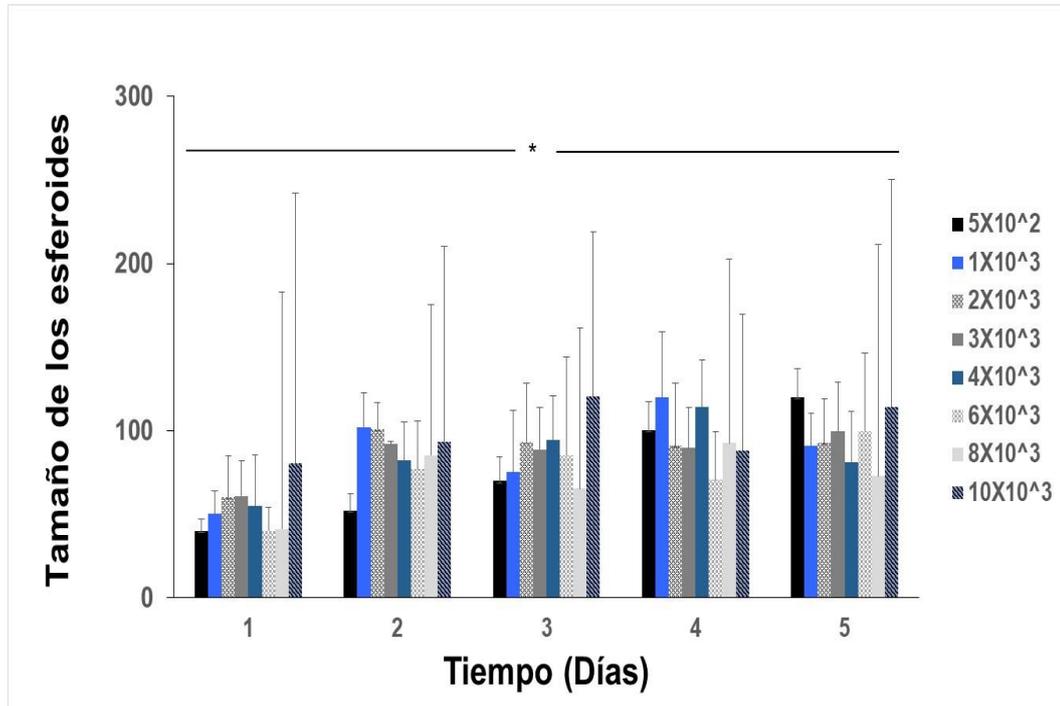
Para poder determinar la concentración de células ideal para las formaciones de esferoides de osteoblastos, primero se observó las características de crecimiento de esta la línea celular, los datos mostraron que estas células en condiciones de adherencia forman monocapa, homogéneas, estables y viables. Bajo condiciones de cultivo en suspensión, forman estructuras esferoidales a partir de las 24 horas y estos varían de tamaño según la condición del ensayo (**Fig. 6**).

El resultado de las mediciones de los esferoides mostró que a concentraciones de  $5 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^3$  y  $6 \times 10^3$  células/mL hay una mayor homogeneidad en el tamaño de estas estructuras. Mientras

que las condiciones de cultivo con concentraciones mayores de  $8 \times 10^3$  y  $10 \times 10^3$  células/mL muestran esferoides de mayor tamaño que rebasan los  $170 \mu\text{m}$  debido a la coagregación celular, además de presentar también estructuras que no pasan de los  $80 \mu\text{m}$ , siendo estos cultivos muy heterogéneos. (**Fig. 7**). Estos datos indican que el número de células es determinante para observar la formación de esferoides y que para esta línea celular las concentraciones menores son las indicadas para la formación de esferas por crecimiento clonal.



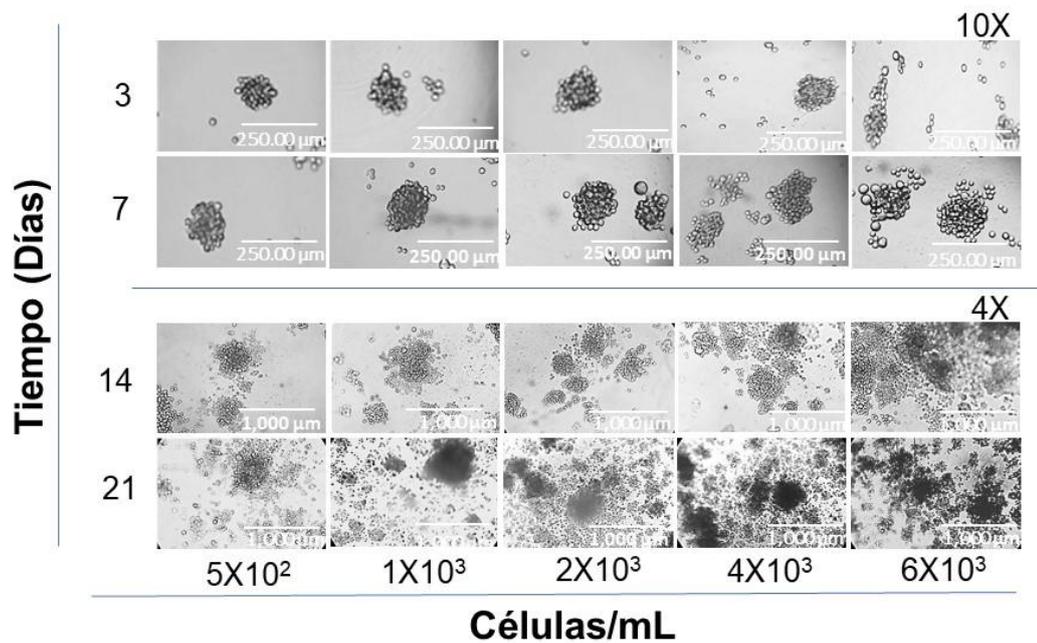
**Figura 6.** Fotomicrografía (25X) de la formación de esferoides de las líneas celulares hFOB 1.19. (osteoblastos) a diferentes concentraciones celulares durante 5 días. Cada imagen representa esferoides individuales de los experimentos por triplicado.



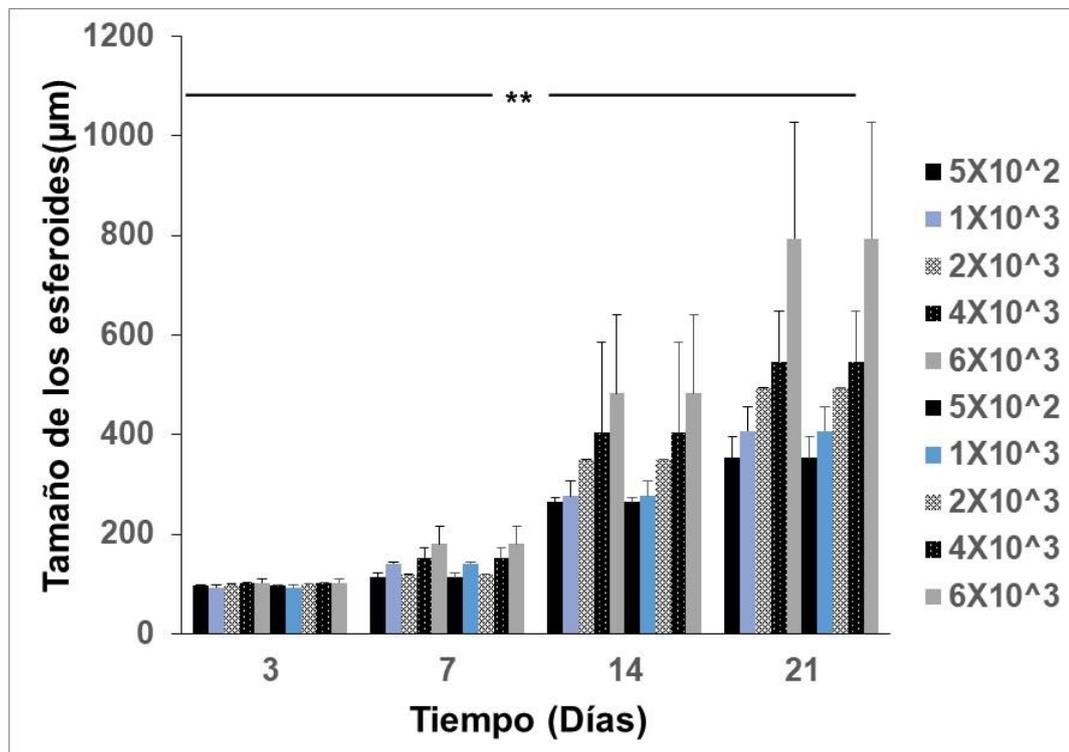
**Figura 7.** El tamaño de las esferas fue determinado usando el programa ImageJ y tomando el diámetro de estas para el análisis a lo largo del ensayo. Los datos son presentados como la media  $\pm$  ES (n=3). Los asteriscos indican las diferencias significativas (\* $p < 0.05$ ) determinadas por la prueba de ANOVA y con post hoc de Tukey.

Los ensayos de formación de esferoides se llevaron a cabo a 3, 7, 14 y 21 días con la finalidad de determinar la condición ideal para realizar ensayos de mineralización. Los esferoides a 3 y 7 días muestran estructuras más homogéneas en concentraciones de hasta  $6 \times 10^3$  células/mL. Para los días 14 y 21 es claro el crecimiento de la población celular y la formación de coagregados, generando esferoides de gran tamaño que saturan el cultivo (**Fig. 8**).

El análisis de las mediciones de los esferoides indica que a partir del día 7 en concentraciones de  $6 \times 10^3$  células/mL empieza a observarse esferas de distintos tamaños y esto incrementa a los 14 y 21 días, incluso desde concentraciones de  $1 \times 10^3$  células/mL (**Fig. 9**) Los datos sugieren que las concentraciones de  $5 \times 10^2$  células/mL son más homogéneas y estables a lo largo del tiempo.

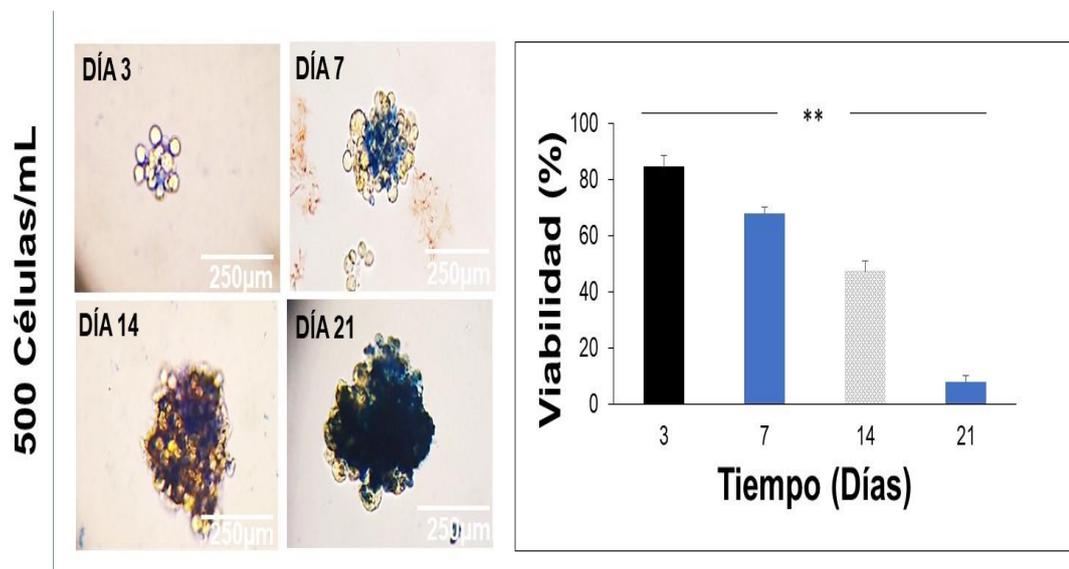


**Figura 8.** Fotomicrografía (10X y 4X) de la formación de esferoides de las líneas celulares hFOB 1.19. (osteoblastos) a diferentes concentraciones celulares durante 3,7,14 y 21 días. La imagen representa el experimento por triplicado.



**Figura 9.** El tamaño de las esferas fue determinado usando el programa ImageJ y tomando el diámetro de estas para el análisis a 3, 7, 14 y 21 días. Los datos son presentados como la media  $\pm$  ES (n=3). Los asteriscos indican las diferencias significativas  $**$ ( $p < 0.01$ ) determinada por la prueba de ANOVA y con post hoc de Tukey.

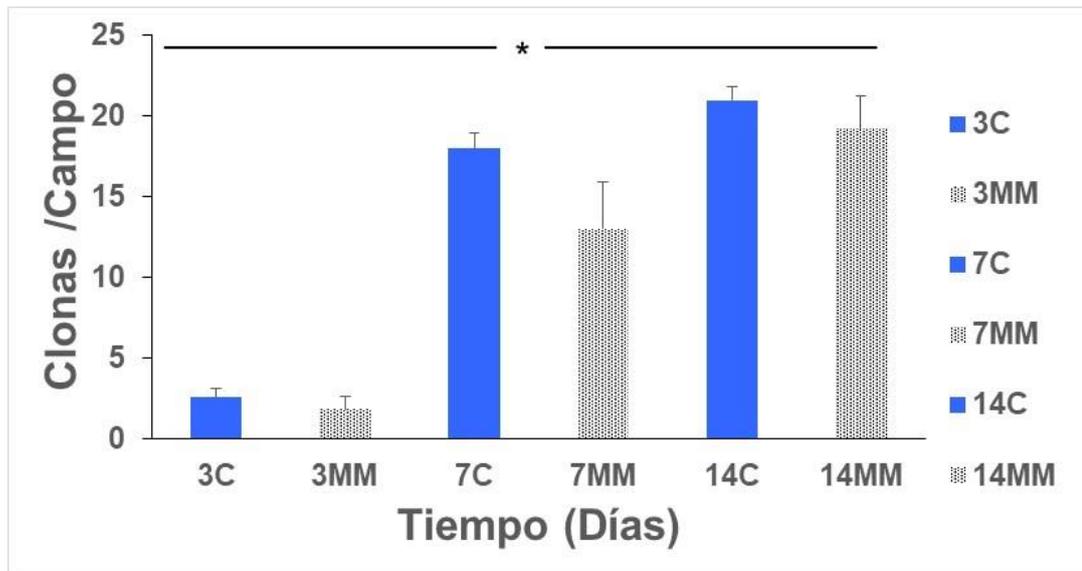
La viabilidad celular es indispensable para poder determinar eficacia en el uso de esferoides en la terapia regenerativa. La concentración de  $5 \times 10^2$  células/mL fue sometida a tinción con azul tripano para determinar viabilidad por exclusión de este. Los experimentos mostraron que las células disgregadas de los esferoides disminuyen su viabilidad dependiente del tiempo y, un área teñida considerablemente grande, se observa en los esferoides a 21 días, sugiriendo que la viabilidad en estas estructuras disminuye significativamente. (**Fig. 10**). Los datos anteriores sugieren que  $5 \times 10^2$  células/mL es la mejor condición para el desarrollo clonogénico en los esferoides a tiempo lagos como 21 días, sin embargo, la viabilidad celular de estos depende del tiempo y disminuye hasta un 70% en el último día de prueba.



**Figura 10.** Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo por exclusión de azul tripano a los 3, 7, 14 y 21 días a una concentración celular de  $5 \times 10^2$ . Las gráficas son presentadas como la media  $\pm$  ES (n=3). Los asteriscos indican las diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) determinada por la prueba de ANOVA y un post hoc de Tukey.

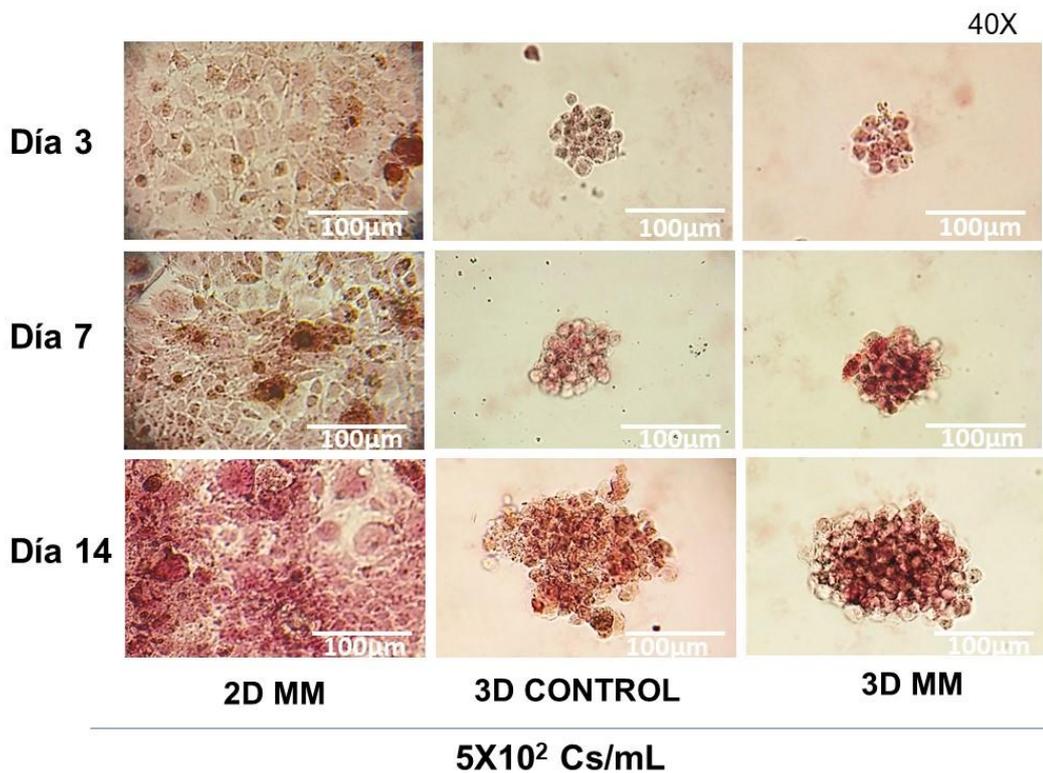
Para determinar el efecto del medio mineralizante en la formación de estos esferoides se realizaron ensayos clonogénicos a una concentración de  $5 \times 10^2$  células/mL. Los esferoides que fueron considerados como clones son aquellos que tuvieron un tamaño  $\geq$  a 50  $\mu\text{m}$ . Los datos mostraron un número disminuido de clones por campo, a los tres

días del ensayo, sin embargo a los 7 y 14 días estas estructuras mostraron un incremento en el número de clonas que cumplen los criterios de tamaño ( $\geq 50\mu\text{m}$ ) considerados en estos ensayos. Por otra parte, las clonas tienen diferencias tanto en la morfología como en el número de colonias con el medio mineralizante respecto al control (**Fig. 11**).



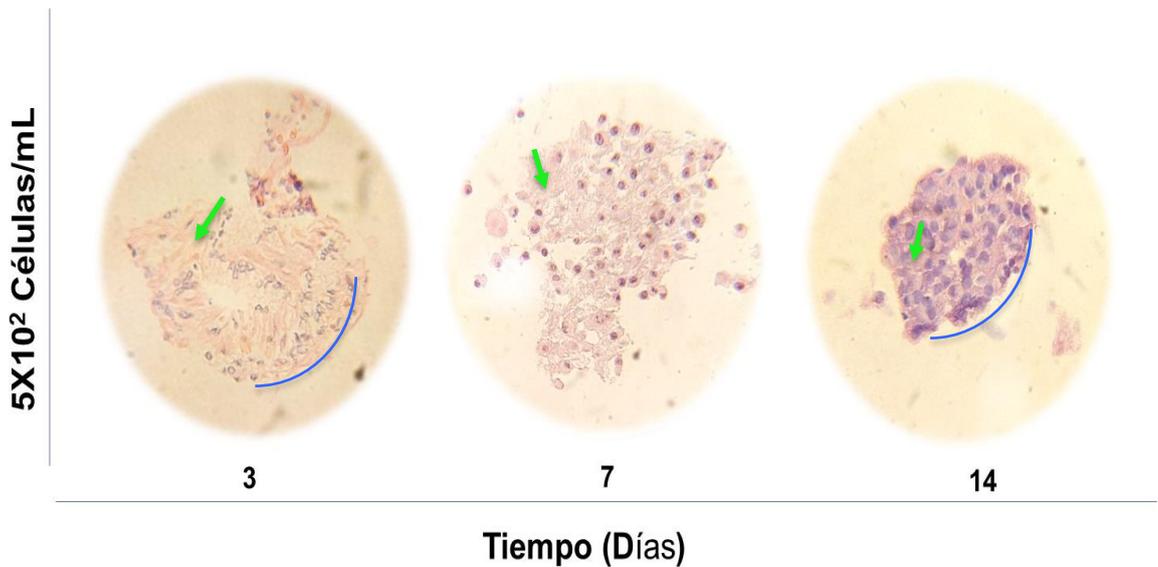
**Figura 11.** Ensayo clonogénico de cultivos en esfera a los 3, 7, 14 y 21 días a una concentración celular de  $5 \times 10^2$ . Las gráficas representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos que se realizaron de forma individual. Los asteriscos indican las diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ) determinadas por la prueba de ANOVA y con post hoc de Fisher.

Para los ensayos de detección de nódulos mineralizados, los cultivos bidimensionales (monocapa) muestran un incremento en la formación de nódulos mineralizados dependiente del tiempo, sin embargo, los esferoides a los 7 y 14 días muestran zonas con mayor intensidad de tinción con alizarina roja respecto a las monocapas, sugiriendo que estas estructuras están formando deposiciones de calcio en mayor proporción que los controles (**Fig. 12**).



**Figura 12.** Los ensayos de mineralización se llevaron a cabo por tinción con alizarina roja a los 3, 7 y 14 días a una concentración celular de  $5 \times 10^2$ . Las imágenes son representativas de experimentos que se realizaron de forma individual. MM: medio mineralizante; C: control.

La disposición celular de estas estructuras se observó mediante secciones teñidas con hematoxilina y eosina. Al microscopio invertido se observan células organizadas concéntricamente y subestructuras celulares bien definida como núcleos (morado) y citoplasmas (rosado). Las flechas verdes indican células anucleadas, indicativo de necrosis celular y las líneas azules indican una línea continua de células que podrían estar proliferando.



**Figura 13.** Las tinciones H&E de los cortes de los esferoides se llevaron a cabo durante 3, 7 y 14 días a una concentración celular de  $5 \times 10^2$ . Las imágenes son representativas de tres experimentos que se realizaron de forma individual.

## 12. DISCUSIÓN

Existen un número importante datos sobre regeneración ósea en modelos bidimensionales que hay contribuido significativamente en el avance de este campo, sin embargo, reportes en otros campos indican que existe diferencias importantes en el comportamiento de las células en condiciones tridimensionales respecto a los cultivos bidimensionales en diferentes tipos celulares. (40–44)

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los osteoblastos de una línea celular establecida son capaces de formar estructuras tridimensionales que les confieren la capacidad tener un microambiente mucho más parecido al que se tiene en los sistemas biológicos complejos. La capacidad de proliferación de las células en cultivos en suspensión es un factor determinante. Los osteoblastos utilizados en los ensayos celulares mostraron una alta tasa de proliferación por lo que concentraciones elevadas de células crean estructuras esferoidales grandes por agregación celular y no por crecimiento

clonogénico. Se ha reportado que los esferoides formados por agregación celular tienden a presentar uniones más inestables y que las condiciones idóneas para la formación de esferas es aquella que se da por el crecimiento clonal derivado de la proliferación celular. (43,45)

Los esferoides obtenidos a concentraciones de  $5 \times 10^2$  células/mL muestran formación de esferoides sin embargo a tiempos largos de hasta 21 días la viabilidad se ve considerablemente afectada, en las tinciones con azul de tripano se observa que la composición de nuestras esferas presentar centros necróticos y zonas celulares quiescentes y una periferia con células viables, este comportamiento es similar a los de otros investigadores. (37,46)

Si bien nuestros datos muestran una disminución en la viabilidad celular a tiempos largos una alternativa derivada de los avances recientes en el campo de la ingeniería de tejidos indica que la modulación de la composición celular de los esferoides puede mejorar su capacidad regenerativa. De hecho, la combinación de diferentes tipos de células en esferoides de cocultivo puede imitar mucho mejor las complejas interacciones naturales y heterotípicas de células a células de los tejidos normales que los esferoides de monocultivo. Por lo tanto, la fabricación de esferoides de cocultivo representa un paso clave hacia la generación de sustitutos de tejidos con función fisiológica mejorada. (39)

La mayoría de las células del cuerpo humano interactúan con células vecinas y con los componentes de la matriz extracelular (ECM) estableciendo una organización 3-D única. Estas interacciones célula-célula y célula-ECM forman una red de comunicación compleja de señales bioquímicas y mecánicas, que son críticas para la fisiología celular normal. Como resultado, la pérdida de propiedades específicas de los tejidos es común para las células cultivadas en cultivos monocapa 2-D. (37)

Los ensayos clonogénicos realizados mostraron que esta línea celular es sensible al tipo de cultivo en el cual se desarrollan los esferoides, ya que

el número de clonas es menor a lo observado en el cultivo en suspensión. Un dato importante indica que el medio mineralizante influye en el número de clonas y en la forma de estas, generando clonas con formas menos esféricas en el medio mineralizante respecto a las que se crecieron como control. Las esferas que se obtuvieron bajo condiciones de indicción para la formación de depósitos de calcio mostraron una mayor eficiencia en la formación de nódulos mineralizados respecto a las monocapa, esto sugiere que este cultivo provee las condiciones adecuadas para mejorar la respuesta celular en la regeneración de tejidos mineralizados.

Una tarea importante en el desarrollo de modelos tridimensionales es determinar la disposición estructural de estas, los esferoides muestran células con subestructuras como el núcleo y citoplasma los cuales son similares a los datos reportados por otros investigadores. (47)

A pesar de que observamos estructuras esféricas el ordenamiento celular que se muestra es importante determinar la expresión de marcadores asociados a procesos como proliferación, diferenciación y mineralización.

Los datos obtenidos hasta el momento indican que la estructuras tridimensional en la cual se desarrollan los diferentes procesos moleculares en el cuerpo son de suma importancia ya que el nicho celular representa un entorno en el cual se regula estrictamente la respuesta celular ante los embates del medio externo y la estandarización para generar estas condiciones debe estar finamente establecida considerando que estas estructuras serán utilizadas en la regeneración de tejidos.

### **13. CONCLUSIÓN**

Las enfermedades óseo-degenerativas son un común de la población etaria de la tercera edad. Los avances en la biomedicina en las últimas décadas han contribuido a mejorar la calidad de vida de los pacientes sin embargo existen condiciones por la que pacientes no responden a la terapia

convencional. El auge en los últimos años en el estudio y aplicación de terapias de vanguardia donde se utilizan las propiedades regenerativas de las células troncales en el campo de la regeneración ósea han dado grandes resultados y prometen ampliar las opciones de tratamiento para los pacientes. Si bien a la fecha está incrementando el número de estudios con modelos tridimensionales, no es del todo claro el comportamiento de las células bajo estas condiciones de crecimiento. En este trabajo se establecieron las condiciones del crecimiento de osteo-esferas a corto y largo plazo. Los datos indicaron que para ensayos de mineralización las concentraciones celulares son determinantes en el comportamiento biológico a lo largo del tiempo, indicando que es importante comprender el potencial de proliferación de la línea celular de estudio para utilizar las condiciones idóneas para el fin que se busca. También se observó que las esferas son capaces de formar nódulos de mineralización, sin embargo, sería importante observar el comportamiento en la formación de estos al interior de la esfera. Finalmente, al seccionar las osteo-esferas encontramos ordenamientos células que muestran integridad celular, sugiriendo que esta estandarización puede ser utilizada para determinar diferentes procesos biológicos en condiciones tridimensionales.

#### **14. PERSPECTIVAS**

Los datos obtenidos en este trabajo requieren de ensayos para poder determinar la expresión de biomarcadores indicativos de la capacidad clonogénica que adquieren las células bajo estas condiciones de cultivo, del mismo modo es importante determinar si estos esferoides son capaces de incrementar los biomarcadores canónicos que intervienen en los procesos de mineralización y observar sus efectos en defectos óseos.

## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaría de desarrollo social. Análisis prospectivo de la población de 60 años de edad en adelante [Internet]. 2017. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/201801/An\\_lisis\\_prospectivo\\_de\\_la\\_poblaci\\_n\\_de\\_60\\_a\\_os\\_en\\_adelante.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/201801/An_lisis_prospectivo_de_la_poblaci_n_de_60_a_os_en_adelante.pdf)
2. Portal-Núñez S, Lozano D, de la Fuente M, Esbrit P. Fisiopatología del envejecimiento óseo. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. mayo de 2012;47(3):125-31.
3. Consejo nacional de población. La situación demográfica de México [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapo/documentos/la-situacion-demografica-de-mexico-2019>
4. Olmos Martínez JM, Martínez García J, González Macías J. Envejecimiento músculo-esquelético. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*. enero de 2007;16(1):1-7.
5. Sistema de vigilancia epidemiologica de patologías bucales. Resultados 2018 del sistema de vigilancia epidemiológica de patologías bucales [Internet]. 2019. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/525756/20200116\\_archivo\\_SIVEPAB-18\\_1nov19\\_1\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/525756/20200116_archivo_SIVEPAB-18_1nov19_1_.pdf)
6. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 2015;2015:1-17.
7. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med*. 25 de mayo de 2006;354(21):2250-61.
8. BioRender [Internet]. [citado 11 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://app.biorender.com/>
9. Baig MA, Bacha D. Histology, Bone. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [citado 5 de diciembre de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541132/>
10. El Sayed SA, Nezwek TA, Varacallo M. Physiology, Bone. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020

[citado 5 de diciembre de 2020]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441968/>

11. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. mayo de 2003;423(6937):337-42.
12. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *Journal of Cell Science*. 1 de abril de 2011;124(7):991-8.
13. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. enero de 2015;11(1):45-54.
14. International Programme on Chemical Safety, editor. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Geneva: World Health Organization; 2001. 238 p. (Environmental health criteria).
15. Kuo T-R, Chen C-H. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomark Res*. diciembre de 2017;5(1):18.
16. Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int*. enero de 2003;72(1):2-4.
17. Fakhry M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *WJSC*. 2013;5(4):136.
18. Albeshri S, Alblaiheh A, Niazy AA, Ramalingam S, Sundar C, Alghamdi HS. Biomarkers as Independent Predictors of Bone Regeneration around Biomaterials: A Systematic Review of Literature. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. mayo de 2018;19(5):605-18.
19. Mohamed AM. An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. *Malays J Med Sci*. enero de 2008;15(1):4-12.
20. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology*. mayo de 2016;31(3):233-45.
21. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*. octubre de 2016;55(10):1714-25.

22. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. diciembre de 2018;185:240-75.
23. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 15 de julio de 2011;2(1):403-30.
24. Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M, Davies SC, editores. Basic science methods for clinical researchers. London ; San Diego: Elsevier/Academic Press; 2017. 355 p.
25. Roi A, Ardelean LC, Roi CI, Boia E-R, Boia S, Rusu L-C. Oral Bone Tissue Engineering: Advanced Biomaterials for Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation. *Materials*. 18 de julio de 2019;12(14):2296.
26. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro CellDevBiol-Animal*. septiembre de 2017;53(8):669-72.
27. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. junio de 2018;14(4):910-9.
28. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. mayo de 2014;12(4):207-18.
29. Gurumurthy B, Bierdeman PC, Janorkar AV. Spheroid model for functional osteogenic evaluation of human adipose derived stem cells: Osteogenesis of Adipose Stem Cell Spheroids. *J Biomed Mater Res*. abril de 2017;105(4):1230-6.
30. Whitesides GM. Self-Assembly at All Scales. *Science*. 29 de marzo de 2002;295(5564):2418-21.
31. Laschke MW, Menger MD. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*. febrero de 2017;35(2):133-44.

32. Baptista LS, Kronemberger GS, Silva KR, Granjeiro JM. Spheroids of stem cells as endochondral templates for improved bone engineering. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 1 de junio de 2018;23:1969-86.
33. Langdon SP. Basic principles of cancer cell culture. *Methods Mol Med*. 2004;88:3-15.
34. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*. octubre de 2012;12(10):1347-60.
35. Hu G, Li D. Three-dimensional modeling of transport of nutrients for multicellular tumor spheroid culture in a microchannel. *Biomed Microdevices*. 1 de junio de 2007;9(3):315-23.
36. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, De Bartolo L, Drioli E, Bader A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*. diciembre de 2007;28(36):5487-97.
37. Lin R-Z, Chang H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. octubre de 2008;3(9-10):1172-84.
38. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*. febrero de 2013;31(2):108-15.
39. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomed Mater*. 21 de marzo de 2018;13(3):034109.
40. Soares CP, Midlej V, Oliveira MEW de, Benchimol M, Costa ML, Mermelstein C. 2D and 3D-Organized Cardiac Cells Shows Differences in Cellular Morphology, Adhesion Junctions, Presence of Myofibrils and Protein Expression. Cordes N, editor. *PLoS ONE*. 25 de mayo de 2012;7(5):e38147.
41. Akins RE, Rockwood D, Robinson KG, Sandusky D, Rabolt J, Pizarro C. Three-Dimensional Culture Alters Primary Cardiac Cell Phenotype. *Tissue Engineering Part A*. febrero de 2010;16(2):629-41.

42. Muguruma M, Teraoka S, Miyahara K, Ueda A, Asaoka M, Okazaki M, et al. Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. diciembre de 2020;533(3):268-74.
43. Maliszewska-Olejniczak K, Brodaczewska KK, Bielecka ZF, Solarek W, Kornakiewicz A, Szczylik C, et al. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology*. febrero de 2019;71(1):149-63.
44. Jauković A, Abadjieva D, Trivanović D, Stoyanova E, Kostadinova M, Pashova S, et al. Specificity of 3D MSC Spheroids Microenvironment: Impact on MSC Behavior and Properties. *Stem Cell Rev and Rep*. octubre de 2020;16(5):853-75.
45. McKee C, Chaudhry GR. Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. noviembre de 2017;159:62-77.
46. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface*. febrero de 2017;14(127):20160877.
47. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *IJMS*. 11 de marzo de 2015;16(12):5517-27.

## 16. ANEXOS

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Esperanza de vida en la población en México.	<b>13</b>
<b>Figura 2</b> Índice de envejecimiento en la población 2014-2030.	<b>14</b>
<b>Figura 3</b> Células del tejido óseo.	<b>16</b>
<b>Figura 4</b> Microambiente del esferoide.	<b>29</b>
<b>Figura 5</b> Esferoides, estructuras valiosas en formación de tejidos.	<b>30</b>
<b>Figura 6</b> Formación de esferoides de líneas celulares hFOB 5 días.	<b>37</b>
<b>Figura 7</b> Tamaño de esferas determinado por ImageJ.	<b>38</b>
<b>Figura 8</b> Formación de esferoides de hFOB, 3, 7 y 14 días.	<b>39</b>
<b>Figura 9</b> Tamaño de esferas determinado por Image J (2)	<b>39</b>
<b>Figura 10</b> Ensayos de viabilidad con azul tripano.	<b>40</b>
<b>Figura 11</b> Ensayo clonogénico de cultivos.	<b>41</b>
<b>Figura 12</b> Ensayos de mineralización con alizarina roja.	<b>42</b>
<b>Figura 13</b> Tinciones H&E de los cortes de los esferoides.	<b>43</b>

### ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1</b> Proteínas de la MEC implicadas en la formación y regeneración ósea y otros tejidos mineralizados y su ubicación.	<b>20</b>
<b>Tabla 2</b> Biomoléculas relacionadas con el metabolismo óseo.	<b>22</b>
<b>Tabla 3</b> Comparación entre modelos de cultivo en monocapa 2D y 3D.	<b>26</b>