



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CIENCIAS BASICAS

**“SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ESFEROIDES COMO
ESTRATEGIA PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS
3D”**

DEFENSA DE TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctora en ciencias

PRESENTA:
María Verónica Cuevas González

TUTOR
DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Álvarez', with a star symbol integrated into the design.

División de estudios de posgrado e investigación, Facultad de odontología, UNAM

COMITÉ TUTOR
DR. FERNANDO SUASTE OLMOS
Instituto de fisiología celular, UNAM

DR. DAVID MASUOKA
Profesor de la Universidad
Autónoma de Aguascalientes

CDMX OCTUBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INDICE

I. Resumen.....	3
II. Astract	4
III. INTRODUCCIÓN.....	5
I.I DESARROLLO Y CARACTERISTICAS DEL CULTIVO 3D.....	5
I.II FORMACIÓN ESFEROIDES	7
I.III TIPOS DE CULTIVOS 3D	10
I.IV MÉTODOS DE FORMACIÓN DE ESFEROIDES	11
I.V CULTIVOS 3D EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS.....	15
I.VI NECESIDADES DE REGENERACIÓN ÓSEA EN LA REGIÓN MAXILOFACIAL.....	16
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.	20
V. OBJETIVOS	21
VI. HIPÓTESIS	22
VII. METODOLOGÍA	23
VIII. RESULTADOS.....	27
IX. DISCUSIÓN.....	49
X. CONCLUSIÓN	54
XI. REFERENCIAS.....	55



Agradecimientos

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por la asesoría, así como el excelente apoyo técnico que me brindó durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM: PAPIIT IN213821 que ha permitido la realización de esta investigación.

Agradezco el apoyo por parte del CONACYT a través del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación.

Al conacyt por la beca otorgada para mis estudios de doctorado (Número de Apoyo 326127 y CVU 537149) en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.



I. Resumen

El aumento en el número de trastornos relacionados con el tejido óseo ha llevado a avances significativos en las estrategias de regeneración en las últimas décadas, el estudio de cultivos tridimensionales (3D), en específico de los esferoides se han posicionado como un elemento clave en la regeneración de tejidos ya que solos o en conjunto con andamios han demostrado tener mayor expresión de marcadores relacionados con el proceso de mineralización en comparación con el cultivo en monocapa, sin embargo, en cuanto al estudio propiamente de la estructura esferoidal existen pocos estudios que analizan como es la organización de las células en el interior del esferoide. **Objetivo.** - Síntesis y caracterización de esferoides de osteoblastos con enfoque en la regeneración de tejido óseo. **Metodología.** - La síntesis de los esferoides se llevó a cabo con la técnica de superposición de líquidos, para la caracterización se realizaron ensayos de viabilidad y análisis morfológico que incluyeron tinciones histológicas de hematoxilina y eosina (HyE), tricómico de Masson y para la evaluación de marcadores de mineralización se realizó tinción con alizarina roja y la detección de marcadores específicos como osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP) por medio de inmunohistoquímica. **Resultados.** - las células de osteoblastos mostraron la capacidad de formar esferoides bien delimitados, compactos y estables con valores de viabilidad ascendentes por 14 días. En cuanto su organización se observó que inicialmente las células se concentran principalmente en la periferia de la estructura, para posteriormente reorganizarse y distribuirse de forma generalizada por toda la estructura del esferoide lo que les permite la expresión de moderada a severa en cantidad e intensidad de los marcadores de mineralización de la matriz osteoide. **Conclusiones.** - Este estudio brinda un panorama mucho más claro acerca de la dinámica interna de los esferoides de osteoblastos confirmando su aplicación potencial en la ingeniería de tejidos.



II. Abstract

The increase in the number of disorders related to bone tissue has led in recent decades a significant advance in regeneration tissue strategies, the study of three-dimensional cell cultures, (3D) specifically spheroids, has placed itself as a key element in tissue regeneration either alone or in conjunction with scaffolds. *In vitro* studies have shown that spheroids have a higher expression of markers related to the mineralization process compared to monolayer culture, however, there are few studies that analyze the organization of cells inside the spheroid. **Objective.** - synthesis and characterization of osteoblast spheroids with a focus on bone tissue regeneration. **Methodology.** - The synthesis of the spheroids was made with the liquid superposition technique, for the characterization, viability tests and morphological analysis were carried out, included histological stains of hematoxylin and eosin (H&E), and Masson's trichome, the evaluation of mineralization markers were performed with alizarin red staining and finally detection of specific markers such as osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN) and bone sialoprotein (BSP) were made by immunohistochemistry. **Results.** -osteoblast cells line showed the ability to form well-defined, compact and stable spheroids with ascending viability values for 14 days. Regarding its organization, it was observed that initially the cells are concentrated mainly in the periphery of the structure, to later reorganize and distribute themselves in a generalized way throughout the structure of the spheroid, which allows them the expression of moderate to severe in quantity and intensity of markers of mineralization of the osteoid matrix **Conclusions.** - This study provides a much clearer analysis of the internal dynamics of osteoblast cells spheroids, confirming their potential application in tissue engineering.



III. INTRODUCCIÓN

I.I DESARROLLO Y CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO 3D

El embriólogo estadounidense Ross Granville Harrison desarrolló las primeras técnicas de cultivo celular *in vitro* en la primera década del siglo XX. En enero de 1912 se desarrolló la primera línea celular derivada de fragmentos de corazón de un embrión de pollo, esta línea celular se logró mantener en un medio de cultivo Ringer y debido a la realización de lavados y cambios constantes de medio, estas células se lograron mantener por largos periodos de tiempo. A esto se le conoció como cultivo en monocapa. (1)

El desarrollo de métodos para la proliferación y el mantenimiento de células en cultivo monocapa fue un acontecimiento innovador en biología *in vitro*, sin embargo, conforme se fue popularizando su uso llegó a mostrar múltiples limitaciones; se observó que las células epiteliales provenientes de explantes al ser colocadas en cajas plásticas de cultivo u otros sustratos sólidos, conforme comenzaban a proliferar perdían su fenotipo diferenciado, junto con esta pérdida también se limitan muchas características importantes específicas de órganos y atributos funcionales que suelen ser motivo de investigación, por ejemplo, las células epiteliales de las vías respiratorias en cultivos monocapa no forman cilios y no adquieren la capacidad de secretar moco, los queratinocitos epidérmicos no forman capas estratificadas diferenciadas con función de barrera, por lo que la funcionalidad de los cultivos en monocapa con aplicación hacia la toxicología, desarrollo de fármacos e investigación básica se comenzó a limitar. (2)

Con la finalidad de responder las múltiples interrogantes de cuáles eran los motivos por los cuales las células pierden su fenotipo, se realizaron múltiples investigaciones una de ellas fue el estudio de la diferenciación de las células mamarias. La glándula mamaria del ratón crece desde los pezones hasta las almohadillas de grasa mamaria bajo la influencia de las hormonas de la pubertad, posteriormente se diferencian debido a las hormonas del embarazo para producir estructuras alveolares que producen leche. Si se extirpa el pezón antes de la pubertad, la almohadilla de grasa permanece como un sitio ideal para el trasplante posterior de células aisladas, por tanto, la función de las células del epitelio mamario puede estudiarse de forma más clara. Epitelio mamario normal del ratón al ser colocado en cultivo en monocapa y expuesto a hormonas del embarazo mostraron ausencia de diferenciación para producir estructuras organizadas o para producir proteínas de la leche, sin embargo, las células cultivadas al ser implantadas nuevamente en la almohadilla de grasa mamaria del ratón adquirirían nuevamente la capacidad para formar conductos y



estructuras asociadas, demostrando que el estroma tisular es fundamental para la diferenciación y función de las células parenquimatosas. (2)

En los cultivos en monocapa las células se adhieren a un sustrato de vidrio o plástico y están en contacto con otras células solo en su periferia, debido a la ausencia de gradientes de oxígeno, nutrientes o desechos, el ambiente no es fisiológicamente uniforme, este cultivo no permite que las células se apilen unas sobre otras, sino que se ven obligadas a adoptar una morfología plana, lo que no es natural para todos los tipos de células. (3) Para proporcionar una alternativa fisiológicamente más relevante a este tipo de cultivo, se desarrolló el cultivo celular tridimensional o 3D el cual permite que las células adquieran características presentes en los tejidos incluyendo morfología, diferenciación, polaridad, tasa de proliferación, expresión génica, heterogeneidad celular, así como gradientes de nutrientes y oxígeno. (4)

La idea del cultivo de células en 3D se concibió originalmente en 1907, cuando Ross Harrison de la Universidad Johns Hopkins llevó a cabo el primer experimento cultivando fragmentos de tubo neural de embriones de rana en linfa de rana fresca en un cubreobjetos, y una vez que la linfa se coaguló, invirtió el cubreobjetos en un portaobjetos que tenía una depresión. Esta fue la primera demostración del "cultivo de gota colgante". El uso de cultivo 3D se refiere al proceso de crecimiento de células en su contexto nativo o entorno *in vivo*. Esto se hace mediante la adición de una tercera dimensión, que puede imitar las complejas interacciones entre las células y la matriz extracelular (MEC), a diferencia de los cultivos en monocapa donde las células se exponen homogéneamente al medio, en los cultivos en 3D se observan gradientes a la exposición tanto de oxígeno como de nutrientes. Debido a su similitud arquitectónica con los tejidos *in vivo*, los cultivos de células 3D conservan las características fenotípicas y funcionales de sus contrapartes *in vivo*, proporcionando así un sistema *in vitro* fisiológicamente más relevante para evaluar las respuestas biológicas. (5) Las principales diferencias biológicas entre ambos tipos de cultivo son:

1. Expresión génica. - proteínas de unión como la ocludina, zona occludens (ZO) -1, E-cadherina, β -catenina y cingulina se expresan abundantemente en células cultivadas en 3D, mientras que se expresan mínimamente cuando las mismas células se cultivan en monocapa. Otra característica que contribuye a la naturaleza no fisiológica de los cultivos en monocapa es la incorrecta localización de uniones estrechas y marcadores de polaridad. En los cultivos 3D estas proteínas se localizan en las zonas celulares funcionales, por ejemplo, en tinciones realizadas para ZO-1, E-cadherina, y β -catenina mostraron que estaban localizadas en las interfaces



célula-célula en células A549 de epitelio alveolar cultivadas en ambientes 3D, mientras que en cultivos en monocapa mostraron un patrón difuso de tinción para estos marcadores. (6)

2. Morfología celular. - Varios estudios han confirmado que la morfología celular y la arquitectura de las células en 3D representan con mayor precisión tejidos *in vivo*, por ejemplo, las células epiteliales intestinales, cuando se cultivan en 3D, se organizan en pliegues en forma de vellosidades que se asemejan mucho a las microvellosidades intestinales. Las líneas celulares de cáncer de ovario y endometrio, muestran las características citológicas de las células tumorales primarias, como variación en el tamaño celular, polimorfismo nuclear y nucléolos prominentes. Las células epiteliales mamarias no malignas forman estructuras acinares organizadas de detención del crecimiento que se asemejan a un humano normal tejido mamario. (7)

I.II FORMACIÓN ESFEROIDES

En el cultivo tridimensional las células tienden a agregarse y pasar por el proceso de autoensamblaje; el autoensamblaje significa que las células individuales constituyen esferoides multicelulares por sí mismas, es un fenómeno natural que ocurre durante la embriogénesis, morfogénesis y organogénesis. (8)

El proceso de formación de los esferoides se divide en varios pasos, primero las células individuales presentes dentro del medio se aglomeran para formar esferoides de células poco adhesivas, esta fase involucra la presencia de las fibras de cadena larga con múltiples motivos RGD (aminoácidos Arg-Gly-Asp) con la unión de la integrina de la superficie celular que inicialmente proporcionan una agregación rápida de células dispersas. En una segunda fase la E-cadherina promueve una fuerte adhesión del agregado celular inicial creando uniones hemofílicas entre las cadherinas de las células periféricas; además, el complejo de β -catenina facilita la transducción de señales celulares. La actina también puede afectar la aglomeración al promover los contactos entre las células adyacentes, como resultado se forman esferoides multicelulares con fuertes adhesión. (Fig. 1) (9)

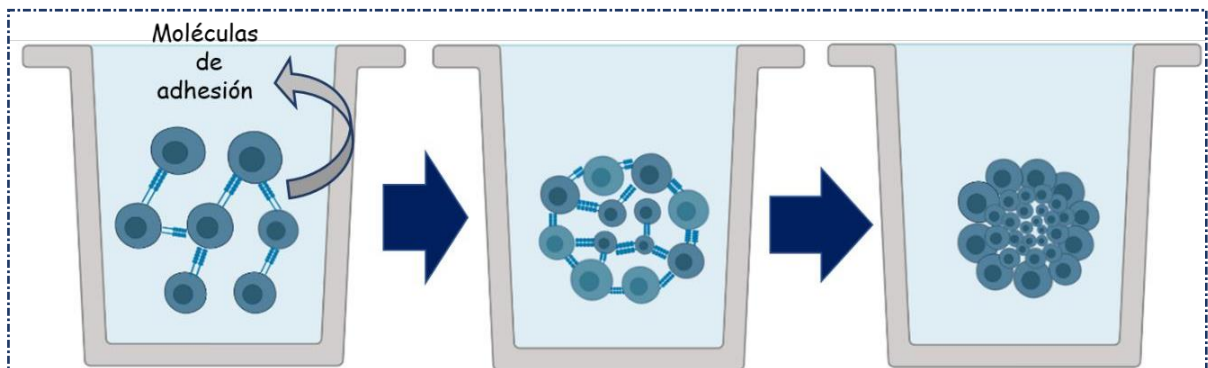


Figura 1. Método de formación de esferoides

Las cadherinas son proteínas que tienen una función vital desde las etapas embrionarias, La E-cadherina (CDH1) es una molécula de adhesión transmembranal homofílica dependiente de Ca^{2+} que es considerada un componente central de la formación de esferoides. En la fase embrionaria la unión celular mediada por E-cadherina inicia la aglomeración del cuerpo embrionario, si se bloquea la acción de esta proteína se produce una inhibición considerable de la aglomeración del cuerpo. (10) Por otra parte, las integrinas son proteínas de adhesión transmembranal compuestas por subunidades α y β de heterodímeros que facilitan la conexión célula-MEC durante la migración celular. (11) Una mayor interacción célula-célula y célula-matriz inducen modificaciones significativas en la red citoesquelética dentro de cada célula del agregado 3D, las cadherinas activadas transducen la señal a través de dominios intracelulares mediante la interacción con el complejo de adhesión (compuesto por p120-catenina, β -catenina, α -catenina y otras moléculas involucradas en la organización citoesquelética) que permite el contacto físico directo y la posterior transferencia de señales al filamento de actina. Las integrinas también conducen a la activación del complejo de adhesión y la transmisión de señales dentro de la célula a través de la remodelación del citoesqueleto de actina. Se ha demostrado que la forma celular compacta se acompaña de una menor tensión en el citoesqueleto debido a la expresión de filamentos de actina orientados en paralelo que contornean el interior de la célula. La expresión de α -tubulina, como componente de los microtúbulos tiene un papel fundamental en la reordenación de actina para el mantenimiento celular dentro de los agregados 3D. (12) (13)

Además de la iniciación de la unión celular, las moléculas de adhesión a través de la reorganización del citoesqueleto proporcionan fuerza mecánica las cuales regulan varias funciones biológicas lo que sugiere que las propiedades mecánicas podrían ser críticas para comprender el comportamiento de los cultivos 3D. (13)

Por otra parte, en cuanto a la organización de las células dentro del esferoide, de acuerdo al aporte de oxígeno y nutrientes se han descrito zonas clásicas donde se distinguen células proliferantes, inactivas, apoptóticas o hipóxicas. Las células en proliferación se encuentran principalmente en la capa externa de los esferoides debido a que están expuestas a cantidades suficientes de nutrientes provenientes del medio de cultivo. (Fig. 2) Las células en el núcleo de los esferoides tienden a estar en estados inactivos o hipóxicos porque se enfrentan a la falta de oxígeno, factores de crecimiento y nutrientes. La heterogeneidad celular dentro de una población celular es bastante relevante para tejidos, órganos e incluso tumores *in vivo*. (14)

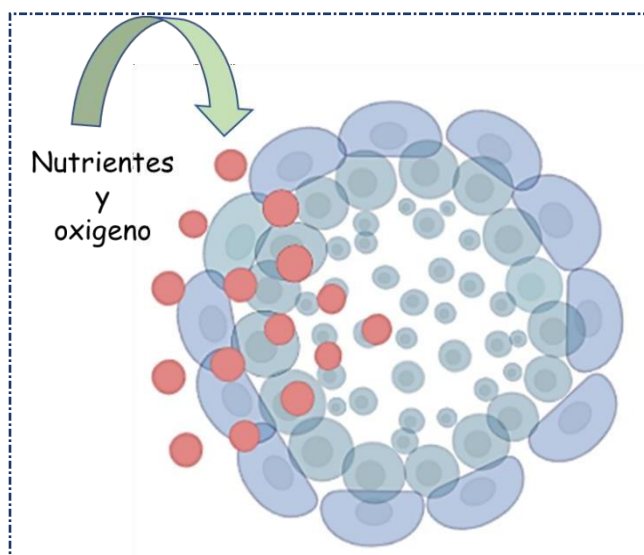


Figura 2. Esquema que representa el aporte de nutrientes y oxígeno al esferoide; las células del exterior reciben una mayor nutrición y oxígeno que aquellas localizadas en el interior.

El diámetro del esferoide es uno de los parámetros críticos que afectan la distribución de oxígeno y nutrientes dentro del esferoide; el tamaño de un esferoide puede controlarse mediante la densidad celular y el flujo de líquido durante el proceso de cultivo, así como la duración del mismo. Curcio y colaboradores Investigaron la distribución de la concentración de oxígeno, glucosa y lactato dentro de un esferoide demostrando que la concentración de oxígeno y la viabilidad celular disminuyen con el aumento del diámetro del esferoide. (15)



I.III TIPOS DE CULTIVOS 3D

Los recientes avances en los campos de la biología celular, técnicas de microfabricación e ingeniería de tejidos han permitido el desarrollo de diferentes tipos de cultivos en 3D como son los esferoides, esferoides multicelulares, organoides y tumoroides.

Los cultivos de esferoides multicelulares fueron desarrollados inicialmente por Sutherland en 1970 para recapitular el fenotipo funcional de las células tumorales y su respuesta a la radioterapia. Se obtienen típicamente de cultivos unicelulares que se auto-ensamblan o se fuerzan a agregar. En el caso de los esferoides formados por células tumorales tienden a asemejar al escenario tumoral complejo, ya que están compuestos por varias áreas y capas especializadas donde las células tienen diferentes comportamientos fenotípicos, funcionales y metabólicos. En particular, muestran una arquitectura espacial bien organizada con una capa proliferativa externa, una zona intermedia compuesta por células inactivas y senescentes y un núcleo interno apoptótico y necrótico resultante de la distribución deficiente de nutrientes y oxígeno en estas áreas. (16)(17)

El volumen del esferoide aumenta exponencialmente en las primeras etapas y es seguido por un período de estabilización en el que alcanzan una especie de equilibrio, adquiriendo una forma más regular y disminuyendo en volumen. Esta última fase es importante para el desarrollo de la organización funcional y estructural del propio esferoide. (16)

A diferencia de los esferoides que se originan de líneas celulares previamente establecidas, los organoides crecen a partir de células madre o tejido sano o tumoral que se caracterizan por conservar la funcionalidad y la apariencia del tejido original. (18) La estructura organoide refleja las características específicas de los tejidos en términos de distribución de tipos celulares diferenciados, arquitectura global y funciones específicas de tejidos y células. Los cultivos organotípicos a largo plazo se establecen complementando el medio con factores de crecimiento específicos de tejido sin capas alimentadoras. (16)

Los organoides imitan la gran mayoría de las funciones y características de los órganos, las principales desventajas es que todos los organoides carecen de vasculatura, que es esencial para el transporte de nutrientes y desechos, además de que pueden carecer de tipos de células clave que se encuentran *in vivo*, y finalmente algunos replican solo las primeras etapas del desarrollo de los órganos. Por ejemplo, los organoides de retina no tienen los segmentos externos y los fotorreceptores no maduran completamente para volverse sensibles a la luz, mientras que los organoides cerebrales no desarrollan completamente características posteriores, como las capas de placas corticales.(19) (17)



Hasta la fecha, se han establecido cultivos de organoides para una amplia variedad de tejidos libres de enfermedad, así como para muestras tumorales malignas desarrollando el modelo del tumoroides los cuales reflejan las características genéticas y fenotípicas del lecho tumoral, como la heterogeneidad y la organización espacial 3D. Numerosas otras características facilitan su uso como modelo para estudiar el cáncer, en particular, al ser de origen humano no se ven obstaculizados por las diferencias entre especies cuando se utilizan como modelado de enfermedades, que es el principal inconveniente de utilizar modelos animales. (16) Todo lo anterior refleja el potencial que tienen los diferentes tipos de cultivo 3D en el estudio de enfermedades, así como en el entendimiento de procesos biológicos.

I.IV MÉTODOS DE FORMACIÓN DE ESFEROIDES

Existen múltiples metodologías para la formación de los esferoides, el tipo de técnica de cultivo celular 3D elegida depende del tipo de células, el origen del tejido, el objetivo del estudio y la necesidad de capacidades de alto rendimiento. Dentro de las metodologías más reportadas en la literatura se encuentran:

- Cultivo de pellets. - En este sistema, las células se concentran en el fondo del tubo mediante fuerza centrífuga. Para formar esferoides se centrifuga una suspensión celular en un tubo de fondo cónico a una velocidad de 500 g durante 5 minutos, para optimizar este proceso, la suspensión celular se puede incubar en un agitador durante una hora antes de la centrifugación; las adherencias entre células se maximizan por la proximidad de las células individuales en la parte inferior del tubo. (Fig. 3)

Si bien una gran cantidad de células puede agregarse rápidamente, una desventaja es el esfuerzo cortante de la centrifugación que puede dañar las células. Este método se utiliza para formar esferoides de diámetro bastante grande que pueden crear una baja concentración de oxígeno en el centro. (20)

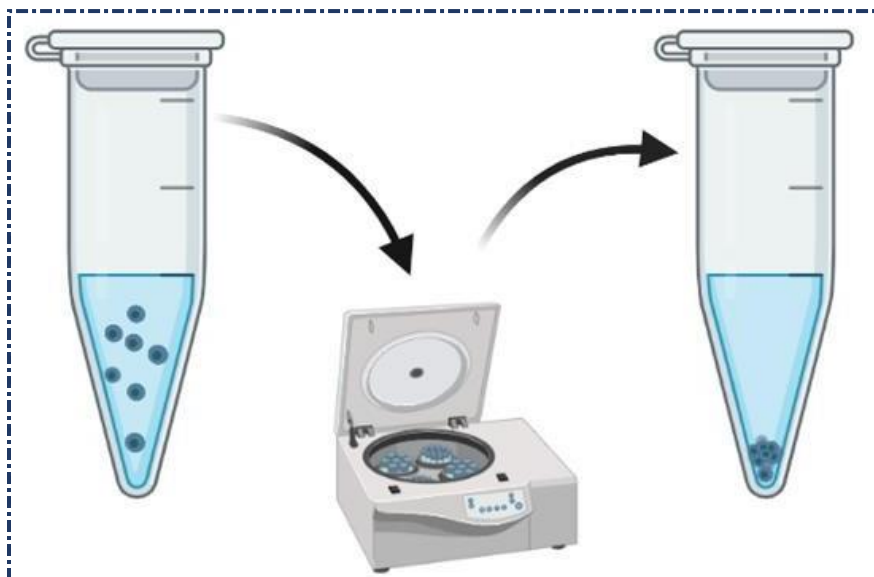


Figura 3. Método de formación de esferoides por medio de centrifugación

- Superposición de líquidos. – Esta técnica fue descrita en los años 70's, también llamada cultivo en suspensión estática, forma esferoides al evitar que las células se adhieran al plato de cultivo, esto se logra colocando una base de agar o gel de agarosa que impide dicha adhesión debido a la característica de alta hidrofiliidad. Dado que las uniones celulares están inhibidas, las células se unen unas con otras de forma espontánea al promover moléculas adhesivas célula-célula. (Fig. 4) (21) (22)

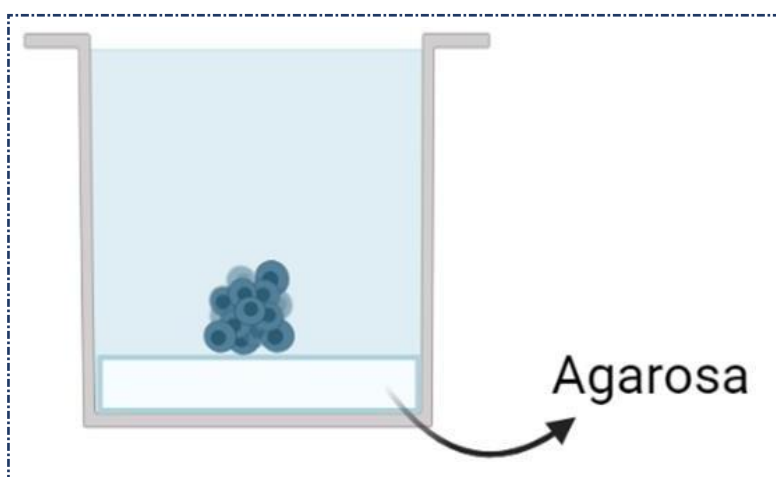


Figura 4. Método de formación de esferoides por superposición de líquidos

- Gota colgante. – Esta técnica permite que las células individuales se agreguen al mantenerse dentro de una gota de medio de cultivo, al controlar el volumen de la gota o la densidad de la suspensión celular, es posible controlar el tamaño del esferoide. Esta técnica puede formar esferoides circulares que tienen una distribución estrecha de tamaño con un coeficiente de variación del 10% al 15%, mientras que el crecimiento de esferoides en los métodos de cultivo superficial no adherente tiene un coeficiente de variación del 40% al 60%. Un método general implica partir de un cultivo de células monocapa, después de lo cual las células se preparan como suspensión y se diluyen con medio de cultivo para alcanzar la densidad celular deseada. Posteriormente, la suspensión de células se distribuye en los pocillos de una mini bandeja y se invierte toda la estructura. Las gotas de suspensión celular unidas en la mini bandeja permanecerían en la superficie invertida por la tensión superficial. En este método, los esferoides se forman como gotas debido a la acción simultánea de la tensión superficial y la fuerza gravitacional. (Fig. 5) (8)

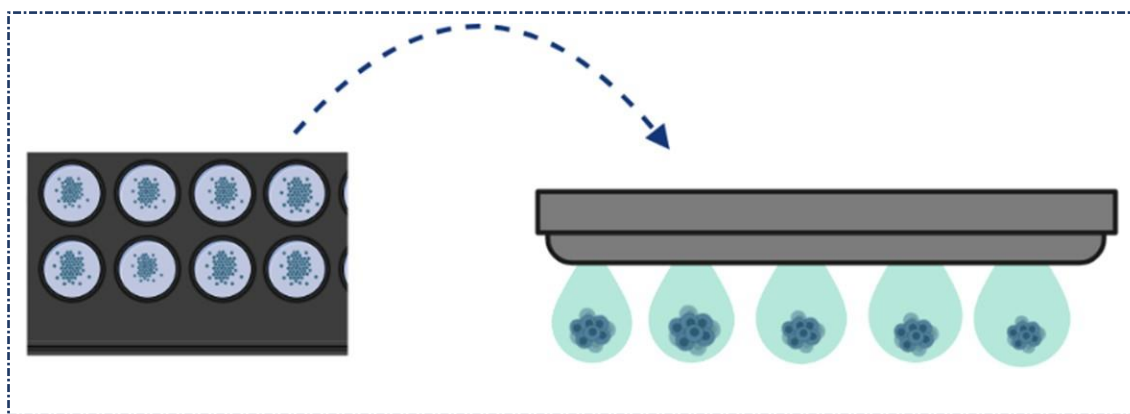


Figura 5. Método de formación de esferoides de gota colgante

- Cultivo rotatorio. – esta técnica consiste en crear esferoides al evitar que las células en suspensión se asienten y al promover colisiones de célula a célula mediante agitación constante. Para la formación de los esferoides, se colocan células en suspensión en el matraz rotatorio, la transferencia de fluidos y masas dentro del matraz son controladas mediante fuerzas convectivas generadas por agitación magnética. Mantener una velocidad de rotación constante es fundamental, una

velocidad de agitación demasiado lenta permitirá que los esferoides se asienten, pero una demasiado alta causará daño celular debido al esfuerzo cortante del fluido; una ventaja es que el movimiento del fluido ayuda al transporte de masa dentro y fuera de los esferoides. (Fig. 6) (9) (20)

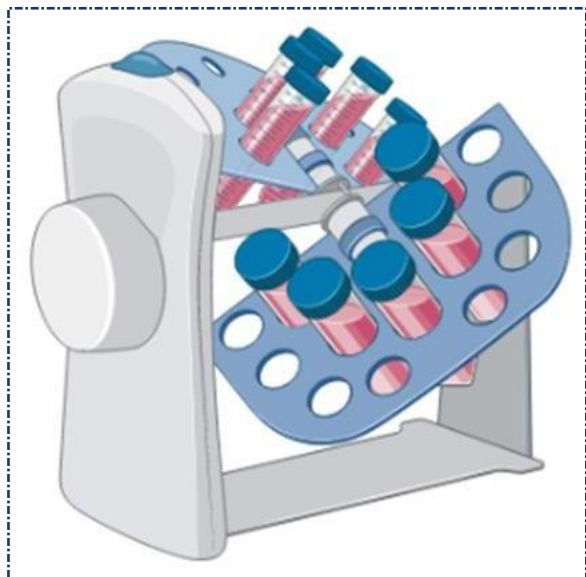


Figura 6. Método de cultivo tridimensional rotatorio

- Microfluidos. – Cuando se utilizan microfluidos, las células fluyen a través de una red de microcanales hacia microcámaras donde se dividen y se exponen a un flujo micro-rotacional que hace que las células se agreguen. Este método de cultivo tiene dimensiones de microescala que corresponden a la escala de microestructuras *in vivo*, además. Los dispositivos de microfluidos emplean materiales permeables al oxígeno y factores de crecimiento que afectan la proliferación. Este rasgo característico de esta tecnología puede disminuir la hipoxia, que es una desventaja inevitable del cultivo de esferoides. (8) (23)
- Levitación magnética. – Esta técnica se basa en la utilización de partículas magnéticas y se integra con hidrogeles según las condiciones dadas. Este sistema utiliza magnetofóresis negativa, que puede imitar una condición de ingravidez, por lo que, debido a la fuerza magnética, las células permanecen levitando contra la gravedad, esta condición induce el cambio de geometría de la masa celular y



promueve el contacto entre las células, lo que conduce a la agregación celular. Además, este sistema puede facilitar el co-cultivo multicelular con aglomeración de diferentes tipos de células. (24)

I.V CULTIVOS 3D EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS

Las terapias basadas en células son una alternativa prometedora en la regeneración de tejidos, los esferoides representan un enfoque para abordar las deficiencias de las células individuales que se inyectan o trasplantan libremente en el cuerpo, las cuales se eliminan rápidamente o se dificulta la permanencia en el sitio a regenerar ocasionando ya sea la migración o muerte.(25)

Durante las últimas dos décadas, los esferoides se han vuelto cada vez más relevantes para las aplicaciones de ingeniería de tejidos. Inicialmente se evaluaron las características de secreción de insulina de esferoides de tejido pituitario por su potencial como órganos endocrinos bio-artificiales, desde ese informe, (26) se ha expandido el uso de esferoides en aplicaciones de ingeniería de tejidos abordando diferentes tipos de tejidos.

Los esferoides pueden contribuir directa o indirectamente a la formación de tejido, en comparación con las células en monocapa, los esferoides secretan mayores concentraciones de factores tróficos que aceleran la angiogénesis, promueven la migración celular y modulan el microambiente inflamatorio local, lo que los hace ideales para la ingeniería de tejidos. Más allá de la secreción de factores endógenos, los esferoides se han propuesto como bloques de construcción prometedores para la fabricación de tejidos diseñados, ya que pueden agregarse aún más en el diseño de tejido grandes.

El uso de esferoides como bloques está basado en evitar las interrupciones en las interacciones célula-célula que pueden ocurrir cuando las células en monocapa se siembran en andamios, un desafío identificado en la ingeniería de tejidos vasculares.(25) Por otra parte la formación de esferoides dependiendo del tipo de célula se ha observado que aquellos formados por células madre pluripotentes humanas (hPSC) exhibieron una mayor capacidad de fusión que los agregados de células diferenciadas. Estos datos sugieren que existe un protocolo óptimo con respecto a la secuencia de fusión y diferenciación para cada fuente celular y tejido diseñado.(27) (28)

La formación y reparación ósea es una interacción entre la angiogénesis, impulsada por la señalización local de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), y la disponibilidad local de células encargadas de la regeneración, que puede lograrse trasplantando células diferenciadas o estimulando la diferenciación de las células huésped. La aplicación de los



esferoides generalmente van en conjunto con biomateriales que brinden soporte temporal al cultivo 3D. (28)

En cuanto a la regeneración de tejido óseo, al analizar el potencial de regeneración de los de esferoides de células madre mesenquimales osteo-inducidas se ha demostrado una regulación positiva de marcadores intermedios y tardíos de osteogénesis como osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP). OPN es una fosfoproteína de glicosilación secretada, no colágena, que se expresa durante las etapas temprana e intermedia de la osteogénesis, por otra parte, BSP también es una fosfoproteína ácida, no colágena, que normalmente se expresa en tejidos mineralizados como el hueso y la dentina. La sobre-regulación de estos genes sugiere que pueden fungir como una señal asociada a la matriz que promueve directamente la diferenciación osteogénica y resulta en una mayor producción de una matriz mineralizada en los esferoides de MSC. (29) Por otra parte, su análisis en defectos críticos en ratas demostró que a la 8va semana del implante del esferoide dichos defectos tenían un 50% de fuerza en comparación con el hueso sano sugiriendo que esta estrategia tiene la capacidad de inducir una respuesta osteogénica, mejorando el reclutamiento de osteoblastos en el sitio de implantación, en lugar de actuar como fuentes de hueso nuevo (30). Finalmente, cuando los esferoides son colocados sobre andamios que imitan la geometría de la matriz extracelular del hueso aumentan el potencial osteogénico, la disposición de las fibras del andamio juegan un papel importante en la reorganización del citoesqueleto que altera varias vías de señalización bioquímica, favoreciendo vías de señalización relacionadas con la osteogénesis, por lo que la combinación de los esferoides con andamios que logren imitar las características de la matriz ósea son una opción terapéutica que potencia la regeneración del tejido óseo.(31)

I.VI NECESIDADES DE REGENERACIÓN ÓSEA EN LA REGIÓN MAXILOFACIAL

La cavidad bucal es la región del cuerpo que más daño al tejido óseo tiene, esto es debido a las múltiples enfermedades que afectan el hueso que da soporte a los órganos dentarios aunado al riesgo de desarrollo de patologías o traumatismos que pongan en riesgo la integridad ósea.

Dentro de las afecciones más comunes que afectan a la cavidad bucal y al hueso se encuentra la enfermedad periodontal la cual se caracteriza por la destrucción de las estructuras de soporte del diente. Su persistencia y progresión causa pérdida de inserción, pérdida de hueso alveolar y la consiguiente movilidad de los dientes. (32) esta enfermedad se considera que ocupa el lugar número 11 de todas las enfermedades a nivel mundial,



estimándose una prevalencia del 20% al 50% a nivel mundial, siendo una de las principales causas de la pérdida de los órganos dentarios (33) Por otra parte, el desarrollo de neoplasias malignas en cavidad bucal es otra alteración que llega a desarrollar defectos óseos en dicha región, para el 2018 se estimó una incidencia de 354,864 casos a nivel mundial,(34)

Las anomalías craneofaciales y los defectos óseos resultantes de la pérdida ósea debido a un traumatismo, cirugía reconstructiva, neoplasia, defectos congénitos, infección o enfermedad periodontal presentan un problema difícil y desafiante para el profesional de la salud debido al reto que representa restaurar la forma, y función. Las terapias convencionales están dirigidas al uso de prótesis o injertos óseos, sin embargo, la eficacia de estas técnicas está limitada a la morbilidad del sitio donante, el alto costo y los recursos tisulares insuficientes. (35)

El proceso de cicatrización de fracturas y la reparación ósea son procesos posnatales que reflejan muchos de los eventos ontológicos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario del esqueleto. Se cree que la recapitulación de estos procesos ontológicos hace que la curación de fracturas sea uno de los pocos procesos posnatales que es verdaderamente regenerativo, restaurando el órgano esquelético dañado a su composición celular, estructura y función biomecánica previa a la lesión.(36)

El injerto óseo es uno de los métodos quirúrgicos más utilizados para aumentar la regeneración ósea en procedimientos ortopédicos. Más de dos millones de procedimientos de injerto óseo se realizaron anualmente en todo el mundo, que es el segundo trasplante de tejido más frecuente inmediatamente después de la transfusión de sangre. Los sustitutos óseos sirven principalmente como funciones combinadas de soporte mecánico y osteo-regeneración, que involucran tres propiedades biológicas importantes: osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis.(37)

Los injertos se pueden clasificar en tres principales grupos:

1. Autoinjertos óseos

Injertos de hueso autólogos. - Un injerto óseo extraído de un sitio anatómico y trasplantado a otro sitio dentro de los mismos individuos, con la posesión de propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas, un injerto óseo autólogo puede integrarse en el hueso huésped de manera más rápida y completa, por lo que se lo considera el estándar de oro en el tratamiento de defectos óseos y el punto de referencia en la evaluación de otros injertos y sustitutos óseos. Sin embargo, los inconvenientes del



autoinjerto se han informado ampliamente y están relacionados con el proceso de extracción, que incluyen complicaciones y dolor en el sitio donante, aumento de la pérdida de sangre, aumento del tiempo operatorio, potencial de infección del sitio donante y volumen limitado de material disponible. (38)

Los autoinjertos de esponjosa. – Consiste en el injerto de pequeños fragmentos de hueso esponjoso se caracteriza por contener pocos osteoblastos y osteocitos, pero abundantes células madre mesenquimales (MSC) las cuales sobreviven como resultado de la isquemia durante el trasplante, lo que ayuda a mantener el potencial osteogénico y la capacidad de generar hueso nuevo a partir del injerto. Además, la gran superficie de un autoinjerto esponjoso facilita la revascularización superior y la incorporación del injerto localmente al hueso huésped. Las proteínas derivadas del injerto, que se atribuyen a la osteoinducción del injerto, también se conservan y están presentes cuando los autoinjertos se tratan adecuadamente.

Los autoinjertos corticales poseen una excelente integridad estructural y son de soporte mecánico, debido a su número limitado de células osteoprogenitoras. A diferencia del injerto esponjoso autólogo, la sustitución progresiva del autoinjerto cortical está mediada principalmente por osteoclastos tras la rápida formación de hematomas y la respuesta inflamatoria en la fase temprana de la regeneración ósea, ya que los procesos de revascularización y remodelación se ven estrictamente obstaculizados por la densa arquitectura. En consecuencia, el crecimiento óseo aposicional sobre un núcleo necrótico es el medio dominante de incorporación del autoinjerto cortical después de la resorción de los osteoclastos. Este proceso puede llevar años, según el tamaño del injerto y el lugar de implantación.

2. Injertos alogénicos

Se refiere al tejido óseo que se extrae de un individuo y se trasplanta a un individuo genéticamente diferente de la misma especie [57], [58]. Teniendo en cuenta la limitación de los injertos óseos autólogos, el aloinjerto óseo se considera la mejor alternativa a los autoinjertos y se ha utilizado eficazmente en la práctica clínica en muchas circunstancias, especialmente para aquellos pacientes con escaso potencial de curación, pseudoartrosis establecida y conminación extensa después de fracturas. El aloinjerto se puede mecanizar y personalizar y, por lo tanto, está disponible en una variedad de formas, que incluyen



derivados óseos corticales, esponjosos y altamente procesados (es decir, matriz ósea desmineralizada). En comparación con los autoinjertos, se ha descubierto que los aloinjertos son inmunogénicos y muestran una mayor tasa de fallos, que se cree que es causada por la activación de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La fase inicial de osteoinducción sería destruida por la respuesta inmune y las células inflamatorias, que podrían rodear rápidamente al neovascular, provocando la necrosis de las células osteoprogenitoras. Incluso el mecanismo exacto de la respuesta inmune en la incorporación de aloinjertos óseos no está claro; Los estudios han encontrado que la aceptación del aloinjerto mejora cuando se reduce la inmunogenicidad modificando el aloinjerto para estrechar las diferencias de histocompatibilidad. Otro problema es el riesgo de transmisión viral, que se ha mejorado significativamente con el desarrollo de bancos de tejidos modernos y la mejora de la tecnología de procesamiento. En función de estas situaciones, la aplicación de aloinjertos frescos siempre es limitada y los aloinjertos modificados conservados suelen ser los preferidos en las prácticas clínicas.

3. Injertos sintéticos

La grave escasez de injertos óseos naturales ha desencadenado el desarrollo del mercado de injertos y sustitutos óseos (BGS). Las cerámicas de sulfato de calcio, fosfato de calcio (CaP), cementos de CaP, vidrio bioactivo o combinaciones de los mismos son los sustitutos óseos sintéticos más comúnmente disponibles en la actualidad.(37)

Debido a la gran necesidad de regeneración ósea que tiene la cavidad bucal y la región del macizo facial se han estado creando nuevas estrategias de regeneración que compensen las limitaciones que representan los autoinjertos, una de ellas es la aplicación de cultivos 3D, los cuales ha demostrado tener un alto potencial en la síntesis de tejido nuevo, si bien ya se encuentra descrito como es el mecanismo de formación de estas estructuras tridimensionales aún no se cuenta con amplia información acerca de cómo es la organización celular dentro de la estructura del esferoide por lo que se llevó a cabo el siguiente proyecto de investigación.



IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

En la región maxilofacial hay una importante necesidad de regeneración de tejido debido a la etiología multifactorial, el estándar de oro en la regeneración del tejido óseo son los autoinjertos, sin embargo, estos tienen algunas desventajas como la necesidad de un segundo sitio quirúrgico, la disponibilidad de tejido en el caso de defectos óseos grandes y finalmente el riesgo de infección, por lo que ha habido la necesidad de estudiar nuevas estrategias de regeneración ósea que incluyen el uso de cultivos en 3D los cuales han demostrado tener el potencial de mimetizar los tejidos *in vivo*. Por ello, el conocer la organización celular de los esferoides de osteoblastos y su capacidad de formación de matriz mineralizante permitirá comprender como es la dinámica de la organización de estas estructuras, así como su potencial de regeneración de tejido óseo. Sin embargo, es poca la información acerca de cómo es la organización celular dentro de la estructura esferoidal por lo que se plantean las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cómo es la organización celular de los esferoides de osteoblastos?
- ¿Cómo es la expresión de marcadores relacionados con la mineralización en los esferoides de osteoblastos?



V. OBJETIVOS

Objetivo General

Sintetizar y caracterizar esferoides de osteoblastos para su aplicación en la regeneración de tejido óseo.

Objetivos Específicos

- Determinar el crecimiento y viabilidad de los esferoides.
- Analizar la morfología y organización celular de los esferoides.
- Establecer la expresión de marcadores relacionados con la mineralización de la matriz osteoide.



VI. HIPÓTESIS

La organización celular de los esferoides de osteoblastos permitirá evaluar la morfología 3D y el análisis de expresión de marcadores relacionados con la formación de tejido mineral.

VII. METODOLOGÍA

- **Cultivo celular**

Se cultivaron y expandieron osteoblastos fetal humanos (hFOB 1.19 ATCC® CRL-11372) cultivado en medio de cultivo (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml) y 100 mM de L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. Una vez que lleguen a 90% de confluencia se utilizaron para realizar la formación de esferoides. Asimismo, los esferoides obtenidos de hFOB fueron cultivados en medio osteogénico compuesto por 50 µM de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato y 10⁻⁷ M de dexametasona.

- **Síntesis de Esferoides**

Una vez que los cultivo en monocapa e los hFOB presento una confluencia del 80-90% fueron sometidos a la acción de la tripsina para realizar el conteo celular con azul de tripano y cámara de Neubauer. Para la formación de los esferoides se utilizó el método de superposición de líquidos, el plato de cultivo se cubrió con agarosa al 1%, posterior a su solidificación fueron sembradas aproximadamente entre 3x10³ células/ml, con la finalidad de determinar el número de células necesario para la correcta formación y manipulación del esferoide.

- **Crecimiento de los esferoides**

Para poder analizar cómo es el crecimiento de los esferoides se llevó a cabo la formación de los mismos con la técnica antes descrita a una densidad de 3x10³ células/ml, manteniendo el cultivo durante 1, 3, 7, y 14 días. Se realizó el seguimiento mediante microfotografías tomando mediciones con el programa AMSCOPE. El análisis fue realizado con una n = 10 esferoides por día de seguimiento para obtener la media del diámetro del crecimiento.

- **Tinción cristal violeta**

Para realizar un primer análisis relacionado a la morfología de las células que conforman el esferoide se realizaron tinciones con cristal violeta; al tercer día de la formación de los mismos fueron fijados con 4% paraformaldehído (PFA) e incubados durante 24 h, posteriormente se retiró el PFA y se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua



desionizada. Los esferoides se incubaron con 0.1% de la solución de cristal violeta por 15 minutos, se retiró el cristal violeta y posteriormente fueron realizados lavados con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Finalmente se observaron los esferoides bajo microscopía óptica.

- **Ensayo de Viabilidad Celular**

Para realizar evaluar la viabilidad de los esferoides incubados a 1, 3, 7 y 14 días de cultivo, se utilizó el ensayo de resazurina (Resazurin Cell Viability Assay Kit). Pasado el tiempo de cultivo, se adicione la sal de resazurina al 10% (v/v) por lo cual para cada pozo de cultivo del esferoide se agregaron 200 μ l y se incubaron por 24 h para poder asegurar la penetración del reactivo en la estructura del esferoide. La reducción del reactivo que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción no fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular fue medida a una absorbancia de 545 nm utilizando un lector de microplacas (ChroMate, Awareness Technology). El ensayo se realizado por triplicado, utilizando el cultivo en monocapa como control de la viabilidad.

- **Ensayo de fluorescencia (CellTracker™)**

Para realizar los ensayos por fluorescencia se realizó mediante el kit de Cell Tracker™ Green CMFDA Dye (Invitrogen). Brevemente, los cultivos de HFOB a 80-90% de confluencia se incubaron con CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) en un medio libre de rojo fenol a 37°C por 30 minutos, a continuación, el cultivo celular fue lavado con PBS e incubado por una hora con medio completo. Posteriormente las células hFOB fueron tripsinizadas, y se contó a la concentración celular deseada (3×10^3 células/ml) e incubados a 1, 3, 7 y 14 días de cultivo. Finalmente fueron observados utilizando microscopía de epifluorescencia base LED (modelo T670Q-PL-FLLED-B, AMSCOPE).

- **Cortes histológicos**

Para realizar un análisis más detallado acerca de la organización celular de los esferoides fueron realizados cortes histológicos a 2 μ m. Se analizaron esferoides a los días 3, 7 y 14, días de cultivo, los cuales fueron fijados en 4% de formaldehído hasta su procesamiento. Fueron sometidos a un proceso de deshidratación con soluciones de formol/acetona al 70%, 80%, 90%, 100% y xilol/acetona por 10 min, posteriormente fueron incluidos en



parafina grado histológico. Se realizaron cortes histológicos con microtomo manual a 2 μm . Posteriormente las laminillas fueron desparafinadas en estufa a 58°C por 30 min, y en xilol por 10 minutos y finalmente fueron realizados lavados con alcohol-xilol, alcohol absoluto, alcohol a 96% y agua. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta realizar las tinciones pertinentes.

- **Tinción con hematoxilina y eosina (HvE)**

Se procedió a teñir las laminillas con hematoxilina de Harris por 3 minutos, se realizaron lavados con agua corriente para eliminar el exceso de colorante, posteriormente se realizó un pase rápido en alcohol ácido y alcohol al 96^o, posteriormente fueron colocadas en Eosina durante 30 segundos, finalmente fueron realizados lavados con alcohol al 96% y absoluto para finalmente ser montadas en resina para su análisis en microscopio óptico.

- **Tinción tricómico de Masson**

Una vez que las laminillas fueron desparafinadas se colocaron en solución de Bouwin durante 10 minutos a 58°C, posteriormente las laminillas se colocaron en hematoxilina de Weigert, escarlata de Biebrich, ácido de Masson y azul de anilina durante 10 minutos cada uno, finalmente fueron lavadas en agua destilada y montadas en resina para su análisis en microscopio óptico.

- **Tinción de alizarina roja**

Las laminillas desparafinadas fueron colocadas en solución de alizarina roja al 2% por 10 minutos, se realizaron lavados con acetona y acetona-xilol para finalmente ser montadas en resina para su análisis.

- **Inmunohistoquímica**

Se procedió a realizar nuevamente cortes histológicos a 2 μm y colocarlos en laminillas silanizadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica; se procedió a desparafinar en xilol por 15 minutos y alcoholes a distintas concentraciones por 10 minutos (absoluto, 90%, 70%, 50% y 30%). Posteriormente se procedió a la recuperación antigénica con sustrato de sodio a 1:10% pH 6.2, se utilizó el kit de DAKO lote 00055075 Ref. K5204, el bloqueo de la peroxidasa endógena por 8 minutos, se efectuaron lavados con agua destilada, finalmente las laminillas se dejaron en reposo durante cinco minutos en amortiguador de fosfato salino. El tejido se incubó durante 45 minutos con los anticuerpos primarios marca Santa Cruz



Biotechnology (osteocalcina sc-30044, OPN sc 20788, BSP II sc 292393), para detección de la reacción se utilizó 3,3'-diaminobenzidina- H_2O_2 (DAKO) como sustrato bajo el microscopio por 5 minutos, las reacciones fueron contrastadas en Hematoxilina de Harris por 10 segundos y montadas en resina para su análisis en microscopio óptico.

- **Análisis de resultados**

La descripción de los datos se realizó de forma descriptiva, en el caso de las variables cuantitativas, se reportaron medidas de tendencia central (media) y medidas de dispersión (desviación estándar). Para el análisis de las diferencias entre grupos se realizó la prueba ANOVA, Se tomo como valor estadísticamente significativo $p < 0.5$. el análisis de realizo en el programa SPSS V.25.

VIII. RESULTADOS

a) Crecimiento y viabilidad de los esferoides

Para la formación de los esferoides por lo que se realizó por la técnica de superposición de líquidos a una densidad de 3×10^3 células/mL y por medio de microfotografías se realizó el seguimiento a los 14 días de cultivo celular.

En la figura 7 se observa que para las 24 h de cultivo las células se agrupan formando los primeros indicios de una estructura esferoidal (figura 7A), para el día 3 se identifica una estructura redonda bien delimitada (figura 7B) la cual se mantiene estable a los días 7 hasta el día 14 de cultivo celular (figura 7C y D).

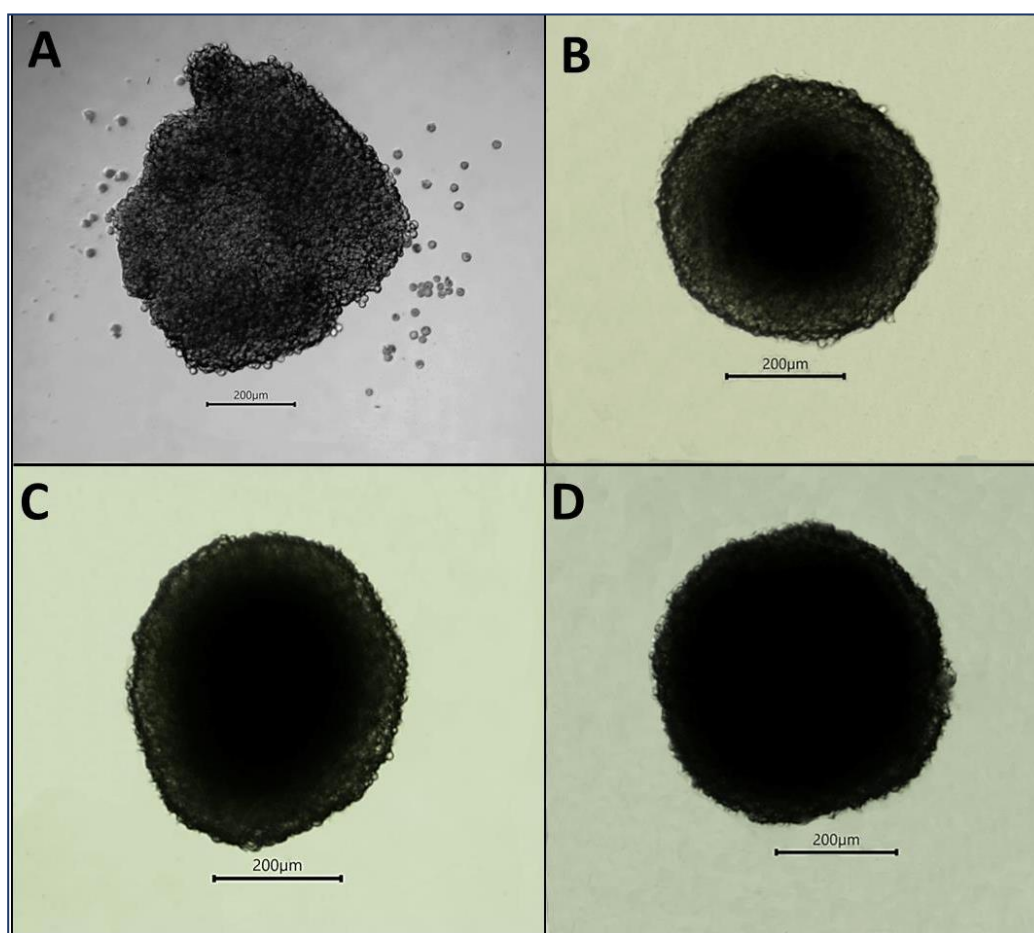


Figura 7. Morfología de los esferoides a 1, 3, 7 y 14 días de cultivo celular. Las microfotografías fueron adquiridas con el objetivo a 10X. Se observa la formación y crecimiento **A)** 1 día, **B)** 3 días, **C)** 7 días y **D)** 14 días. Barra de escala = 200 μm .

De forma paralela se analizó el crecimiento de los esferoides, tomando mediciones del diámetro de su estructura con una de $n = 10$ esferoides por día de seguimiento. Al día uno de cultivo se obtiene un diámetro de $649.85 \pm 15.15\mu\text{m}$, el cual se observa que se compacta a partir del día 3 de cultivo con un valor medio de 497.60 ± 8.03 , para el día 7 se tiene un diámetro de $484.87 \pm 5.36\mu\text{m}$ y para el día 14 con un valor de $495.93 \pm 7.45\mu\text{m}$. De las medidas se observa que del día 3 al 14 el tamaño del esferoide se mantiene estable sin presentar variaciones mayores lo cual nos indica la compactación que sufre la agregación de osteoblastos para mantener la estructura del esferoide (Gráfico 1).

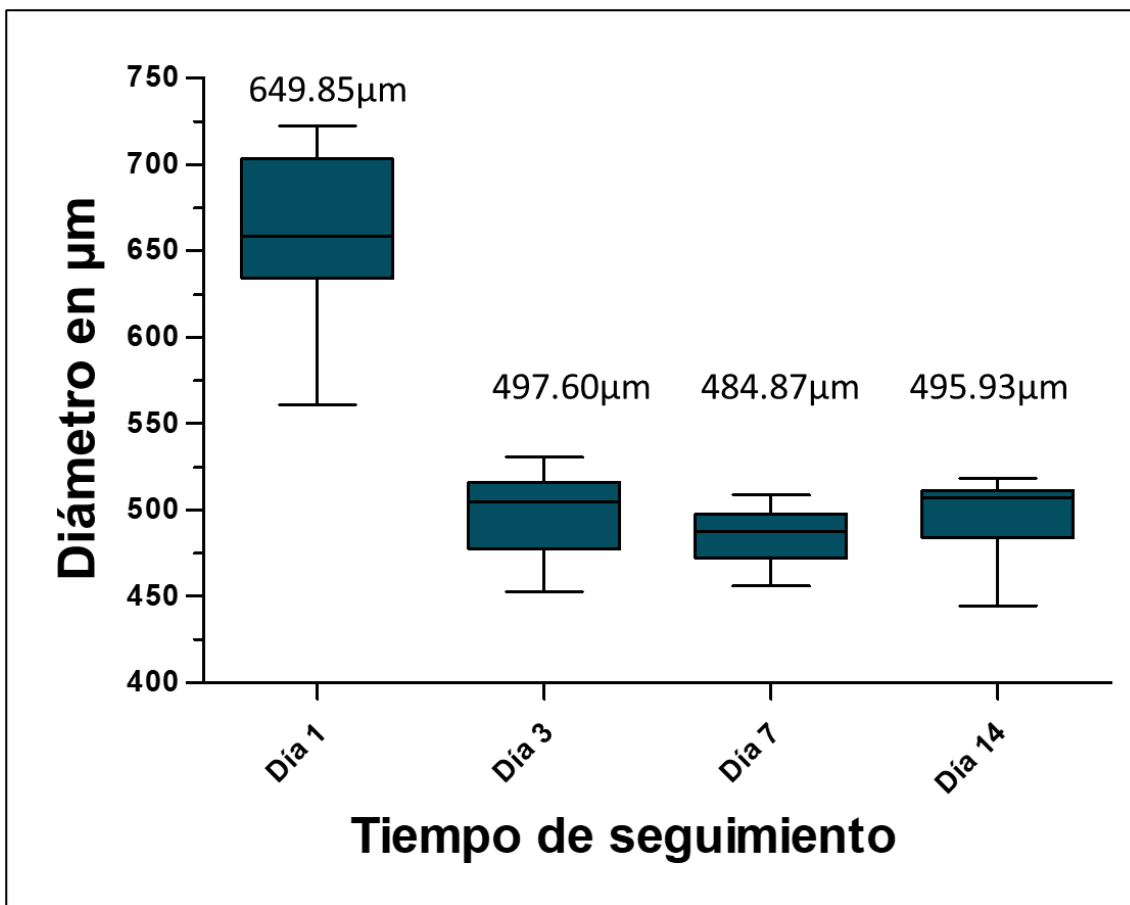


Gráfico 1. Crecimiento de los esferoides a 14 días de seguimiento, media del diámetro en micras.

Una vez que se observó un crecimiento estable de los esferoides se procedió a medir la viabilidad de los mismos, para esto se utilizó un método cuantitativo y cualitativo, ambos basados en el metabolismo celular, como control se utilizaron células de osteoblastos en cultivo en monocapa.

El primer ensayo se llevó a cabo con resazurina al 10% observando que ambos tipos de cultivos mantienen una viabilidad progresiva durante los 14 días de cultivo celular, presentando mayores valores de absorbancia el cultivo en monocapa, lo que indica que nuestros esferoides están viables y compactándose como lo demuestra los valores del diámetro obtenidos en la gráfica-1. Al realizar el análisis de varianza se observaron diferencias estadísticas entre ambos tipos de cultivo a $p < 0.05$ (Gráfico 2).

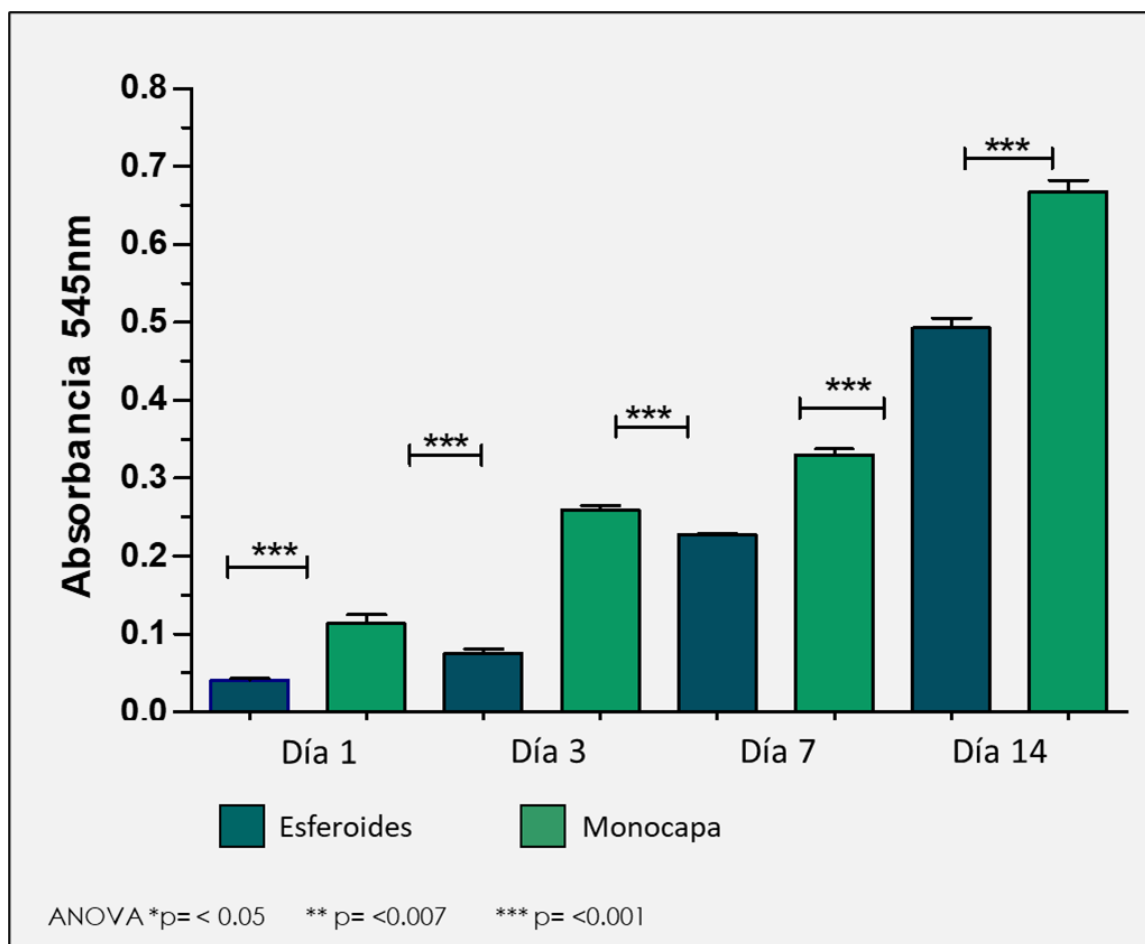


Gráfico 2. Viabilidad celular de los esferoides a 1, 3, 7 y 14 días de cultivo en comparación con los cultivos en monocapa de los hFOB. Se observa un crecimiento progresivo en la viabilidad para ambos tipos de cultivos durante los 14 días de cultivo.

Por otra parte, para evaluar la agregación celular y obtener imágenes de la viabilidad del esferoide se llevó a cabo un seguimiento con el kit Cell Tracker (figura 8). La figura 8A se aprecia la agregación celular que nos indica la interacción célula-célula que está llevándose a cabo a 24 horas de cultivo y la figura 8B muestra la compactación del esferoide a los 14 días de cultivo, el cual se mantiene viable, además se puede apreciar el tamaño del esferoide donde puede visualizar que las células se encuentran viables debido a que el cromóforo se encuentra dentro de las células y nos permite visualizar con detalle la interacción entre ellas.

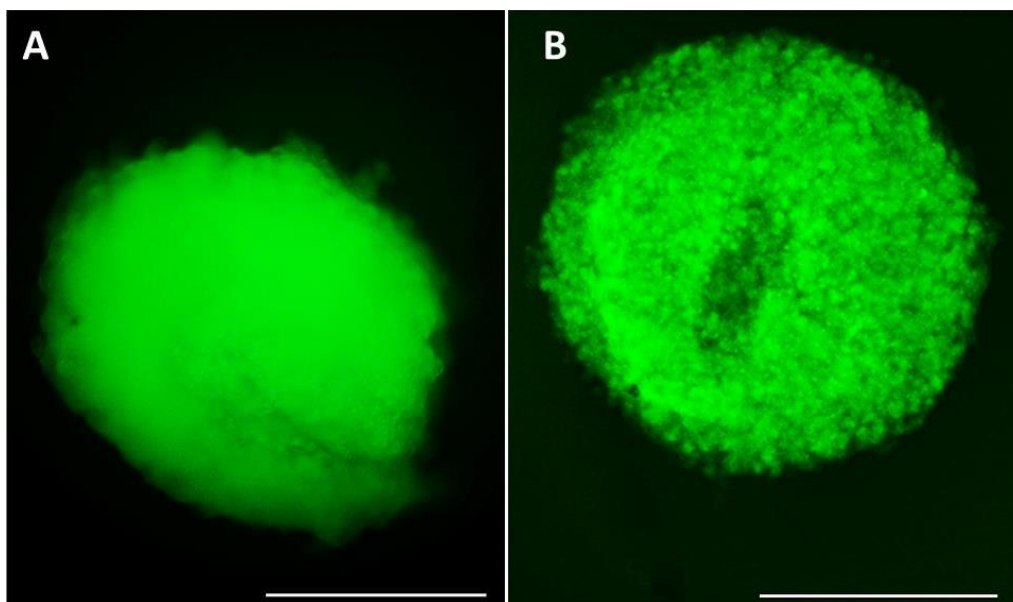


Figura 8. Imágenes correspondientes al ensayo de viabilidad por Cell Tracker a 40X. **A)** Agregación y morfología por fluorescencia a 1 de cultivo y **B)** a los 14 días de cultivo celular. Barra de escala = 200 μm .

Para abundar más sobre las diferencias morfológicas que se dan entre las células hFOB en monocapa y en el esferoide se realizaron tinciones con cristal violeta al tercer día de cultivo. Como se puede observar en la figura 9A, las células hFOB en el cultivo en monocapa adquieren una morfología característica de osteoblastos fetales que va desde células cuadradas, triangulares, ovoideas con múltiples proyecciones citoplasmáticas que establecen conexiones con las células vecinas y que indica su adhesión a la superficie del plato de cultivo celular. Por otra parte, las células que conforman el esferoide adquieren una morfología redonda donde se da la agregación y que a una magnificación se puede ver la interacción vía membrana celular (figura 9B).

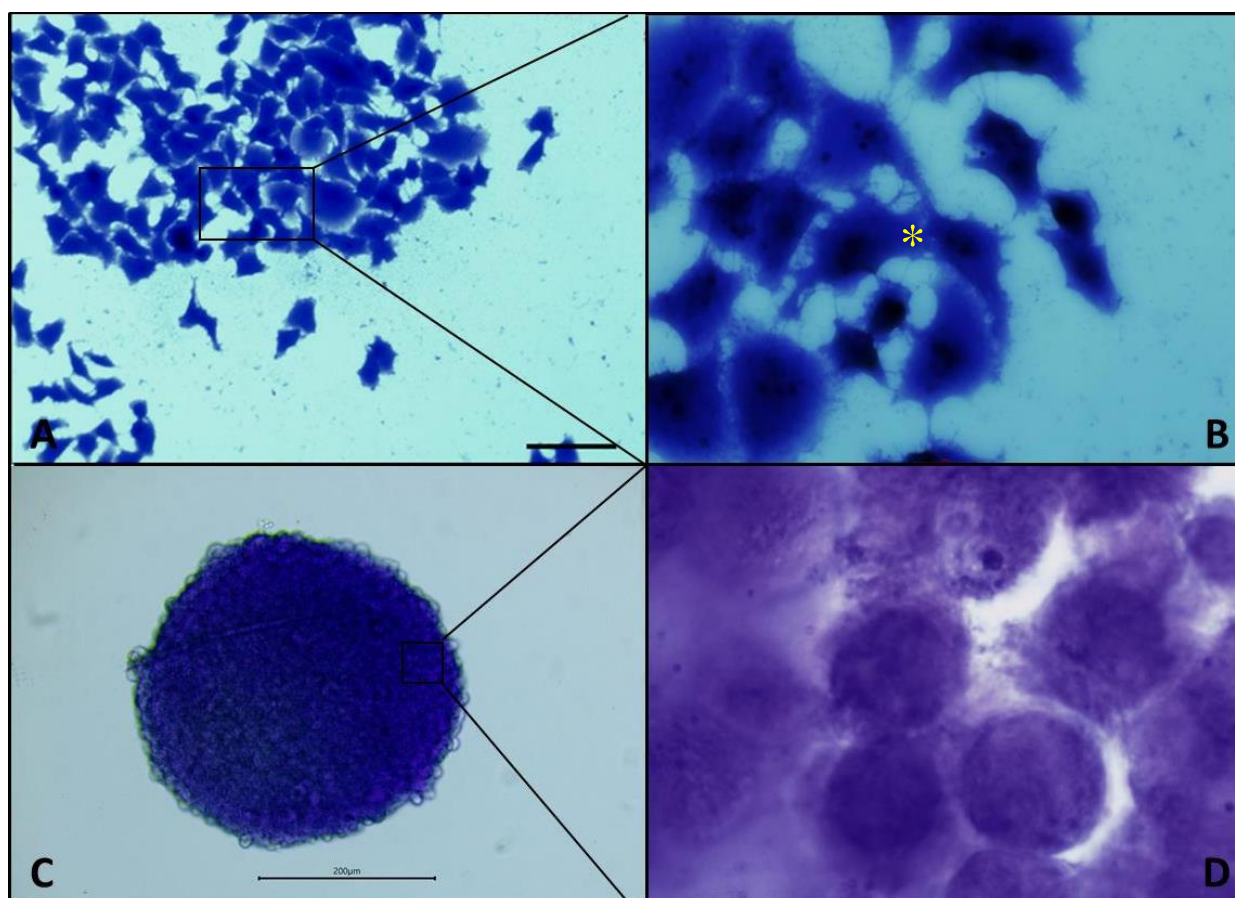


Figura 9. Tinción de cristal violeta **A)** y **B)** cultivo de esferoides en monocapa a 10 y 40X respectivamente. El asterisco en color amarillo marca las proyecciones citoplasmáticas de las células que establecen conexión con células vecinas. **C)** y **D)** cultivo en esferoides a 20 y 40X respectivamente donde se observa la agregación celular que conforma el esferoide. Barra de escala = 200 µm



Posteriormente para realizar un análisis más detallado acerca de la organización de las células dentro de la estructura del esferoide se procedió a realizar cortes histológicos y tinciones con HyE de los esferoides a los días 3, 7, y 14 días de cultivo celular en medio normal (DMEM) y medio inductor de la osteogénesis (Figura 10 y 11).

Primeramente, se analizaron los esferoides cultivados bajo medio normal, la estructura morfológica que corresponden al día 3 de cultivo a 10X hay un conglomerado de células dispuestas en monocapa en su parte central y con moderada sobreposición en la periferia; al considerar las células de forma individual tienen un núcleo grande, redondo, algunos ovoides de aspecto vesiculoso y algunos más con contorno irregular con ocasionales hendiduras, se observa también marcado pleomorfismo principalmente en las células que se ubican en la periferia (figura 10A), en las magnificaciones de 40X y 100X se identifica cromatina grumosa, algunos núcleos son hipercromáticos y en otros se identifican uno o varios nucleolos prominentes (Figura 10B y C). Asimismo, al día 7 de cultivo celular se mantiene la celularidad homogénea y al realizar el análisis a mayor aumento se observó que las células presentan citoplasma eosinófilo granular abundante de contornos bien definidos en la periferia, cohesivos y fusionados hacia el centro del agregado celular. Al día 14 hay una reorganización celular que lleva a una disminución en el número de éstas, tanto en la periferia como en el centro del esferoide, si bien se sigue observando el patrón pleomórfico, este es menor que en los días 3 y 7 (Figura 10 G, H e I).

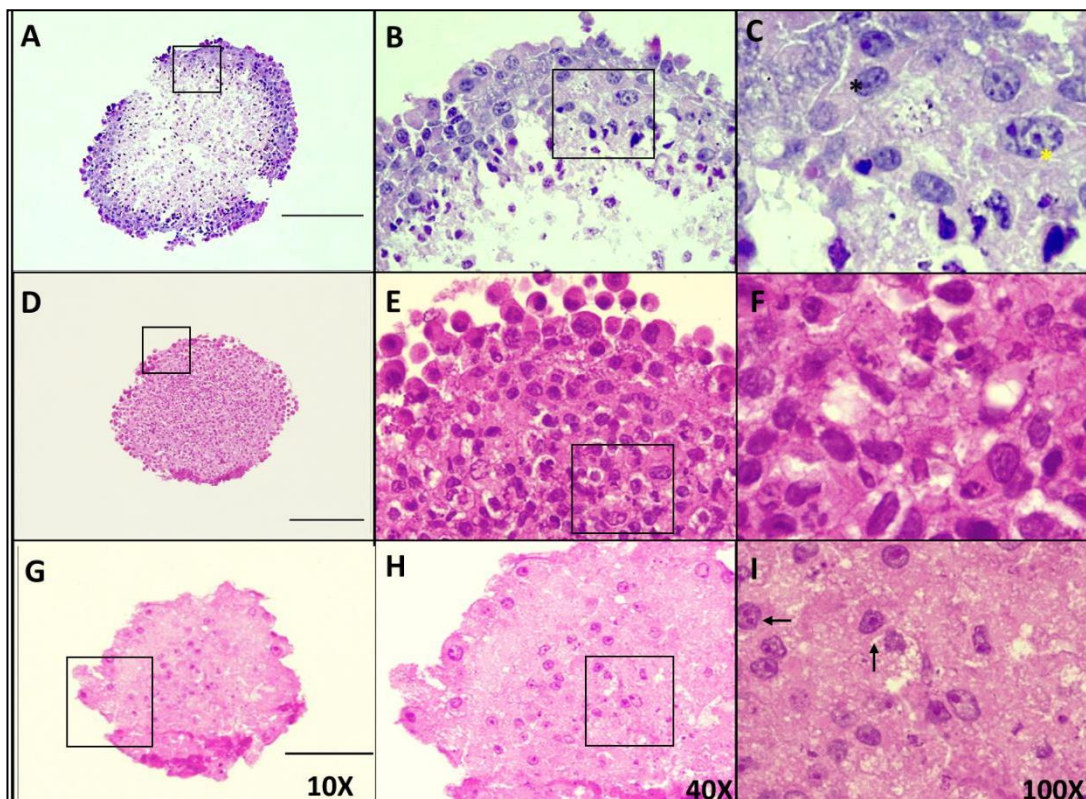


Figura 10 Tinción HyE de los esferoides. **A, B** y **C)** cultivo a 3 días, asterisco negro marca mitosis aberrantes, asterisco amarillo marca células pleomórficas y granulares. **D, E** y **F)** cultivo día 7 y **G, H,** e **I)** cultivo a día 14, las flechas marcan las células pleomórficas. El recuadro indica las magnificaciones en los esferoides. Barra de escala = 200 μ m



Posteriormente se realizó el análisis de la morfología de los esferoides cultivados bajo el medio osteogénico (Figura 11). Como se puede apreciar a los 3 días de cultivo hay presencia de importante celularidad de manera generalizada tanto en el centro como en la periferia del esferoide (figura 11A), en las magnificaciones de 40X y 100X se observan células pleomórficas e hiper cromasia nuclear, también es posible identificar múltiples nucleolos y las células tienen apariencia granular, es claro el pleomorfismo que presentan las células en la mayor parte de los campos (Figura 11B y C) A los 7 días se mantiene la celularidad observada en el periodo anterior, sin embargo, algunas células se observan más hiper cromáticas y menos granulares, lo cual puede sugerir un proceso de estabilización del esferoide (Figura 11 D, E y F). Por último, en los esferoides a los 14 días se aprecia una disminución de elementos celulares, la hiper cromasia, el aspecto granular y el pleomorfismo disminuyen a diferencia de los dos periodos anteriores, y son claros los espacios que suelen ser ocupados por la matriz extracelular, (Figura 11 G, H e I).

Al realizar la comparativa de ambos grupos podemos dilucidar que en los esferoides en medio osteogénico hay una disminución de la celularidad respecto a los días 3, 7 y 14 días lo que nos indica que en este grupo se está llevando una reorganización celular debido a que se están secretando MEC debido a la inducción de la osteogénesis.

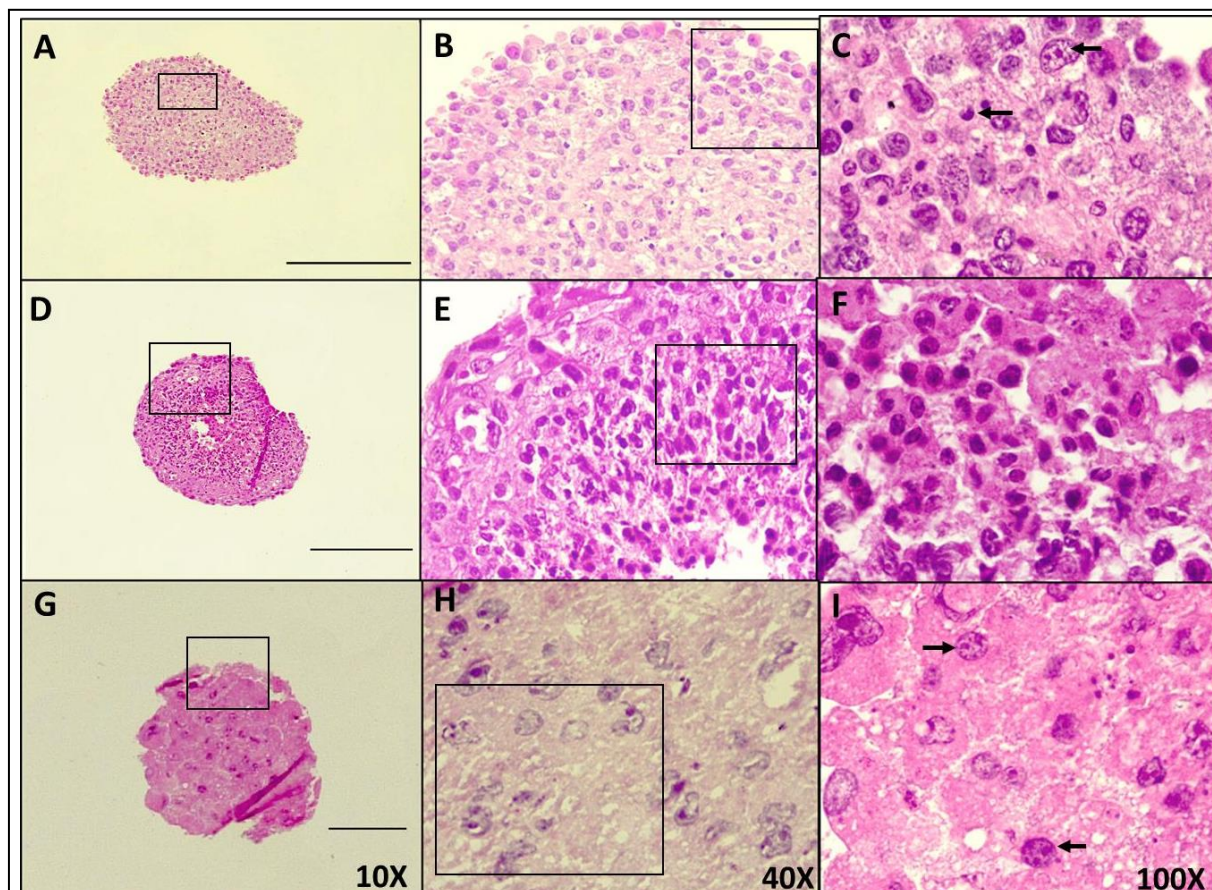


Figura 11. Tinción HyE de los esferoides bajo medio de cultivo osteogénico. **A, B y C)** microfotografías de los cortes histológicos de los esferoides al 3 día de cultivo. Las flechas marcan células pleomórficas e hiper cromasia nuclear.

D, E, y F) cortes histológicos de los esferoides a 7 días de cultivo celular.

G, H e I) análisis de cortes de los esferoides a 14 días de cultivo. Las flechas indican las células con núcleos atípicos. El recuadro marca las magnificaciones a 40X y 100X en los esferoides.

Barra de escala = 200 μ m



Para complementar el análisis morfológico se realizaron tinciones de tricómico de Masson con la finalidad de evaluar la presencia de colágeno la cual correspondería al elemento fundamental de la matriz extracelular, esta tinción se caracteriza por marcar en color azul las fibras de colágeno tipo I y en coloración rosado el citoplasma.

En los esferoides formados en medio DMEM se observó al tercer día la presencia de fibras de colágeno marcadamente presentes en el centro del esferoide delimitando de manera continua la celularidad localizada en la periferia de la estructura confirmando lo ya analizado en la tinción HyE, mayor celularidad en la periferia y marcada presencia de matriz extracelular en el centro del esferoide (Figura 12 A, B y C). Al día 7 se observa una marcada disminución de las fibras de colágeno debido al aumento en la celularidad de manera generalizada, por lo que se puede resumir en que el tricómico fue negativo para el marcaje de fibras de colágeno debido a la reorganización celular y una activa proliferación celular (Figura 12 D, E y F). Por último, para el día 14 se observa un marcaje azul en el centro del esferoide lo que corresponde a un incremento en la presencia de fibras de colágeno, con negatividad de la tinción en la periferia de la estructura, debido a la densidad celular (Figura 12 G, H e I)

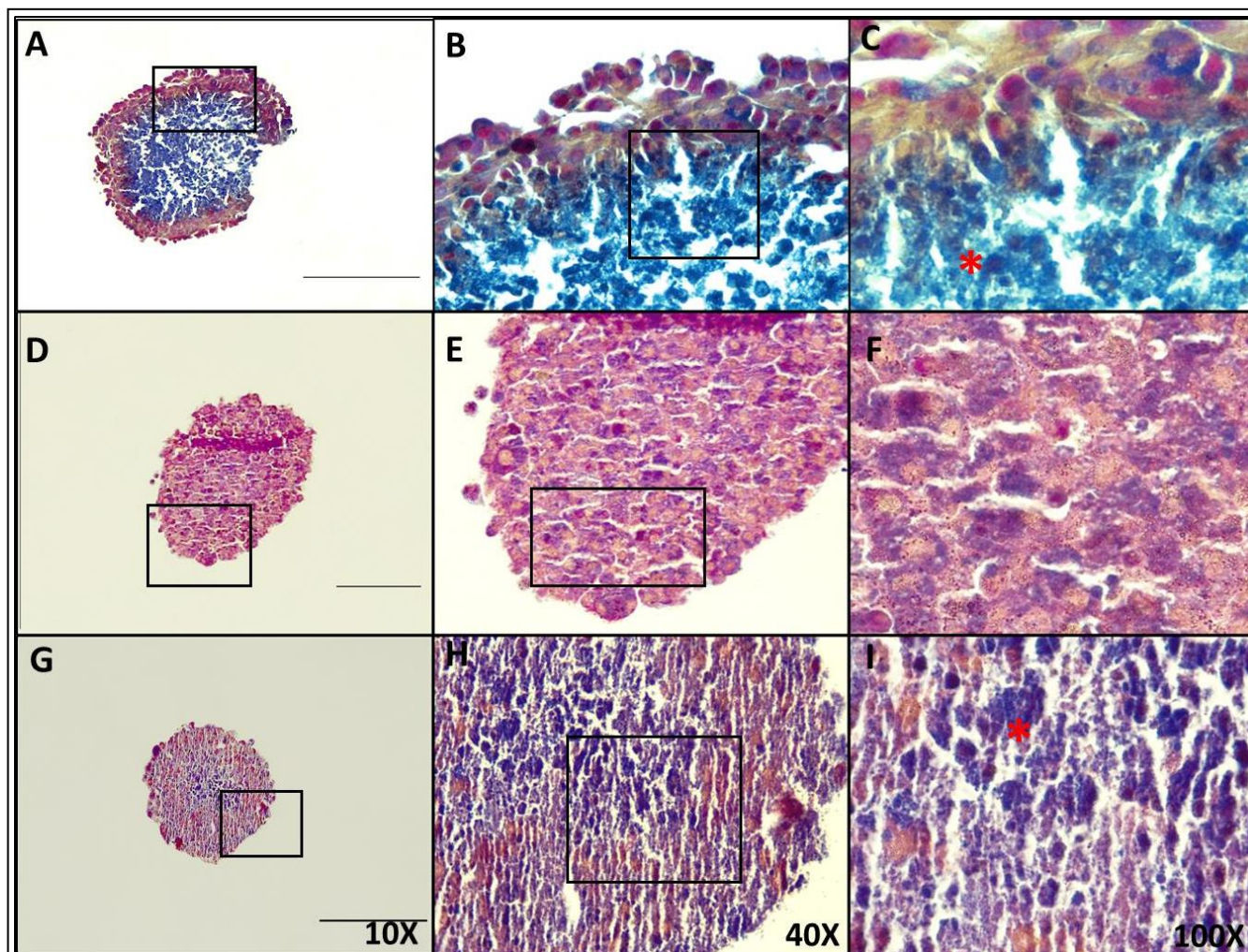


Fig. 12.- Tinción de tricómico de Masson de esferoides en medio osteogénico. **A, B, C)** día 3 de cultivo, **D, E, F)** día 7 de cultivo, **G, H, I)** día 14 de cultivo. Los asteriscos rojos indican las zonas de positividad de la tinción. Barra de escala = 200 μ m

Por otra parte, en el grupo de esferoides que crecieron en medio osteogénico se observó que al tercer día de cultivo aparentemente no hubo positividad para la tinción, sin embargo, al realizar un análisis minucioso a mayor aumento se identificó escaso marcaje de coloración azul correspondientes aparentemente a las fibras de colágeno de la matriz extracelular, confirmando lo observado en la tinción de HyE que en esta etapa de formación hay una abundante celularidad de alrededor del 90% con poca presencia de matriz extracelular (Figura 13 A, B y C). Para el 7 día de cultivo no se observó una tinción de las

fibras de colágeno (Figura 13 D, E y F); y para el día 14 se observan indicios de la reorganización celular apreciando zonas centrales del esferoide con positividad leve para la presencia de fibras de colágeno (Figura 13 G, H e I)

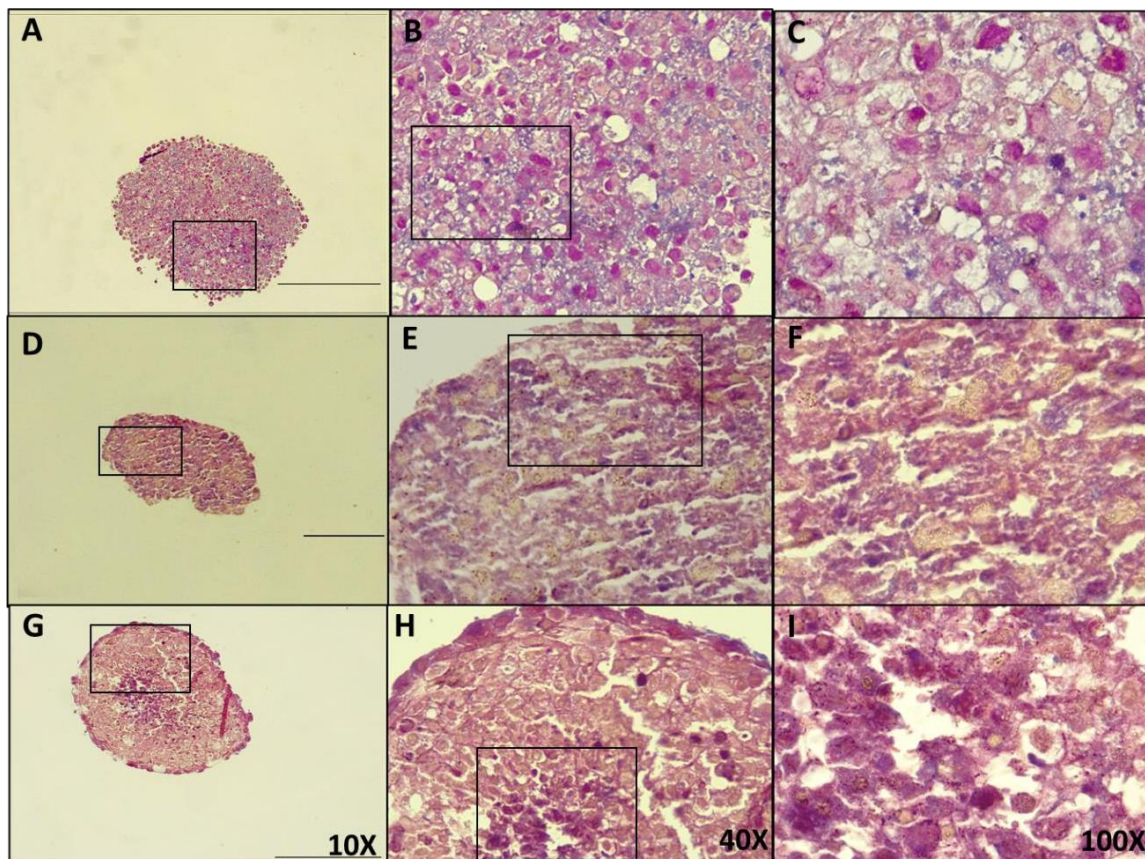


Figura 13.- Tinción de tricómico de Masson de esferoides en medio osteogénico, las imágenes **A), B)** y **C)** corresponden al tercer día de cultivo en el que se observa escasa positividad. **D, E, F)** conciernen al día siete de cultivo, **G, H, I)** día 14 de cultivo, apreciando en estos dos últimos grupos de imágenes negatividad para la tinción.

Finalmente, dentro del análisis morfológico de los esferoides de osteoblastos se realizaron tinciones de alizarina roja S (ARS) para identificar la presencia de depósitos de calcio y así ver la capacidad de mineralización de la estructura tridimensional.

En los esferoides que se mantuvieron en medio convencional (DMEM) se observó que para el día 3 de cultivo se observa una ligera tinción figura 14 A, B y C), para el día 7 se observa un incremento en la tinción de ARS en la parte central del esferoide (figura 14 D, E y F); y para el día 14 se observa que los depósitos de calcio se identifican tanto en la parte central como en la periferia de la estructura del esferoide (Figura 14 G, H e I).

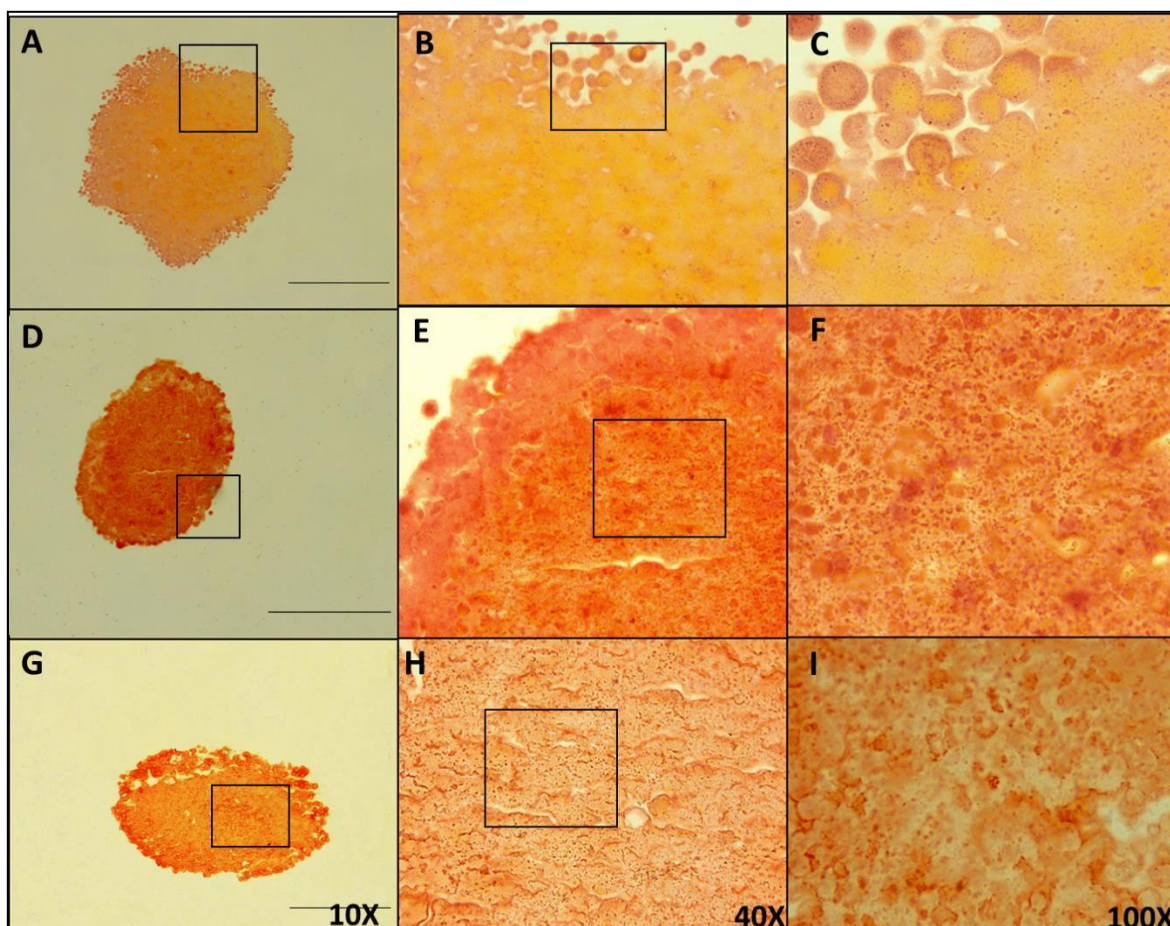


Figura 14.- Tinción de Alizarina roja de esferoides en medio D-MEM **A, B, C)** día 3 de cultivo, **D, E, F)** día 7 de cultivo y **G, H, I,)** día 14 de cultivo.

En cuanto a la tinción de ARS correspondiente al grupo de esferoides en medio osteogénico se observó la presencia de depósitos de calcio desde el día 3 de cultivo el cual se apreció de manera más localizada y correspondiendo al 10% de la totalidad del esferoide, donde la positividad es intensa (Figura 15 A, B y C). Para el día 7 se aumentó la positividad de ARS tanto en expresión como en número con mayor al 90% de la estructura del esferoide, localizándose tanto en la zona central como en la periferia (Figura 15 D, E y F). Finalmente, a los 14 días de cultivo se mantiene el 90% de positividad de la tinción de ARS con el mismo patrón que a los 7 días (Figura 15 G, H e I).

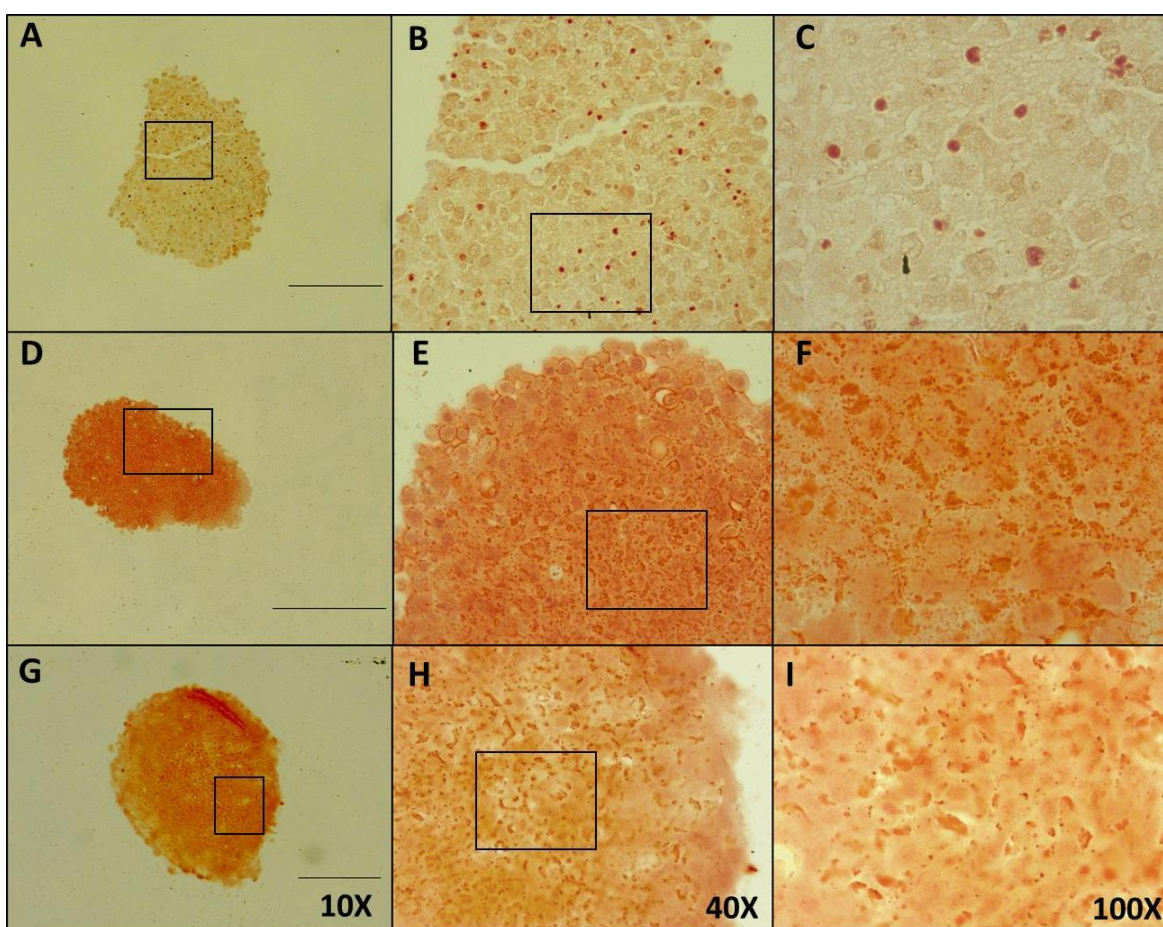


Figura 15.- Tinción de Alizarina roja de esferoides en medio osteogénico **A, B, C)** día 3 de cultivo, **D, E, F)** día 7 de cultivo y **G, H, I,**) día 14 de cultivo.



Al analizar en conjunto ambos grupos podemos dilucidar que el esferoide tiene la capacidad de formar depósitos de calcio a partir del día 7 de cultivo.

Finalmente, con el objetivo de analizar la expresión de marcadores relacionados con la mineralización de la matriz osteoide se realizó por medio de inmunomarcaje la detección de osteocalcina (OC), osteopontina (OPN) y la sialoproteína ósea (BSP). Esto fue realizado en ambos grupos de esferoides incubados con medio normal (DMEM) y medio osteogénico. Al analizar la expresión de dichos marcadores en el grupo de esferoides formados en medio DMEM se observó que la proteína BSP al tercer día de cultivo se detecta una positividad de manera leve (figura 16A), al día siete se identificó una intensa positividad en la zona periférica y central de la estructura esferoidal (figura 16B) y continuando con la misma intensidad de positividad en el patrón de expresión para el día 14 (figura 16C). Asimismo, la inmunoexpresión de OPN a los 3 y 7 días de cultivo se aprecia una positividad moderada con localización difusa (figura 17 A y B) y para el día 14 se observó la positividad principalmente en la parte periférica con presencia difusa en la parte central del esferoide (figura 17C). Por último, inmunoexpresión de la proteína OC se identificó con una positividad leve a los 3, 7, y 14 días de cultivo de los esferoides (Figura 18).

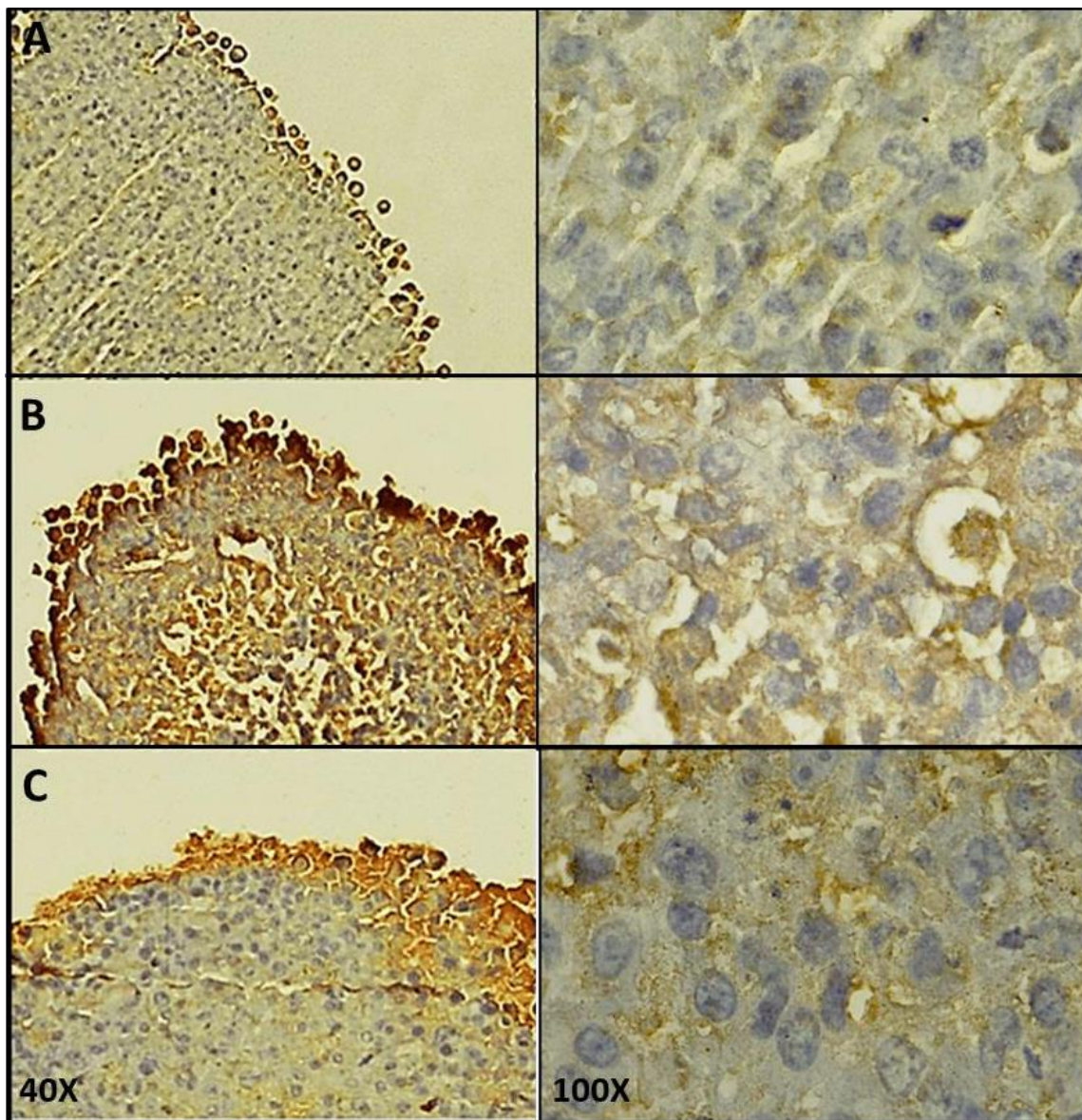


Figura 16.- Inmunohistoquímica de la sialoproteína ósea en esferoides cultivados en medio DMEM **A)** día 3, **B)** día 7 y **C)** día 14 de cultivo.

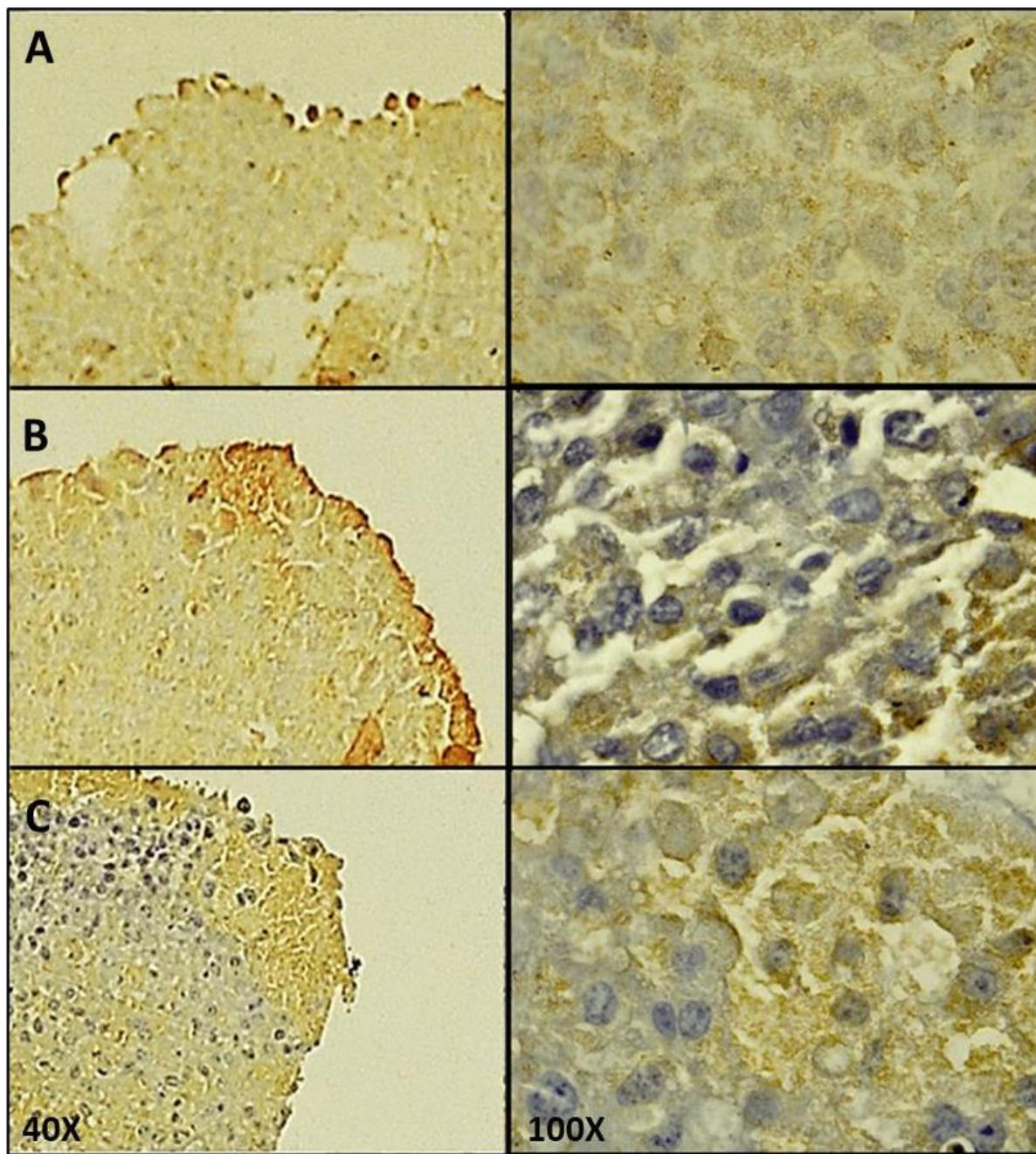


Figura 17.- Inmunomarcaje de OPN en esferoides cultivados en medio DMEM A) día 3, B) día 7 y C) día 14 de cultivo.

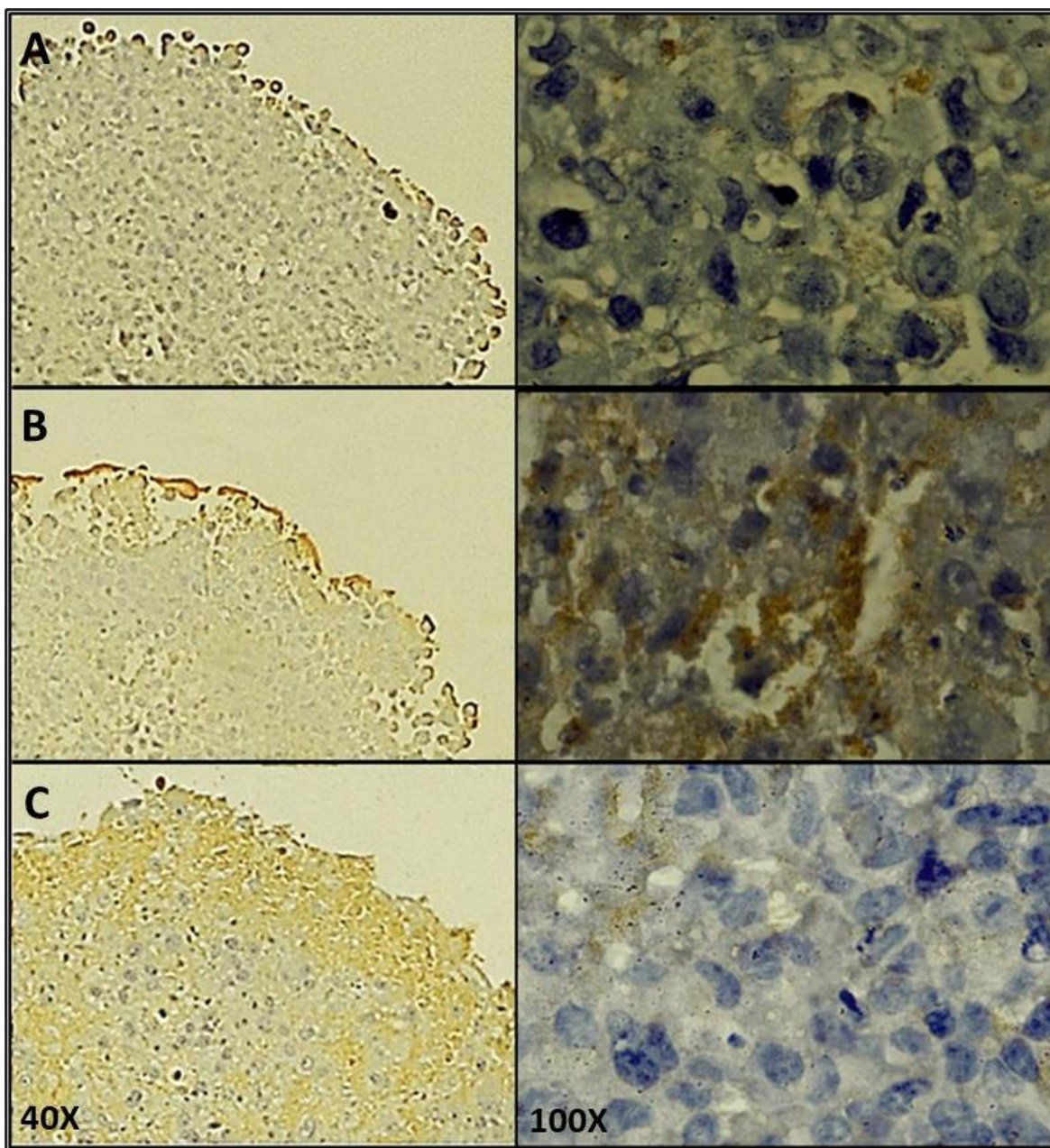


Figura 18.- Inmunomarcaje de OC **A)** día 3, **B)** día 7 y **C)** día 14 de cultivo.

El inmunomarcaje de las proteínas en los esferoides incubados con el medio osteogénico nos indica que para la proteína BSP la positividad fue intensa desde el día 3 hasta el día 14 de cultivo celular. Localizándose en todo el esferoide y con mayor positividad en la periferia de la estructura tridimensional (Figura 19).

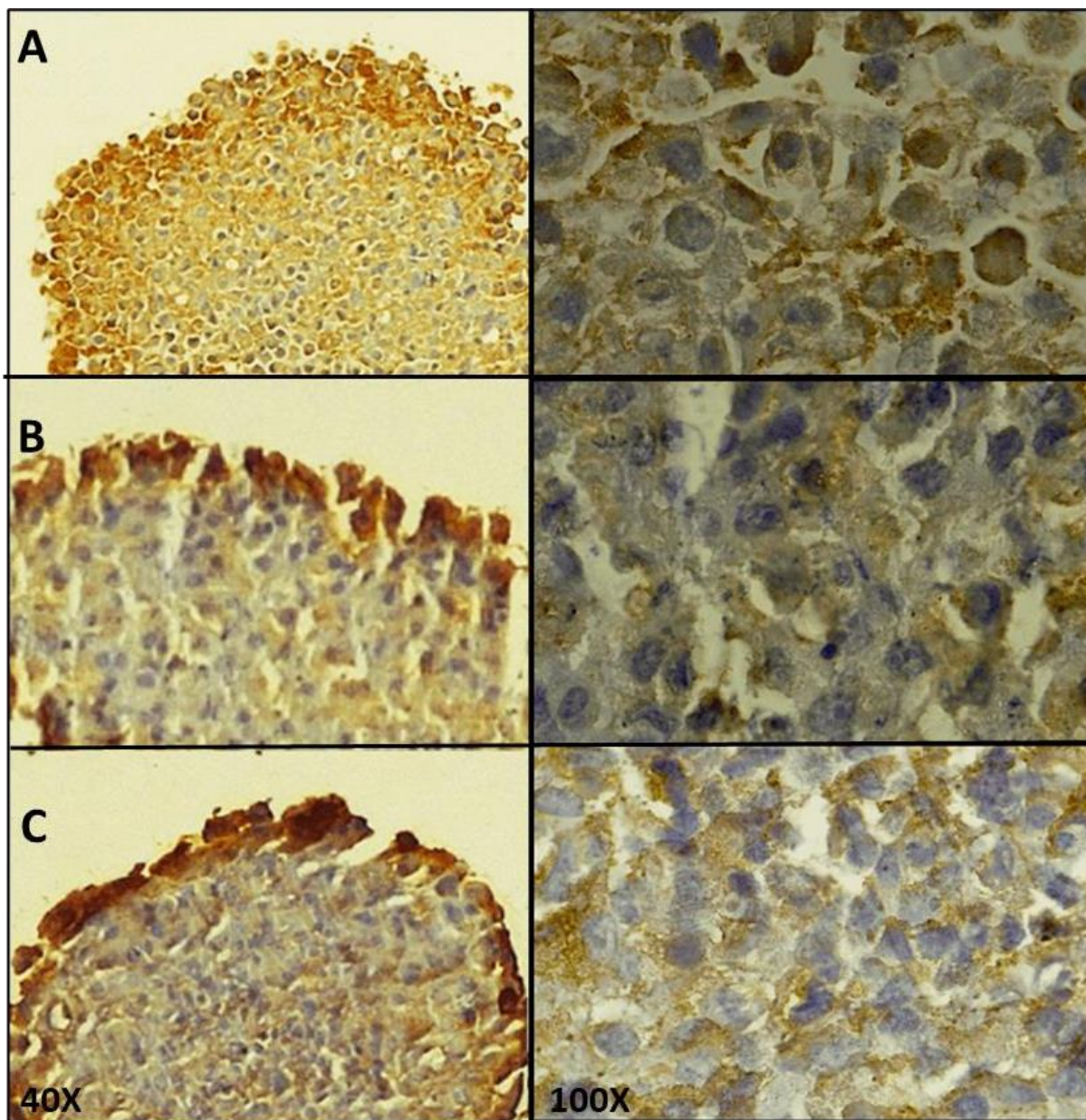


Figura 19.- Inmunohistoquímica de BSP en esferoides en medio osteogénico, A) día 3 B) día 7 y C) día 14.

La inmunoexpresión de OPN se localizó de forma leve al día 3 de cultivo (figura 20A); aumentando moderadamente su positividad de forma generalizada en toda la estructura del esferoide al día 7 de cultivo celular (figura 20B) y con mayor intensidad la positividad para el día (figura 20C).

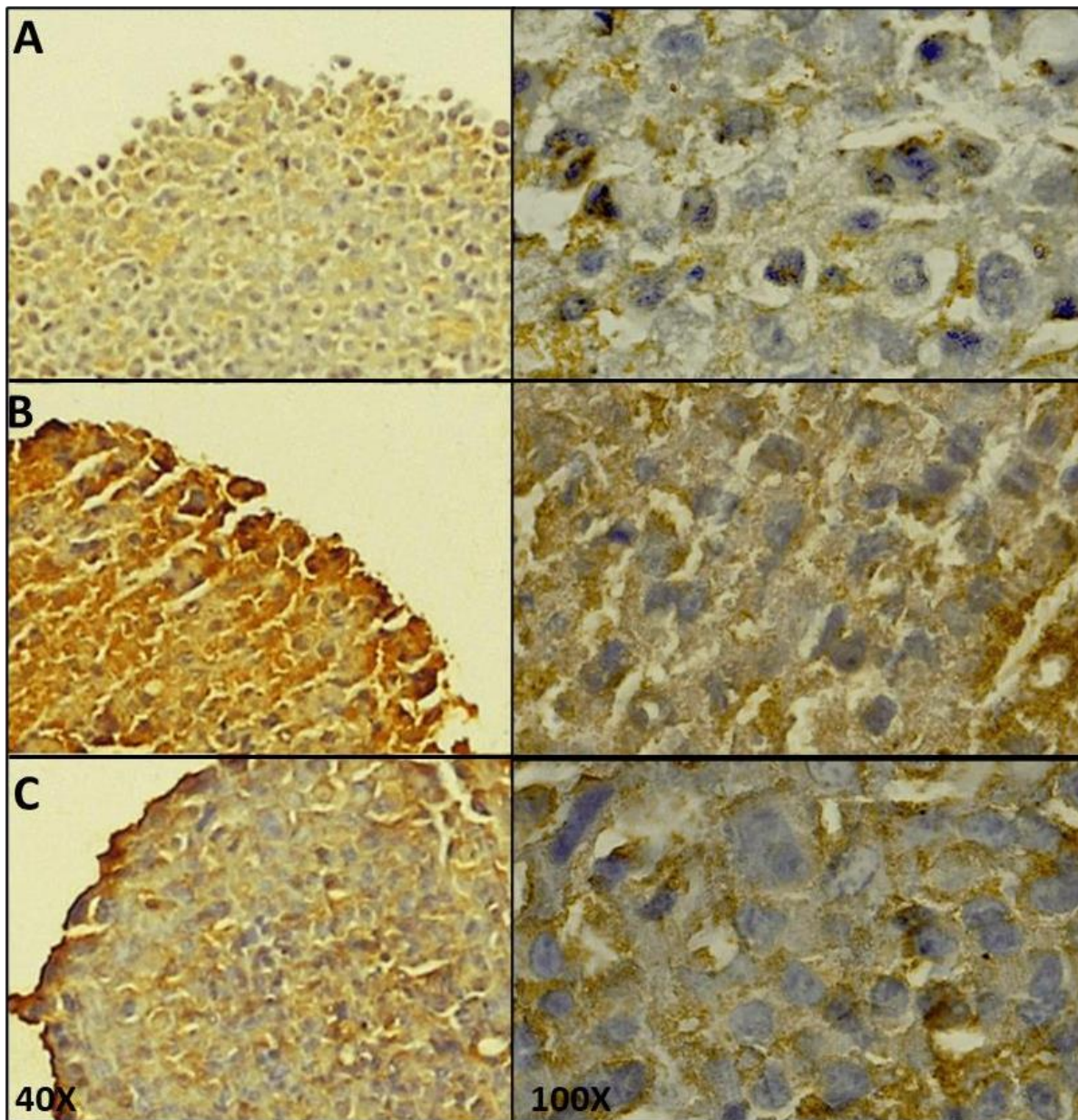


Figura 20.- Inmunohistoquímica de OPN en esferoides en medio osteogénico, A) día 3 B) día 7 y C) día 14.

Finalmente, el inmunomarcaje de la proteína OC a lo largo de los tiempos de cultivo (3, 7, y 14 días se mantuvo la positividad de manera leve principalmente en la parte periférica (Figura 21).

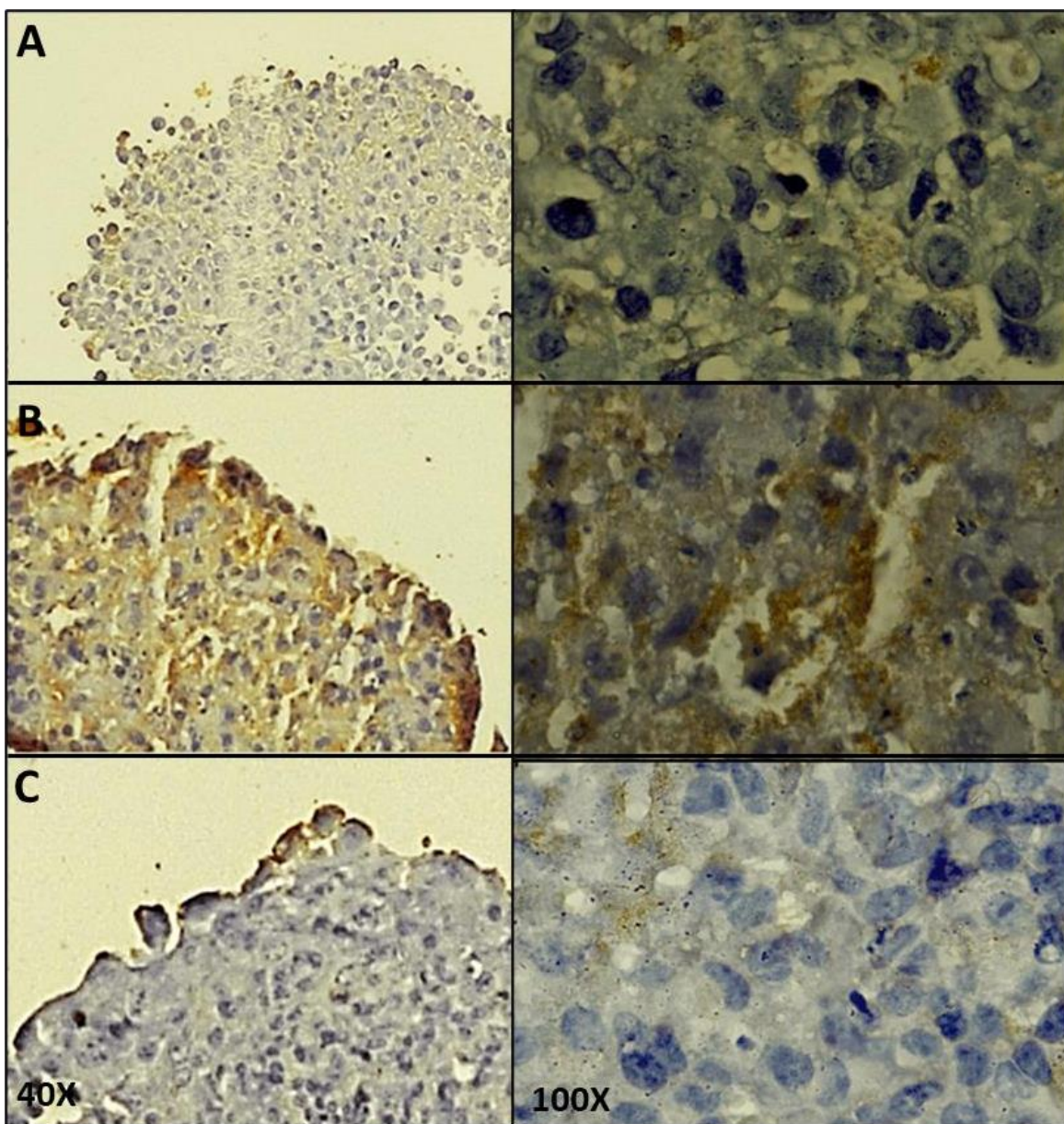


Figura 21.- Inmunohistoquímica de OC, A) día 3 B) día 7 y C) día 14.

Por último, se realizó una comparación de la positividad de la señal de las proteínas no colagénicas involucradas en la formación de tejido mineral (OPN, OC y BSP), para hacer más entendible el inmunomarcaje y estos análisis se resumen en la Tabla-1.

A. ESFEROIDES MEDIO DMEM						
	BSP		OC		OPN	
	INTENSIDAD	CANTIDAD	INTENSIDAD	CANTIDAD	INTENSIDAD	CANTIDAD
Día 3	+	+	+	++	++	++
Día 7	+++	+++	+	+	+++	++
Día 14	+++	++	+	+	++	++

B. ESFEROIDES MEDIO OSTEOGÉNICO						
	BSP		OC		OPN	
	INTENSIDAD	CANTIDAD	INTENSIDAD	CANTIDAD	INTENSIDAD	CANTIDAD
Día 3	+++	+++	+	+	++	++
Día 7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Día 14	+++	+++	+	+	++	++

+ Expresión leve, ++ Expresión moderada, +++ Expresión severa

Tabla 1.- Expresión de marcadores de mineralización BSP, OC y OPN. **A)** esferoides en medio D-MEM, **B)** esferoides en medio osteogénico.

IX. DISCUSIÓN

La pérdida de un tejido óseo ya sea parcial o total en la región de cabeza y cuello puede tener etiologías diversas que van desde procesos neoplásicos malignos, traumatismos o defectos congénitos, afecta a miles de personas anualmente por lo que hay una gran necesidad del desarrollo de nuevas estrategias de regeneración ósea. El estudio de los cultivos 3D han tomado especial atención en las últimas tres décadas debido a las características similares con los tejidos dentro de un organismo.

El tipo de células que se utilizan en el estudio de la regeneración dependerá en gran medida de los objetivos a seguir, si bien las células troncales mesenquimales (MSC) son el modelo más estudiado debido a la capacidad de diferenciación hacia múltiples linajes y su potencial de auto-renovación, se han descrito una serie de limitaciones al estudiarlas como modelos *in vitro*. Las células MSC de origen mesenquimal, *in vivo* se encuentran en un ambiente con baja concentración de oxígeno (1–5% O₂), mientras que los sistemas de cultivo manejan una concentración de aproximadamente 20–21% O₂, estos cambios pueden provocar una disminución en las funciones celulares que incluyen proliferación y diferenciación (39), por otra parte, la fuente de origen de las células MSC y el método de obtención pueden influir en su capacidad de diferenciación aunado a la falta de un consenso sobre sus propiedades estándar como fenotipo, potencial de diferenciación y propiedades biológicas (40), es por estos motivos que el uso de células diferenciadas son una opción viable como modelo de estudio de esferoides enfocados en la regeneración tisular como hueso.

El uso de cultivos 3D se ha popularizado ya que debido a la organización que tienen las células poseen el potencial de imitar los tejidos *in vivo*. Se han desarrollado múltiples estrategias para la formación de este tipo de cultivos, dentro de las más usadas se encuentra la técnica de superposición de líquidos la cual, como ya se mencionó, tiene como objetivo evitar que las células se adhieran a la superficie plástica del plato de cultivo, esto es gracias a la presencia de polímeros hidrofílicos (21).

En estudios recientes se ha demostrado que el uso de esta estrategia permite la formación óptima de esferoides por más de 30 días manteniendo la polaridad de la célula lo cual es crucial para su función, por otra parte esta estrategia proporciona un agregado celular estable y compacto en 72 h (41).

En el presente proyecto al usar esta técnica se pudo observar que al tercer día de cultivo las células osteoblásticas formaban una estructura esferoidal, bien delimitada y compacta, manteniéndose estable a los 14 días de seguimiento que se establecieron para el proyecto,



por lo que nuestros resultados coinciden con lo ya antes reportado. Este es un método económico, fácil de llevar a cabo y que provee una adecuada plataforma para el desarrollo de esferoides por largo tiempo.

Uno de los principales retos en el desarrollo de esferoides es que se lleve a cabo una adecuada difusión de oxígeno y nutrientes hacia la zona central del mismo con el objetivo de evitar la formación de un centro altamente hipóxico que lleve a la necrosis celular y a la desintegración del esferoide, por lo que un factor importante a analizar es el número de células que se utilizan para su formación, Nath SC y col., demostraron que en esferoides mayores de 400 μm en diámetro hay una disminución de marcadores relacionados con la proliferación celular probablemente originada por una disminución en el aporte de oxígeno, por el contrario esferoides de menor tamaño presentaron positividad a estos marcadores, por lo que concluyeron que los esferoides de gran tamaño ($> 400 \mu\text{m}$) tienen mayor riesgo de desarrollar centros hipóxicos que pongan en peligro la integridad de las células y del esferoide (42). En nuestro estudio al comenzar con una baja densidad celular se obtuvieron estructuras con un diámetro de alrededor de 480 μm , dichas estructuras se mantuvieron compactas y estables durante todo el tiempo de seguimiento del estudio, si bien no se emplearon marcadores que nos permitieran analizar los niveles de oxígeno, tanto las pruebas de viabilidad como la integridad de los mismos nos permiten sugerir que el aporte fue lo suficiente para no comprometer la integridad del esferoide aun a 14 días de cultivo celular.

Por otra parte, la capacidad que tenga el esferoide de mantenerse viable por largo periodo de tiempo es de crucial importancia, en el presente estudio se llevaron a cabo dos métodos de análisis de viabilidad basados en el metabolismo de la célula. Al analizar los resultados obtenidos con el ensayo de resazurin observamos que el cultivo en 3D mantenía valores de absorbancia ascendentes en los cuatro puntos de cortes establecidos para el seguimiento, y el mismo patrón de viabilidad fue observado en el control del cultivo en monocapa, corroborando la viabilidad de los esferoides de osteoblastos, sin embargo se observó que dichos valores de absorbancia fueron menores que en el cultivo en 2D y esto probablemente se deba a que las células se distribuyen en toda la superficie del plato de cultivo permitiendo la exposición homogénea al reactivo, por otra parte, debido a la estructura del cultivo en 3D las células que presentan mayor exposición al reactivo son únicamente aquellas que se encuentran en la periferia del esferoide, por lo que las células de la región central tienen una exposición limitada al reactivo. Finalmente, al analizar la



viabilidad con celltracker pudimos comprobar que las células localizadas en parte de la periferia y en la región central del esferoide se mantuvieron activas durante el periodo de seguimiento establecido. Todo lo anterior en conjunto demuestra que los osteoblastos tienen el potencial de formar esferoides compactos, estables y viables por al menos 14 días lo que permite su adecuado estudio en la ingeniería de tejidos.

Una de las principales características y ventajas de los cultivos tridimensionales es la morfología que adquieren las células, ya que al no verse forzadas a adherirse a una superficie plana no generan tensión en las fibras del citoesqueleto y no alteran el metabolismo y funcionalidad (43). La realización de tinciones con cristal violeta del esferoide y monocapa observamos que en este último los osteoblastos adquieren una morfología muy diversa que va desde lo cuadrangular y triangular, con diversas proyecciones citoplasmáticas que establecen el contacto con las células vecinas, lo que sugiere tensión en las fibras del citoesqueleto, por otro lado, en el cultivo de esferoides se observó que las células adquieren una morfología esférica, con ausencia de marcadas proyecciones citoplasmáticas. Tzanakakis y col; describieron la participación de las fibras del citoesqueleto en la morfología de las células en los cultivos 3D y monocapa, mencionando que en estos últimos las fibras del citoesqueleto desarrollan una mayor tensión la cual les permite adherirse a la superficie plana adquiriendo una morfología ya característica, por el contrario en el cultivo en 3D los filamentos del citoesqueleto, en específico las fibras de actina se distribuyen en la periferia de la célula siendo los principales responsables de la morfología que adquieren dentro del esferoide (44).

Algo que está poco estudiado en la literatura es la organización de las células dentro de la estructura del esferoide, por lo que se realizó un análisis histo-morfológico para analizar con detalle su organización. En los primeros días de cultivo se observó que las células se organizan principalmente en la periferia del esferoide en cuatro o cinco filas de células, conforme avanza el tiempo de cultivo las células se reorganizaron y dispersan en toda la estructura esferoidal teniendo como principal característica el pleomorfismo, presencia de mitosis aberrantes y cromatinas condensadas y granulares, finalmente para el día 14 de cultivo continuó observándose la reorganización en las células, disminuyendo en número, pero manteniendo el patrón pleomórfico; esto en el grupo de esferoides cultivados en medio DMEM. Asimismo, en el grupo de esferoides formados en medio osteogénico se identificó que en los dos primeros puntos de corte del seguimiento hay una abundante presencia de células de forma generalizada observando las mismas características de pleomorfismo y hiper cromasia nuclear, para el día 14 se apreció disminución en el número celular con



presencia de núcleos atípicos. Al analizar la morfología de ambos grupos podemos dilucidar que los esferoides en medio DMEM tienen un proceso de organización más lento que los formados en medio osteogénico, sin embargo, ambos llegan a la misma etapa donde hay mayor desarrollo de matriz extracelular y poca celularidad.

Este comportamiento en el que los esferoides que crecen en medio osteogénico pareciera que tienen una organización más rápida se podría atribuir a la función de los distintos elementos que tiene el medio osteogénico, la dexametasona activa la vía WNT/ β -catenina mediante el aumento de la expresión de RUNX2, esto debido a que la dexametasona se une a FHL2 potenciando el transporte de β -catenina al núcleo, por otra parte, beta glicerofosfato actúa como molécula de señalización intracelular que regulan la expresión de genes como la osteopontina y BMP2 los cuales inducen la síntesis de componentes minerales, finalmente el ácido ascórbico tiene como principal función contribuir a la secreción de colágeno tipo I, esto debido a que el ac. ascórbico es necesario como cofactor para las enzimas que hidroxilan la prolina y la lisina en el procolágeno. (45)

Por otra parte en las tinciones dirigidas hacia la identificación de fibras de colágeno tipo I, elemento clave de la matriz extracelular, por medio del tricómico de Masson se identificó que de forma inicial hay positividad intensa relacionándose con abundante presencia de matriz extracelular, conforme avanza el tiempo de cultivo hay ausencia de las fibras de colágeno relacionándose con la reorganización celular, finalmente para los últimos días de seguimiento se vuelve a identificar de manera sutil marcaje positivo para fibras de colágeno, principalmente en la parte central del esferoide.

Por otra parte, al analizar la presencia de depósitos de calcio se observó la presencia de dichos depósitos en ambos grupos de estudio. Estos resultados en conjunto tienen relación al analizar el proceso de síntesis y mineralización de la matriz osteoide la cual en general se realiza en dos pasos: primero se lleva a cabo la deposición de matriz orgánica al secretar principalmente colágeno tipo I y proteínas no colágenas como OPN, OC y BSP, que están involucradas en la captación de iones de calcio y fosfato para regular la nucleación y formación de los cristales de hidroxiapatita (46) .

Todo este comportamiento fue corroborado al evaluar la presencia de marcadores relacionados con etapas tempranas de mineralización identificando positividad para OPN, OC y BSP con intensidades que van de leve a moderada, en el grupo de esferoides en medio DMEM, en cuanto al grupo de esferoides en medio osteogénico se observó una mayor expresión tanto en intensidad como en cantidad para los tres marcadores. Estos cambios en la expresión entre grupos se deben probablemente a las diferencias en los



medios en que se desarrollaron los cultivos en 3D, sin embargo, ambos grupos confirman la presencia de las primeras fases de mineralización de la matriz orgánica.

Todo lo anterior confirma que la organización que tienen los esferoides de osteoblastos les brinda la capacidad de llevar a cabo el proceso de depósito de matriz orgánica y mineralización en sus fases tempranas, corroborando su aplicación potencial en la regeneración de tejido óseo.



X. CONCLUSIÓN

1. Se logro realizar esferoides en 3D viables por la técnica de superposición de líquidos
2. Los esferoides se mantuvieron viables hasta los 14 días de cultivo celular manteniendo un diámetro alrededor de 480 μm .
3. Los análisis morfológicos permitieron identificar la organización de las células interna rica en matriz extracelular con una distribución celular uniforme.
4. Los inmunomarcajes indican que los esferoides son capaces de sintetizar MEC mineralizada debido a que las proteínas no colágenas (OPN, OC, y BSP) fueron detectadas en el proceso inicial de mineralización de la matriz.
5. La tinción de alizarina roja S permitió detectar los depósitos de calcio en los esferoides diferencialmente hasta los 14 días de cultivo.
6. Nuestros resultados brindan un panorama mucho más claro acerca de la dinámica interna de los esferoides de osteoblastos confirmando su aplicación potencial en la ingeniería de tejidos.



XI. REFERENCIAS

1. Jedrzejczak-Silicka M. History of Cell Culture. In: *New Insights into Cell Culture Technology* [Internet]. 2016 [cited 2021 Feb 4]. p. 12. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/66905>
2. Hayden PJ, Harbell JW. Special review series on 3D organotypic culture models: Introduction and historical perspective. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* [Internet]. 2020 [cited 2021 Feb 3];1–9. Available from: </pmc/articles/PMC7687207/?report=abstract>
3. Anton D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Mar 11 [cited 2021 Mar 3];16(3):5517–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25768338/>
4. Koledova Z. 3D Cell Culture: An Introduction. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Aug 13];1612:1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28634931>
5. Padmalayam I, Suto MJ. 3D Cell Cultures. Mimicking In Vivo Tissues for Improved Predictability in Drug Discovery. In: *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Academic Press Inc.; 2012. p. 367–78.
6. Barrila J, Radtke AL, Crabbé A, Sarker SF, Herbst-Kralovetz MM, Ott CM, et al. Organotypic 3D cell culture models: Using the rotating wall vessel to study host–pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2021 Feb 4];8(11):791–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20948552/>
7. Grun B, Benjamin E, Sinclair J, Timms JF, Jacobs IJ, Gayther SA, et al. Three-dimensional in vitro cell biology models of ovarian and endometrial cancer. *Cell Prolif* [Internet]. 2009 Apr [cited 2021 Feb 4];42(2):219–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19222485/>
8. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* [Internet]. 2019 Dec 12 [cited 2021 Feb 4];8(12):1660. Available from: </pmc/articles/PMC6953111/?report=abstract>
9. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* [Internet]. 2008 [cited 2021 Feb 4];3(9–10):1172–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18566957/>
10. Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW. Controlled, Scalable Embryonic Stem Cell Differentiation Culture. *Stem Cells* [Internet]. 2004 May [cited 2021 Feb 4];22(3):275–82. Available from:



- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15153605/>
11. Lin RZ, Chou LF, Chien CCM, Chang HY. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and β 1-integrin. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2006 Jun [cited 2021 Feb 4];324(3):411–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16489443/>
 12. Zhou Y, Chen H, Li H, Wu Y. 3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Feb 4];21(6):1073–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28276635/>
 13. 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 Reports* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Feb 4];16(5):853–75. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10006-9>
 14. Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Feb 5];11(12):1065–83. Available from: <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v11/i12/1065.htm>
 15. 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* [Internet]. 2007 Dec [cited 2021 Feb 5];28(36):5487–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17881050/>
 16. Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Tesei A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020 Jul 16 [cited 2021 Mar 3];13(1):97. Available from: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-020-00931-0>
 17. Fang Y, Eglén RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Feb 5];22(5):456–72. Available from: [/pmc/articles/PMC5448717/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28276635/)
 18. Doctor A, Seifert V, Ullrich M, Hauser S, Pietzsch J. Three-dimensional cell culture systems in radiopharmaceutical cancer research. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Feb 5];12(10):1–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32993034/>
 19. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* (80-) [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb



- 5];345(6194). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25035496/>
20. Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2012 Oct [cited 2021 Feb 5];12(10):1347–60. Available from: [/pmc/articles/PMC4295205/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25035496/)
 21. Costa EC, de Melo-Diogo D, Moreira AF, Carvalho MP, Correia IJ. Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnol J* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Feb 5];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29058365/>
 22. Carvalho MP, Costa EC, Miguel SP, Correia IJ. Tumor spheroid assembly on hyaluronic acid-based structures: A review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2016 Oct 5 [cited 2021 Mar 3];150:139–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27312623/>
 23. Jin HJ, Kim T, Cho YH, Gu JM, Kim J, Oh YS. A multicellular tumor spheroid formation and extraction chip. 2010 10th IEEE Conf Nanotechnology, NANO 2010. 2010;889–92.
 24. Kim JA, Choi JH, Kim M, Rhee WJ, Son B, Jung HK, et al. High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* [Internet]. 2013 Nov [cited 2021 Feb 6];34(34):8555–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23937911/>
 25. Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury: Laboratory investigation. *J Neurosurg* [Internet]. 2009 Jun [cited 2021 Mar 4];110(6):1189–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19301973/>
 26. Papas KK, Constantinidis I, Sambanis A. Cultivation of recombinant, insulin-secreting AtT-20 cells as free and entrapped spheroids. *Cytotechnology* [Internet]. 1993 Jan [cited 2021 Mar 4];13(1):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7764602/>
 27. Lin H, Li Q, Lei Y. Three-dimensional tissues using human pluripotent stem cell spheroids as biofabrication building blocks. *Biofabrication* [Internet]. 2017 Apr 20 [cited 2021 Mar 4];9(2):025007. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28287080/>
 28. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomed Mater* [Internet]. 2018 Mar 21 [cited 2021 Mar 4];13(3):034109. Available from: [/pmc/articles/PMC5898817/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/314109/)



29. 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* [Internet]. 2014 Dec 6 [cited 2021 Mar 5];14(1):105. Available from: [/pmc/articles/PMC4299781/](#)
30. 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* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 Mar 5];26(11):254. Available from: [/pmc/articles/PMC4598349/](#)
31. Sankar S, Sharma CS, Rath SN. Enhanced osteodifferentiation of MSC spheroids on patterned electrospun fiber mats - An advanced 3D double strategy for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2019 Jan 1;94(1):703–12.
32. Indurkar M, Verma R. Evaluation of the prevalence and distribution of bone defects associated with chronic periodontitis using cone-beam computed tomography: A radiographic study. *J Interdiscip Dent* [Internet]. 2016 [cited 2021 Mar 5];6(3):104. Available from: <http://www.jidonline.com/text.asp?2016/6/3/104/201647>
33. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Sci World J* [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 5];2020:2146160. Available from: [/pmc/articles/PMC7275199/](#)
34. Shrestha AD, Vedsted P, Kallestrup P, Neupane D. Prevalence and incidence of oral cancer in low- and middle-income countries: A scoping review. *Eur J Cancer Care (Engl)* [Internet]. 2020 Mar 10 [cited 2021 Mar 5];29(2):e13207. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ecc.13207>
35. Fliefel R, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Gene Therapy for Bone Defects in Oral and Maxillofacial Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2017 Feb 15 [cited 2021 Mar 6];26(4):215–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27819181/>
36. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Mar 4];11(1):45–54. Available from: [/pmc/articles/PMC4464690/](#)
37. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Mar 5];2(4):224–47. Available from: [/pmc/articles/PMC5935655/](#)
38. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the



- bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. Organogenesis [Internet]. 2012 Oct [cited 2021 Mar 5];8(4):114–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23247591/>
39. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Mar 12];22(3):1428–42. Available from: [/pmc/articles/PMC5824372/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111111/)
 40. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Mar 12];13(9):1738–55. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx/doi/full/10.1002/term.2914>
 41. Kyffin JA, Cox CR, Leedale J, Colley HE, Murdoch C, Mistry P, et al. Preparation of Primary Rat Hepatocyte Spheroids Utilizing the Liquid-Overlay Technique. *Curr Protoc Toxicol* [Internet]. 2019 Sep 13 [cited 2021 Mar 12];81(1):e87. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com/doi/abs/10.1002/cptx.87>
 42. Nath SC, Horie M, Nagamori E, Kino-oka M. Size- and time-dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate. *J Biosci Bioeng*. 2017 Oct 1;124(4):469–75.
 43. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Mar 13];21(17):1–17. Available from: [/pmc/articles/PMC7503223/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111111/)
 44. Tzanakakis ES, Hansen LK, Hu WS. The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2001;48(3):175–89.
 45. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 1];4(5):117. Available from: [/pmc/articles/PMC3854789/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/)
 46. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 [cited 2021 Mar 13];2015:421746. Available from: [/pmc/articles/PMC4515490/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)