



**Universidad**  
Zaragoza



Escuela de  
Ingeniería y Arquitectura  
**Universidad** Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación  
de Ingeniería de Aragón  
**Universidad** Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

# Estudio de la evolución individual y colectiva de células de osteosarcoma en diferentes matrices

Autor

Lucía Navascuez Marqueta

Directoras

Pilar Alamán Díez

M<sup>a</sup> Ángeles Pérez Ansón

Curso 2022/23



# AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Fin de Grado ha supuesto un avance de gran importancia para mi.

Han sido horas de trabajo en un campo completamente nuevo impulsadas por el entusiasmo y las ganas de aprender.

Gracias al Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) por la beca otorgada. Su apoyo ha hecho posible mi crecimiento académico y futuro desarrollo en investigación. Agradecer también al Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), por darme la oportunidad de realizar experimentos con sus equipos e instalaciones. En especial a MJ por la buena acogida.

A Pilar, por formarme como investigadora; por enseñarme a buscar soluciones a los problemas manteniendo la calma, a creer en mi misma y a saber insistir cuando no todo va por el buen camino. Gracias por todo, a nivel personal y profesional.

Hacemos muy buen equipo.

M<sup>a</sup> Ángeles, eres para mi un ejemplo a seguir. Tu papel como mujer investigadora junto con trayectoria profesional son realmente inspiradoras.

A mis compañeros del M2BE, en especial a Jack y María. Gracias a todos por vuestra predisposición a ayudarme.

A mi familia, por el apoyo continuo y la oportunidad de seguir formándome en lo que me gusta. Por no soltarme nunca de la mano y recordarme que solo con esfuerzo se consiguen las cosas.

A Lucas por acompañarme durante todo el camino. Gracias por ser mi fuerza motriz.

¡¡Lo hemos conseguido!!

Dude en realizar una segunda carrera pero ha merecido la pena, y tanto que sí.



## RESUMEN

El osteosarcoma es una forma agresiva de cáncer óseo que afecta principalmente a adolescentes y adultos jóvenes, así como a personas de edad avanzada. Comprender cómo las células de osteosarcoma evolucionan e interactúan según su entorno extracelular puede proporcionar información crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas.

En concreto, este estudio comparativo de células de osteosarcoma en diferentes matrices, basado en la mecanobiología, en la tecnología de la microfluídica y en la introducción de células madre mesenquimales (ingeniería de tejidos), ha permitido recrear y entender cómo el microambiente tumoral influye en la proliferación y el comportamiento celular. Los resultados obtenidos proporcionan información para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas específicamente al microambiente tumoral, con el objetivo de mejorar el tratamiento del osteosarcoma en el futuro.

Dentro del emergente mundo de los nanomateriales y de la búsqueda continua de nuevas terapias capaces de mejorar la capacidad de las células óseas para regenerar el tejido dañado, en este trabajo se ha estudiado la influencia de unas nanoarcillas sintéticas, llamadas Laponita. Este tipo de materiales permiten la modificación de propiedades biofísicas de los hidrogeles, que emulan la matriz extracelular *in vitro*. Ser capaz de manipular estas propiedades puede permitir la *customización* de la investigación para avanzar en la medicina personalizada.

Por último, la generación de esferoides abre nuevas líneas de investigación para estudiar modelos 3D de cáncer más realistas que los convencionales. La investigación con estos modelos tumorales puede proporcionar una mejor comprensión de la biología tumoral y la progresión del cáncer, permitiendo así el desarrollo y prueba de terapias más efectivas y personalizadas. Además, estos modelos podrían reducir la necesidad de ensayos en animales y facilitar el estudio de la interacción entre el tumor y el sistema inmunológico, lo que potencialmente podría conducir a avances significativos en la inmunoterapia contra el cáncer.

# ABREVIATURAS

**2D** 2 dimensiones - bidimensional

**3D** 3 dimensiones - tridimensional

**BSA** Bovine Serum Albumin (Albúmina Sérica Bovina)

**CD133** Prominina - 1

**DDC** Días De Cultivo

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio de cultivo)

**ECM** Extracelular Matrix (Matriz extracelular)

**HE** Hematoxilina y Eosina

**IL-6** Interleucina-6

**MCO** Medio de Cultivo Osteogénico

**MSC** Células Madre Mesenquimales

**PBS** Phosphate Buffered Saline (Tampón)

**PFA** ParaFormAldheído

**PDL** Poly-D-Lisina

**PDMS** Polydimetilsiloxan (Polidimetilsiloxano)

**SFB** Suero Fetal Bovino

**TME** Tumor Microenvironment (Microambiente tumoral)

**uADSC** Undifferentiated Adipose Derived Stem cells (Células madre derivadas de tejido adiposo no diferenciadas)

# Índice

<b>Lista de Figuras</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>IX</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Contexto clínico . . . . .	1
1.2. Anatomía y fisiología del tejido óseo . . . . .	2
1.3. Ingeniería de tejidos . . . . .	3
1.3.1. Mecanobiología celular y la microfluídica . . . . .	4
1.3.2. La contribución de las células madre mesenquimales en ingeniería de tejido óseo . . . . .	7
1.3.3. Nanopartículas para personalizar los hidrogeles . . . . .	8
1.4. Objetivos y planteamiento . . . . .	9
<b>2. Materiales y metodología</b>	<b>10</b>
2.1. Fabricación de dispositivos microfluídicos . . . . .	10
2.2. Preparación y siembra de los geles de colágeno . . . . .	12
2.2.1. Cultivo celular . . . . .	12
2.2.2. Fabricación de geles de colágeno . . . . .	14
2.2.3. Hidrogeles suplementados con Nanoarcillas Laponita . . . . .	15
2.2.4. Siembra de los hidrogeles en los dispositivos . . . . .	17
2.2.5. Cocultivo con células madre . . . . .	19
2.3. Estudio de viabilidad celular . . . . .	20
2.4. Formación de esferoides por gota colgante . . . . .	21
2.5. Seguimiento del cultivo por microscopía óptica . . . . .	22
2.5.1. Microscopía de campo claro . . . . .	22
2.5.2. Fluorescencia: visualización del núcleo y esqueleto celular . . . . .	23
2.6. Parafinado de esferoides . . . . .	25

<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>27</b>
3.1. Estudio de viabilidad . . . . .	27
3.1.1. Evolución de la línea de OS . . . . .	27
3.1.2. Evolución de la línea de uADSC . . . . .	28
3.2. Seguimiento de los cultivos por microscopia . . . . .	30
3.3. Esferoides como modelos tumorales . . . . .	34
3.3.1. Cuantificación del área con el tiempo . . . . .	34
3.3.2. Evaluación de la funcionalidad de los esferoides como modelo tumoral <i>in vitro</i> . . . . .	36
3.4. Cocultivo de células madre y osteosarcoma . . . . .	39
<b>4. Conclusiones y líneas futuras</b>	<b>42</b>
<b>5. Bibliografía</b>	<b>46</b>

# Lista de Figuras

1.1. Remodelación ósea en presencia de osteosarcoma . . . . .	3
1.2. Representación de un chip microfluídico como los que se han empleado	5
1.3. Representación simplificada de la estructura de un esferoide. . . . .	6
2.1. Esquema general de fabricación de los chips microfluídicos . . . . .	10
2.2. Día 2 de fabricación de los microchips . . . . .	11
2.3. uADSC cultivadas en el flask . . . . .	13
2.4. Proceso de preparación de hidrogeles . . . . .	15
2.5. Proceso de suplementación de hidrogeles con Laponita . . . . .	16
2.6. Caracterización de las matrices en función de la concentración de colágeno.	16
2.7. Caracterización de las matrices en función de la presencia o ausencia de Laponitas . . . . .	17
2.8. Dispositivo microfluídico . . . . .	18
2.9. Esquema de la geometría interior de un dispositivo microfluídico . . . .	19
2.10. Procedimiento para el estudio de viabilidad . . . . .	21
2.11. Formación de esferoides mediante gota colgante . . . . .	21
2.12. Desplazamiento celular en la gota colgante . . . . .	22
2.13. Composición celular: núcleo y citoesqueleto . . . . .	23
2.14. Proceso de parafinado de esferoides . . . . .	26
2.15. Muestras con esferoides parafinados y laminados . . . . .	26
3.1. Resultados de viabilidad obtenidos para las células de OS . . . . .	28
3.2. Resultados de viabilidad obtenidos para las células uADSC . . . . .	29
3.3. Estudio de la morfología para las células de OS . . . . .	31
3.4. Estudio de la morfología para las células de OS en presencia de Laponitas	31
3.5. Estudio de la morfología para las células uADSC . . . . .	32
3.6. Estudio de la morfología para las células uADSC en presencia de Laponitas	33
3.7. Fuerzas ejercidas sobre los hidrogeles por las células en los cultivos . . .	33
3.8. Evolución de un esferoide a lo largo del tiempo de cultivo . . . . .	34
3.9. Evolución del tamaño de los esferoides en el tiempo . . . . .	35

3.10. Representación esquemática del funcionamiento de una inmunotinción con anticuerpos . . . . .	38
3.11. Evolución del cocultivo . . . . .	39
3.12. Imágenes de uADSC teñidas con DAPI y faloidina . . . . .	40
3.13. Imágenes de células MG63 teñidas con DAPI y faloidina . . . . .	40
3.14. Imágen representativa del cocultivo MG63-uADSC . . . . .	41
3.15. Ampliaciones de la imágen representativa del cocultivo MG63-uADSC .	41

# Lista de Tablas

2.1. Preparación de los hidrogeles de colágeno . . . . .	15
--	----

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Contexto clínico

El osteosarcoma (OS) es el cáncer de hueso primario más común. Aparece con mayor frecuencia en los huesos largos, principalmente en las piernas y en los brazos, pero también puede afectar a otros huesos del esqueleto [1]. En casos excepcionales, ocurre en el tejido blando circulante al hueso. El OS es más comúnmente diagnosticado durante la adolescencia. No obstante, se ha observado también un segundo pico de incidencia en personas de edad avanzada [2].

El OS es un tumor muy agresivo que se forma en el propio tejido del hueso y sus células crecen invadiendo el hueso sano, debilitándolo bioquímica y mecánicamente. Estos tumores, cuando son primarios, son capaces de extenderse y producir metástasis en otros sitios, principalmente, en el pulmón [3]. Normalmente, el tratamiento del OS implica la combinación de cirugía y quimioterapia, y suele requerir una terapia intensiva y prolongada para lograr una remisión completa. Aunque el tratamiento tenga éxito, los pacientes con OS tienen un riesgo elevado de padecer complicaciones tardías como problemas de crecimiento, discapacidades y efectos secundarios a largo plazo del tratamiento [4].

Con los tratamientos clínicos actuales, los pacientes con OS sin metástasis detectables tienen tasas de supervivencia que se aproximan al 70%. Sin embargo, los pacientes que se presentan con lesiones derivadas de tumores secundarios, tras el proceso metastásico, tienen una supervivencia del 30-50% [1]. Por lo tanto, la comprensión del OS es un reto clínico complejo y requiere de un enfoque multidisciplinario.

A pesar de los avances en el tratamiento de OS, sigue siendo una enfermedad desafiante y se necesita seguir mejorando la comprensión de la mecanobiología del cáncer y el comportamiento de las células de OS en diferentes entornos. Investigar la evolución individual y colectiva de estas células en diferentes matrices puede proporcionar una mejor comprensión de cómo interactúan con su entorno y cómo

esto influye en su crecimiento y propagación. Esta información puede ser valiosa para desarrollar nuevas terapias que se enfoquen en los procesos biológicos clave que impulsan la progresión del cáncer y para identificar nuevas dianas terapéuticas.

## 1.2. Anatomía y fisiología del tejido óseo

El hueso es un tejido altamente dinámico que se encuentra en constante renovación a través de un proceso conocido como remodelación ósea. En condiciones fisiológicas, este proceso implica la formación y reabsorción de tejido óseo, permitiendo el mantenimiento de la estructura ósea, la reparación del daño tisular y la regulación del metabolismo mineral homeostática del cuerpo [5].

Los osteoclastos, derivados de células madre hematopoyéticas, son los responsables de la resorción ósea y los osteoblastos, derivados de células madre mesenquimales de la médula ósea, son las células formadoras de hueso [6]. La remodelación ósea está orquestada por los osteocitos, derivados de osteoblastos, que componen el 90 % de las células óseas. Estas células, capaces de detectar la necesidad de formación o destrucción de tejido, actúan sobre otros dos tipos celulares, previamente descritos, para llevar a cabo la remodelación.

Ante una patología, este equilibrio entre formación y resorción de matriz ósea, se rompe. La patología más común en este aspecto es la osteoporosis, que es provocada por un alto ratio de resorción y bajo de formación. Otro ejemplo es el caso del OS aquí descrito, donde ocurre una invasión de células tumorales en el tejido óseo [7]. Este desequilibrio en la remodelación induce la liberación de factores de crecimiento inicialmente atrapados en la matriz ósea, que a su vez promueven la progresión tumoral. En la figura 1.1 se representa el ciclo que tiene lugar en el hueso entre los osteoblastos, los osteoclastos y las células tumorales.

Se ha demostrado que los microambientes tumorales locales (TMEs) están estrechamente ligados con el inicio y el progreso del osteosarcoma. Asimismo, se sabe que contribuyen al pronóstico del paciente [9, 10]. En los TMEs, las células no cancerosas tales como: fibroblastos, células endoteliales, células inmunitarias y células mesenquimales; desempeñan una función crucial en el desarrollo del tumor. La dinámica interacción entre las células tumorales malignas y estas células no cancerosas mencionadas anteriormente es un proceso crítico que afecta considerablemente la propagación del tumor y la aparición de metástasis, llevando potencialmente a la formación de tumores secundarios. Específicamente, hay una notable evidencia que sugiere que las células mesenquimales están directamente involucradas en la progresión del osteosarcoma [11] [12]. Por lo tanto, la investigación que combina el estudio de las

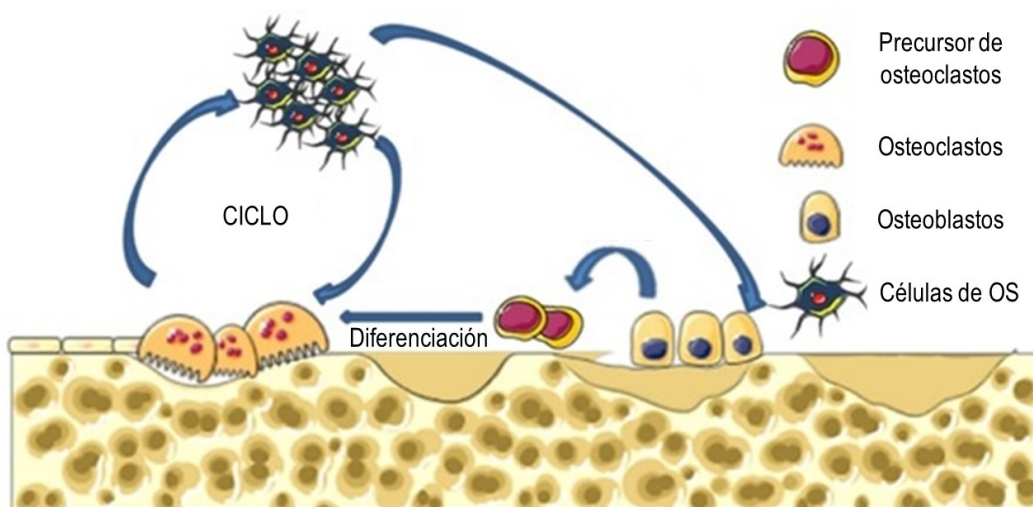


Figura 1.1: Representación del ciclo que tiene lugar en el hueso entre osteoblastos, osteoclastos y células de OS, donde están indicadas algunas de las proteínas y los factores de crecimiento liberados durante el proceso. Figura adaptada y traducida de Lamora A. *et al* (2016) [8].

células cancerosas junto con las células madre es de vital importancia para comprender plenamente los mecanismos subyacentes de esta enfermedad.

### 1.3. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una disciplina multidisciplinar que combina la biología, la biomecánica, la ingeniería y la medicina para desarrollar métodos para regenerar, reparar o reemplazar tejidos dañados o patológicos. En el caso específico de la ingeniería de tejido óseo, su enfoque principal reside en la regeneración de tejido para abordar grandes defectos que el hueso no puede sanar por sí mismo. Esto es especialmente relevante tras una fractura severa o la resección de tejido tumoral derivado del OS. Además, esta rama de la ingeniería también tiene aplicaciones en la creación de prótesis o implantes óseos personalizados, ofreciendo soluciones adaptadas a las necesidades específicas de cada paciente [6].

La investigación en ingeniería de tejidos óseos cobra una importancia significativa debido a varios factores cruciales. En primer lugar, la metástasis ósea ocupa el tercer lugar entre las formas de metástasis más comunes, lo que destaca la necesidad de desarrollar enfoques efectivos para abordar este desafiante problema médico. Específicamente, el OS descrito en este trabajo, se posiciona como el tumor secundario más frecuente derivado de cánceres primarios como el de mama, pulmón y próstata, lo que subraya la relevancia de la investigación en esta área para comprender y combatir

esta enfermedad. Adicionalmente, otro factor importante es la alta prevalencia de la osteoporosis, afectando a una de cada tres mujeres [13, 14]. La ingeniería de tejidos óseos ofrece una prometedora línea de investigación para abordar los desafíos asociados con la osteoporosis y proporcionar soluciones terapéuticas que puedan mejorar la salud ósea y la calidad de vida de las personas afectadas.

### 1.3.1. Mecanobiología celular y la microfluídica

La mecanobiología celular es una disciplina de la ingeniería de tejidos que se centra en el estudio de cómo las células responden a las fuerzas mecánicas y estímulos biomecánicos en su entorno, con el objetivo de comprender y manipular sus respuestas para mejorar la regeneración y función de los tejidos. Esta disciplina evalúa la actividad celular incluyendo la adhesión, la migración y la división celular [15].

Por su parte, la microfluídica es otra disciplina relevante en la ingeniería de tejidos que se enfoca en el diseño y manipulación de pequeños volúmenes, generalmente en el rango de microlitros o nanolitros. De esta manera se reduce el escenario de estudio a la escala de las células. En el contexto de la ingeniería de tejidos, la microfluídica permite crear entornos biomiméticos que replican las condiciones fisiológicas específicas para las células y tejidos, lo que facilita el estudio de sus respuestas frente a diferentes estímulos mecánicos y bioquímicos. Respecto a la investigación sobre el OS, la microfluídica puede utilizarse, por ejemplo, para crear modelos *in vitro* de la interfaz entre las células cancerosas y el tejido óseo, y para estudiar cómo las fuerzas mecánicas pueden afectar la invasión y la proliferación de las células cancerosas.

La combinación de la mecanobiología celular y la microfluídica puede proporcionar información relevante sobre la forma en que las células del OS interactúan con su entorno mecánico y pueden ayudar a desarrollar nuevas terapias y enfoques de tratamiento para esta enfermedad. Por ejemplo, se puede utilizar la microfluídica para evaluar la eficacia de los tratamientos contra el OS al simular las condiciones mecánicas del entorno tumoral y observar cómo las células cancerosas responden a los diferentes medicamentos y terapias.

Como se ha destacado previamente, los dispositivos microfluídicos permiten la creación de modelos *in vitro* que emulan el tejido óseo mediante la combinación de múltiples estímulos y biomateriales, generando un ambiente más similar al entorno fisiológico. Asimismo, estas plataformas ofrecen la posibilidad de cultivar células óseas en un entorno tridimensional por largos períodos de tiempo, lo que resulta esencial para el cultivo de este tejido, con una cantidad limitada de células, reactivos y residuos por muestra.

En este Trabajo de Fin de Grado se ha trabajado, entre otras plataformas, con

dispositivos microfluídicos. Específicamente, se han usado para el estudio de cultivos celulares tridimensionales de OS en matrices de diferentes propiedades. En la figura 1.2 se esquematiza un dispositivo microfluídico utilizado para el cultivo de células de hueso.

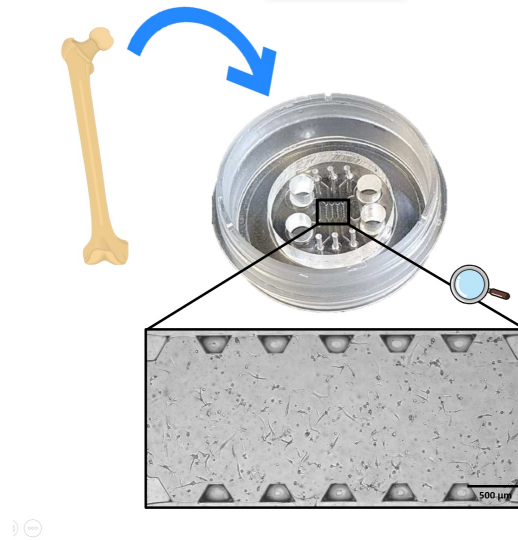


Figura 1.2: Representación de un chip microfluídico de tres canales como los que se han utilizado. En una matriz de colágeno, se encuentran células de OS y células óseas, recreando el entorno fisiológico del hueso.

El microentorno fisiológico nombrado anteriormente, se consigue embebiendo el cultivo celular en hidrogeles biomiméticos. En este Trabajo, se han utilizado hidrogeles de colágeno tipo I, debido a que es el principal componente proteico en el hueso y la matriz precursora de la reparación ósea directa. De esta manera, las células embebidas en geles de colágeno mantienen su morfología fisiológica, su estructura fibrosa y porosa, a la vez que se garantiza la tridimensionalidad del cultivo y las interacciones célula-célula [16].

En el presente estudio, se han examinado una serie de matrices de colágeno que exhiben diversas características físicas y reológicas. La hipótesis planteada es que dichas alteraciones en las propiedades mecánicas del hidrogel tienen un impacto mecanobiológico en la progresión de los cultivos celulares de OS [16]. En el apartado 2.2.3 de este trabajo, se enumeran las modificaciones en las propiedades de los geles.

### **Esferoides como modelos tumorales**

A pesar de los avances logrados mediante los métodos convencionales de cultivo en 2D, la comunidad científica se ha enfrentado a la problemática de la disminución de la eficacia de los fármacos al ser sometidos a ensayos clínicos [17]. Diversos enfoques mecanobiológicos del cáncer han dado lugar a la creación y desarrollo de diferentes

modelos tumorales, entre ellos, la generación de esferoides.

Los esferoides tumorales son agregados tridimensionales de células cancerosas que pueden generar un modelo prometedor, ya que recrean de manera más precisa las condiciones del microambiente tumoral *in vivo* en comparación con los cultivos bidimensionales tradicionales. Entre las numerosas ventajas de estos modelos frente a los modelos tradicionales en monocapa 2D, encontramos un aumento de las interacciones célula - célula y célula - ECM y la formación de capas diferentes debidas al gradiente de nutrientes, oxígeno y pH establecido por la superposición de las células (zona de proliferación, quiescencia y zona de necrosis) que se asemejan a la estructura de los tumores *in vivo* [18] (figura 1.3). Todas estas características le confieren a los esferoides una estructura 3D que emula de forma más realista las condiciones fisiológicas de un tejido real, exhibiendo un comportamiento similar al de los tumores *in vivo* y presentándose así como solución a la disparidad entre los cultivos celulares convencionales y los modelos animales.

En este estudio, se utilizó el método de gota colgante para crear el modelo tumoral de OS. Comparado con otros métodos, como el cultivo en placas de baja adherencia o la utilización de biorreactores [19], esta técnica ha permitido la fabricación de esferoides con una arquitectura más homogénea, un tamaño controlado y una mayor interacción celular. Además, los esferoides generados mediante la gota colgante mostraron un crecimiento más rápido y eficiente. Su alta reproducibilidad y escalabilidad lo convierten en una opción atractiva para estudios de alto rendimiento y cribado de fármacos.

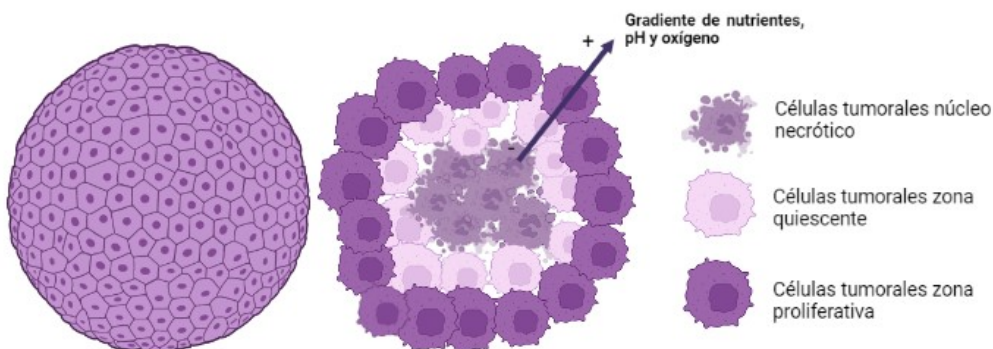


Figura 1.3: Representación simplificada de la estructura de un esferoide.

Mediante esta aproximación, se logra simular la arquitectura celular y las interacciones específicas presentes en los tumores, lo que proporciona un entorno fisiológicamente relevante para investigar la dinámica de las células cancerosas y su respuesta a estímulos mecánicos y biomiméticos [20].

Junto con los cultivos de OS en hidrogeles de colágeno mencionados anteriormente, en el estudio presentado en este Trabajo Fin de Grado, se ha empleado esferoides tumorales como un modelo alternativo *in vitro* de OS. Se analizará su evolución temporal en términos de tamaño y morfología, lo que sentará las bases para un proyecto futuro destinado a evaluar su funcionalidad como modelo tumoral *in vitro* para el estudio del OS.

### **1.3.2. La contribución de las células madre mesenquimales en ingeniería de tejido óseo**

Las células madre mesenquimales (MSC) son un tipo de células madre capaces de diferenciarse a diversos tipos celulares (neuronas, hepatocitos, osteoblastos, adipocitos...) manteniendo una alta capacidad de autorenovación y un estable crecimiento y proliferación en cultivo [15]. Se pueden extraer de varios tejidos, entre ellos: tejido adiposo, cordón umbilical, pulmones, tendones y médula ósea. En particular, en este Trabajo de Fin de Grado, se han utilizado células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (uADSC, por sus siglas en inglés).

Estas células se han utilizado ampliamente en la ingeniería de tejidos óseos debido a su capacidad para diferenciarse en células óseas y su capacidad para secretar factores de crecimiento que promueven la formación de hueso nuevo [21, 22]. Surgiendo así la medicina regenerativa como una alternativa potencial al trasplante de tejidos y órganos.

Como se ha comentado al principio de la memoria, introducir células madre en este tipo de cultivos representa un enfoque de gran relevancia en la investigación de ingeniería de tejidos y el estudio del OS. Al combinar células madre con esferoides tumorales o cultivos tridimensionales en hidrogeles de colágeno, se puede mimetizar de manera más efectiva la heterogeneidad celular y las interacciones tumorales, proporcionando así un modelo más representativo para el estudio de la progresión del cáncer y la evaluación de terapias potenciales. La inclusión de células madre en estos cultivos abre nuevas posibilidades para mejorar la comprensión de la biología del osteosarcoma y avanzar hacia enfoques terapéuticos más precisos y personalizados para combatir el OS de manera específica.

Existen múltiples estudios que demuestran que las MSC (y las uADSC) inducen el crecimiento y la proliferación de las células de OS, así como la metástasis pulmonar, mediante la producción de proteínas y factores de crecimiento [23, 11, 12]. Es en este contexto donde cobra relevancia el cultivo de ambas líneas celulares simultáneamente, también llamado cocultivo. Donde, al crecer ambas células juntas en una matriz de colágeno (como la que se utiliza a lo largo de este trabajo), es posible iniciar un estudio de la influencia de las células madre en el crecimiento de las células de OS.

Por todo ello, en este trabajo se han realizado cultivos 3D de estas células madre en las diferentes matrices de la misma forma que se ha descrito para OS. Asimismo, como se detallará a lo largo del siguiente capítulo, se han realizado estudios preliminares de cocultivo de ambas líneas celulares para el estudio de la interacción entre ambas.

### 1.3.3. Nanopartículas para personalizar los hidrogeles

La investigación en nanomateriales ha permitido el desarrollo de nuevas tecnologías y tratamientos médicos contribuyendo así, entre otros aspectos, al avance de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. En este Trabajo de Fin de Grado, se han realizado experimentos con nanoarcillas sintéticas llamadas Laponita. Son un nanomaterial que, en los últimos años, está siendo ampliamente estudiado en el campo de la biomedicina debido a sus propiedades físicas y químicas únicas, que les permiten interactuar con las células y los tejidos biológicos de manera controlada y selectiva [24]. Estas características hacen que las nanoarcillas Laponita sean un material prometedor para su uso en la ingeniería de tejidos óseo, especialmente en el contexto del OS, donde se busca desarrollar terapias que puedan mejorar la capacidad de las células óseas para regenerar el tejido dañado.

Adicionalmente, varios estudios han demostrado que, las Laponita son capaces de inducir la diferenciación osteogénica en preosteoblastos y células madre mesenquimales humanas en ausencia de factores de crecimiento. Uno de los mecanismos es el proceso de disociación de la Laponita en los respectivos iones  $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Si(OH)_4$  que tiene lugar. Según demuestran varios estudios, estos iones son responsables de estimular la diferenciación[25]. Además, en estudios previos del grupo de investigación M2BE – Multiescala en Ingeniería Mecánica y Biológica, han demostrado que este nanomaterial tiene la capacidad, debido a sus propiedades, de aportar rigidez y disminuir la porosidad de los geles de colágeno [26], lo que podría afectar al crecimiento y proliferación tanto de las células óseas como de las células de osteosarcoma.

Esta alteración de las características físicas de los hidrogeles podría llegar a permitir la personalización de las propiedades de los mismos, trayendo consigo innumerables ventajas para la investigación en medicina personalizada. Las nanopartículas Laponita se van a incluir en el estudio de este Trabajo Fin de Grado: en, particular, se van a utilizar como suplemento de los geles de colágeno para conseguir matrices con diferentes propiedades mecánicas. En el apartado 2.2.3 se detallan las modificaciones ocasionadas por la presencia de Laponita en las matrices de colágeno.

## 1.4. Objetivos y planteamiento

Como se ha ido destacando a lo largo de la introducción, este trabajo va a combinar diferentes estrategias de la mecanobiología y la ingeniería de tejidos: cultivo celular, microfluídica, hidrogeles biomiméticos, crecimiento de esferoides y suplementación con nanopartículas.

De manera específica, este trabajo se va a centrar en el estudio de la evolución de OS en diferentes matrices. Por un lado, sembrando un cultivo celular embebido en colágeno (tanto OS como uADSC) y, por otro lado, realizando esta siembra celular para la creación de esferoides tumorales. Finalmente, de manera preliminar se comienza el estudio de la interacción de ambas líneas mediante cocultivo.

Los resultados de este estudio tienen gran relevancia para la comprensión del comportamiento del tumor de hueso en el TME. Con todo ello, se puede contribuir a generar modelos *in vitro* que permitan testear posibles terapias oncológicas de manera específica. Por todo lo anterior, se han definido como los siguientes objetivos de este Trabajo Fin de Grado:

- Estudiar la influencia de las diferentes matrices de colágeno en los cultivos celulares de OS y de uADSC. La modificación en estas matrices de colágeno se consigue variando la concentración de este y con la adición de Laponita.
- Realizar el seguimiento de la viabilidad celular y la evolución del cultivo para estudiar las diferencias de comportamiento entre ambas líneas celulares en función de las propiedades de las matrices.
- Fabricar modelos de tumor óseo mediante la creación de esferoides de OS y comenzar su caracterización para determinar su potencial como modelos de cáncer *in vitro*. Además, se ha realizado una revisión bibliográfica para plantear el trabajo posterior correspondiente sobre los modelos tumorales.
- Estudio inicial de un co-cultivo entre células madre y osteosarcoma para estudiar de manera preliminar su interacción en las matrices de colágeno. A través de los estudios preliminares aquí mostrados se planteará un plan de experimentos para integrarlos en un estudio a largo plazo de creación de modelos *in vitro* de OS.

# Capítulo 2

## Materiales y metodología

En este capítulo se van a detallar los procedimientos establecidos para llevar a cabo los experimentos que comprenden este Trabajo de Fin de Grado. Estos procedimientos han sido publicados por el grupo de investigación M2BE previamente en revistas científicas, pero han sido adaptados y optimizados para ajustarse a las particularidades y los objetivos específicos de este proyecto.

### 2.1. Fabricación de dispositivos microfluídicos

Para la realización de los experimentos realizados en este Trabajo de Fin de Grado, se han fabricado dispositivos microfluídicos adaptando el protocolo establecido por C. del Amo *et al.* [27]. La fabricación de estos dispositivos es un proceso que dura un total de cinco días y se va a describir a continuación.

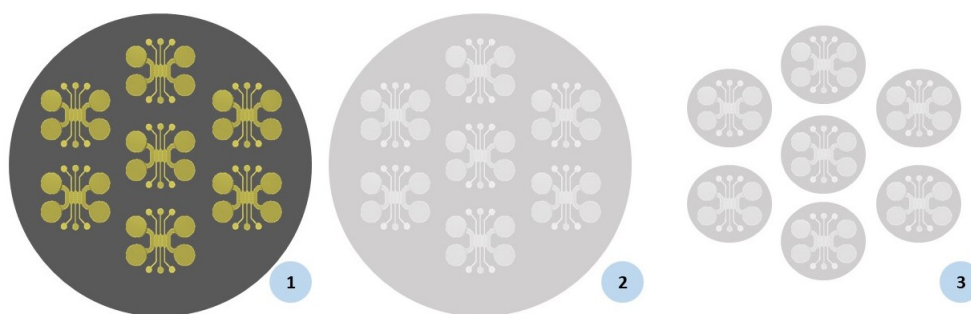


Figura 2.1: Esquema general de fabricación de los chips microfluídicos. **1:** Oblea de partida fabricada mediante litografía: geometría interna de 3 canales de cultivo. **2:** Molde de PDMS. **3:** Dispositivos individuales.

**DÍA 1:** El primer día se crea el molde de la geometría deseada. Para ello, se utilizan obleas de silicio con diferentes tipos de geometría interna ya fabricadas mediante litografía de una resina (SU8, Micro Resist Technology GmbH) semejantes a la mostrada en la figura 2.2–1. De esta manera, el primer paso es seleccionar la oblea

que se ajusta a la geometría de los chips deseada y, a partir de ella, crear el molde de polidimetilsiloxano (PDMS) (Figura 2.2-2). La disolución de PDMS se prepara mezclando en una proporción 1:10 en peso silicona Sylgard 184 (Dow Corning) y el agente curante (lo que corresponde a 30 g de silicona + 3 g de agente curante por oblea). Una vez mezclados ambos reactivos con ayuda de una espátula, es necesario desgasificar la disolución para eliminar las burbujas de aire que se hayan podido formar durante el proceso. A continuación, se vierte la disolución de silicona líquida creada en la oblea y se desgasifica de nuevo y, finalmente, se traslada al horno (80°C) donde se mantiene toda la noche.

**DÍA 2:** Con el PDMS ya solidificado, se separa de la oblea con ayuda de un bisturí. Después, se perforan las 7 geometrías contenidas en el molde con una cuchilla circular de 20 mm y se troquelan, con punzones de biopsia desechables (figura 2.2).

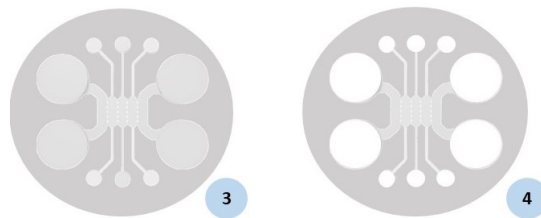


Figura 2.2: **3:** dispositivos individuales obtenidos a partir del molde de PDMS. **4:** dispositivos taladrados con punzones.

Una vez obtenidos los siete dispositivos individuales correspondientes a cada oblea, se procede a esterilizarlos en dos ciclos de autoclave para eliminar cualquier microorganismo y poder crear unidades estériles de cultivo. Una vez esterilizados, se mantienen de nuevo toda la noche en el horno (80°C) para eliminar por completo el agua.

**DÍA 3:** Al día siguiente, se lleva a cabo el sellado de los dispositivos individualmente en placas de cultivo con superficie de vidrio (Ibidi Glass Bottom  $\mu$ -Dish 35mm). Las cuales, además de proporcionar una base al cultivo 3D y hacer que este sea visible al microscopio, aseguran la protección y esterilidad necesaria creando unidades individuales. De esta manera, los dispositivos con la geometría hacia arriba y las placas sin tapa, se colocan en el interior de una máquina de plasma (PDC-32G Basic Plasma Cleaner, Harrick Plasma) durante dos minutos. Una vez realizado el tratamiento, se procede a sellar cada dispositivo en su respectiva placa, presionando con suavidad. Las tapas de las placas serán posteriormente esterilizadas mediante exposición de luz ultravioleta (20 minutos).

Debido a que el PDMS es un material hidrófobo, es necesario realizar un tratamiento superficial a la geometría interna del dispositivo para poder lograr la adherencia del hidrogel. Para ello, una vez sellados los dispositivos, se realiza un recubrimiento con Poly-D-lysine (PDL, Sigma Aldrich). Con este objetivo, se llevan los dispositivos a una campana de flujo laminar, para estar en condiciones de esterilidad y se vierten 60  $\mu\text{l}$  de PDL por los puertos de carga. Se realiza una incubación de cuatro horas a 37°C y, posteriormente, se retira el PDL con una pipeta. Debido al carácter citotóxico del PDL, es necesario realizar una serie de lavados a la geometría. Para ello, se introduce agua destilada hasta llenar la geometría interna y se retira con suavidad. Este proceso de lavado se realiza cinco veces. Finalmente, para secar totalmente los dispositivos se conservan durante 48 horas en el horno a 80°C.

**DÍA 5:** Transcurridas las 48 h, los dispositivos se retiran del horno para, una vez alcanzada la temperatura ambiente, poder ser utilizados. Los dispositivos sellados pueden quedar almacenados hasta un periodo máximo de un mes para asegurar la eficiencia del tratamiento de PDL. En la figura 1.2 mostrada en el anterior capítulo se puede ver un dispositivo microfluídico fabricado para el estudio de este trabajo.

Todos los chips fabricados para la realización de este Trabajo de Fin de Grado han sido de tres canales para garantizar la estabilidad del hidrogel dentro del canal central. Las células con las que se ha trabajado tienen la capacidad de ejercer grandes fuerzas respecto a otras líneas celulares. De esta manera, los chips de tres canales, al tener mayor número de postes que los de un canal, proporcionan una mayor superficie de adherencia, lo que les hace ser más estables en cultivos a largo plazo.

## 2.2. Preparación y siembra de los geles de colágeno

### 2.2.1. Cultivo celular

En este Trabajo de Fin de Grado se han utilizado dos líneas celulares: células de OS, pertenecientes a la línea humana MG63 (suministradas por el Hospital de la Paz gracias a la Dra. Nuria Villaboa) y células madre derivadas de tejido adiposo (uADSC, StemPRO uADSC comercializadas por Invitrogen). Debido a que el crecimiento de ambas es adherente, han sido cultivadas y expandidas en 2D dentro de flasks de cultivo (T-25, 25-cm<sup>2</sup>) formando así, una monocapa en la superficie del mismo (Figura 2.3).

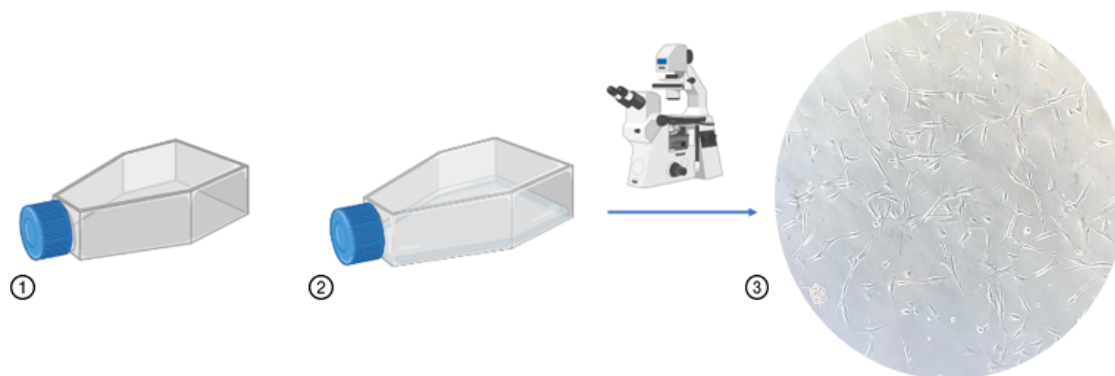


Figura 2.3: **1:** Flask utilizado para cultivo de células. **2:** Flask lleno de medio de cultivo. **3:** Flask observado al microscopio (4X) donde se observa la monocapa de células (en este caso, mesenquimales) adherida a la superficie del mismo.

El mantenimiento de las células en expansión se hace con medio de cultivo, el cual les proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento y la proliferación celular. Para MG63, el medio de cultivo utilizado ha sido Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) con alto contenido en glucosa (4.5 g/L). Y en el caso de uADSC, StemPro culture medium (Invitrogen). Las células en el flask se mantienen en unas condiciones de 37°C and 5% CO<sub>2</sub> en la incubadora.

Para poder preparar la disolución de células deseada en cada caso particular, es necesario despegarlas del flask. Este proceso se hace con tripsina. En primer lugar, se retira con una pipeta Pasteur el medio de cultivo viejo. Para ello, conviene inclinar el flask de manera que se pueda aspirar con cuidado en la esquina contraria a la base del mismo, donde permanecen las células unidas. Una vez aspirado el medio, se vierten 3 mL de *buffer* fosfato salino (PBS) para lavar y asegurar la ausencia de residuos de suero presente en el medio capaces de inactivar la tripsina.

A continuación, verter en el flask 500  $\mu$ l de tripsina (TrypLE<sup>TM</sup> Express Enzyme, Invitrogen) y llevar al incubador durante 1 minuto. Pasado el minuto, comprobar al microscopio que la separación de las células ha sido efectiva y añadir 1 mL de DMEM para inactivar la tripsina. El volumen total de 1,5 mL (+ 500  $\mu$ l de tripsina + 1 mL de DMEM) contenido en el flask se trasvasa con una micropipeta a un tubo estéril.

El siguiente paso consiste en contar las células disponibles para poder preparar la suspensión celular a la densidad deseada. Este proceso se realiza con el contador de células automatizado *Countess*<sup>TM</sup> 3 (Invitrogen) y el reactivo azul tripano (Trypan blue 0.4%, Amresco). Tras conocer las células disponibles, se centrifuga la disolución de células (5 minutos a 1200 rpm) y se resuspende el *pellet* de células en la cantidad de medio adecuado para la densidad deseada que se ha calculado previamente.

## 2.2.2. Fabricación de geles de colágeno

Como se ha explicado en la introducción de este trabajo, los cultivos 3D se han logrado embebiendo las células en matrices de colágeno. Durante este trabajo, se han utilizado tres concentraciones distintas de colágeno: 6 mg/mL, 4 mg/mL y 2,5 mg/mL. El procedimiento para su preparación es equivalente en los tres casos y se detalla a continuación. En primer lugar, es necesario tener los reactivos a usar preparados, entre ellos:

- **Disolución *stock* de colágeno:** Colágeno tipo I de cola de rata (9,48 mg/mL, Dow Corning).

El colágeno debe permanecer siempre a una temperatura de 4°C para que no gelifique durante la preparación, por lo que es necesario mantenerlo en frío durante todo el proceso. Para ello, se ha de preparar una caja con hielo.

- **DPBS:** *Dulbecco's phosphate buffered saline* (Euroclone), contiene rojo fenol y sirve para evaluar el pH del gel de manera rápida y visual (Figura 2.4). Es necesario que el gel tenga un pH de 7.4 para asegurar la viabilidad celular.
- **NaOH 0.5M** (Sigma-Aldrich): Debido al carácter ácido del colágeno, es necesario neutralizar el gel con una base biocompatible en baja concentración como es el caso de NaOH.
- **Dispersión celular** a la concentración deseada, preparada según procedimiento detallado en la sección 2.2.1. Cabe destacar que el contenido celular que se introduce en el gel se va a diluir cinco veces (tabla 2.1). Por ello, la densidad a la que hay que dispersar las células inicialmente es cinco veces la densidad celular requerida en el gel.

La densidad celular utilizada en los dispositivos microfluídicos es de  $2 \cdot 10^5$  células/mL. Por ello, tras realizar el conteo de las células disponibles, hay que concentrarlas hasta  $10^6$  células/mL.

En la tabla 2.1 se muestran los volúmenes necesarios de cada reactivo para fabricar 50  $\mu$ l de los diferentes tipos de hidrogel. Para fabricar los geles, se añaden los volúmenes correspondientes de los reactivos en un vial inmerso en hielo. La figura 2.4 muestra la fabricación de los hidrogeles de manera esquemática.

Reactivo	Vol. 6mg/mL	Vol. 4mg/mL	Vol. 2,5mg/mL
10x DPBS	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
NaOH 0.5M	1.9 $\mu\text{L}$	1.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Colágeno (9.48 mg/mL)	31.6 $\mu\text{L}$	21.1 $\mu\text{L}$	14 $\mu\text{L}$
Disolución de células	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
Medio de cultivo	1.5 $\mu\text{L}$	12.4 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
Vol. total de gel	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

Tabla 2.1: Volúmenes necesarios para la preparación de 50  $\mu\text{L}$  de hidrogel de colágeno a diferentes concentraciones (6 mg/mL, 4 mg/mL y 2.5 mg/mL).

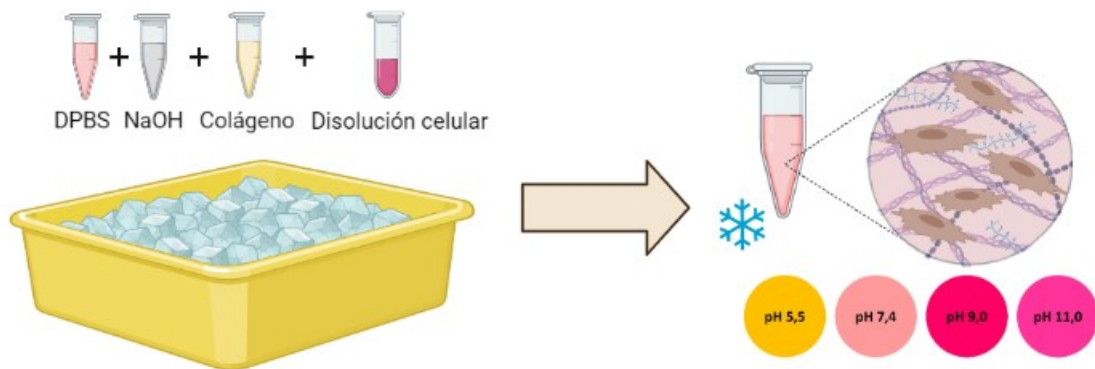


Figura 2.4: Esquemmatización del proceso a seguir para preparar hidrogel de colágeno en el correspondiente vial. Durante la preparación del gel, hasta la siembra del mismo en los dispositivos, se mantienen los viales en hielo ( $4^{\circ}\text{C}$ ), para evitar una temprana polimerización del hidrogel. La gama de colores de amarillo (ácido) a rosa (base) permite una visualización rápida del pH del gel. Es necesario ajustar el pH a 7.4 para no comprometer la viabilidad celular y crear una matriz más fisiológica.

### 2.2.3. Hidrogeles suplementados con Nanoarcillas Laponita

Para la modificación arquitectónica y reológica de los hidrogeles, se ha añadido Laponita. Esta suplementación se consigue fabricando los geles con medio de cultivo suplementado con 0.1% w:v de la arcilla en polvo. En el grupo de investigación M2BE – Multiescala en Ingeniería Mecánica y Biológica, se optimizó previamente el procedimiento para crear la disolución de Laponita capaz de disolverse en medio de cultivo sin precipitar y sin formar agregados [26]. El procedimiento se detalla en la figura 2.5 y consiste en disolver el polvo de Laponita en agua Milli-Q al 1% en peso para, posteriormente, diluir esta disolución en medio de cultivo en una proporción 1:10, respectivamente.

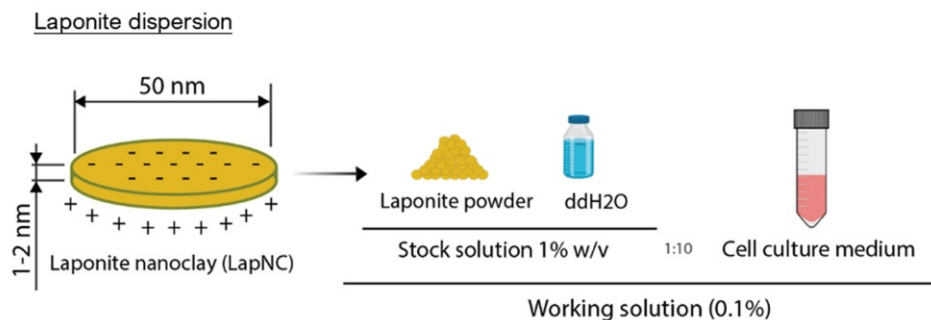


Figura 2.5: Esquematación del proceso de preparación de medio de cultivo suplementado con Laponita. Laponita en polvo se dispersa en 1 % peso:volumen en agua desionizada (miliQ). Esta dispersión se diluye nuevamente en medio de cultivo 1/10 dando lugar a la dispersión de trabajo que se utilizará para la fabricación del hidrogel suplementado. Imagen adaptada de Alamán-Díez P. *et al.* (2023) [26].

De cara a la fabricación de los hidrogeles suplementados, bastaría con utilizar el mismo protocolo detallado previamente y resumido en la tabla 2.1, pero cambiando el medio de cultivo habitual por el suplementado (dispersión de 0.1 % de Laponita). El resto de parámetros serían equivalentes.

Como se ha comentado previamente, las matrices que se van a estudiar en este trabajo están fabricados como diluciones de colágeno tipo I a diferentes concentraciones (2.5 mg/mL, 4 mg/mL y 6 mg/mL) con y sin la suplementación de Laponita. Estas matrices han sido caracterizadas previamente en el grupo de investigación y los resultados son parte del artículo publicado: “*Collagen-Laponite Nanoclay Hydrogels for Tumor Spheroid Growth*” en la revista científica *Biomacromolecules* (2023) [26]. Las conclusiones obtenidas se han utilizado como base en el planteamiento de los diferentes ensayos. A continuación se van a listar las modificaciones observadas en las propiedades físicas y estructurales de los diferentes hidrogeles, resumidas en las figuras 2.6-2.7.

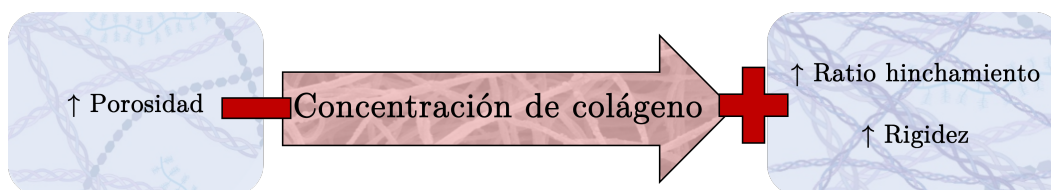


Figura 2.6: Caracterización de las matrices en función de la concentración de colágeno.

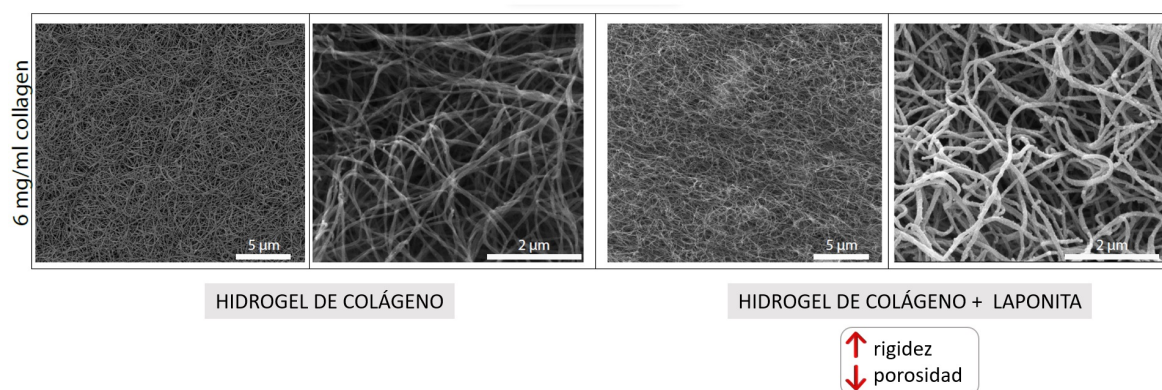


Figura 2.7: Imágenes de microscopio electrónico de barrido de los hidrogeles de colágeno (6 mg/mL) sin suplementar y suplementados con Laponita, destacando las variaciones principales en sus propiedades causadas por la presencia de las nanopartículas (adaptado del artículo de Alaman-Díez *et al.* (2023)) [26].

- La **porosidad** disminuyó al aumentar la concentración de colágeno y al introducir Laponita.
- La **permeabilidad** de los geles se redujo con el aumento de colágeno y con la presencia de Laponita, tal como ocurría en el caso de la porosidad.
- El **ratio de hinchamiento** de los geles aumentó cuanto mayor es su cantidad de colágeno. Por otro lado, se vió que en los geles de 2.5 y 4 mg/mL existía una reducción significativa del ratio de hinchamiento cuando el gel está suplementado.
- Las **propiedades mecánicas** se incrementaron significativamente con la concentración de colágeno así como con la introducción de Laponita.

#### 2.2.4. Siembra de los hidrogeles en los dispositivos

Tras preparar las disoluciones de colágeno en frío (con o sin suplementación de Laponita), se realiza la siembra del gel en los dispositivos microfluídicos. Para ello, se introduce lentamente un volumen entre 10-15  $\mu\text{L}$  de gel con una micropipeta a través del canal central de carga (Figura 2.8.2). Posteriormente, se colocan los dispositivos boca abajo en una caja húmeda que debe ser llevada a la incubadora a 37°C. La polimerización del hidrogel tarda aproximadamente 20 minutos. Las células deben quedar embebidas en la matriz colagenosa formando una red 3D de cultivo. Para evitar que las células caigan por gravedad a 2D mientras el gel polimeriza totalmente, los dispositivos se voltean cada cinco minutos mientras dura la polimerización.

Una vez que se ha polimerizado el gel dentro de los canales centrales, hay que hidratar los canales laterales (Figura 2.8.3) con el medio de cultivo apropiado para cada tipo

de célula. En concreto, para las células madre mesenquimales se ha usado medio de cultivo osteogénico (OCM) para inducir la osteogénesis\* y para las células de cancer, DMEM de alta glucosa como se ha detallado previamente.

Para hidratar el cultivo sin comprometer la estabilidad del gel recién sembrado, se corta la punta de la micropipeta para conseguir encajarla sin presión en el orificio de 4 mm del dispositivo y proceder a llenar ambos canales, haciendo pasar el medio de cultivo de un orificio a otro. 200  $\mu\text{L}$  por dispositivo son suficientes para nutrir las células durante 48 horas.

\* **NOTA:** El OCM es DMEM de baja glucosa (1 g/L) suplementados con  $\beta$ -Glicerol fosfato (10 nM) y ácido ascórbico (50  $\mu\text{M}$ ). Estos suplementos se han seleccionado para promover la diferenciación osteogénica de las células, según una revisión bibliográfica [28, 29].

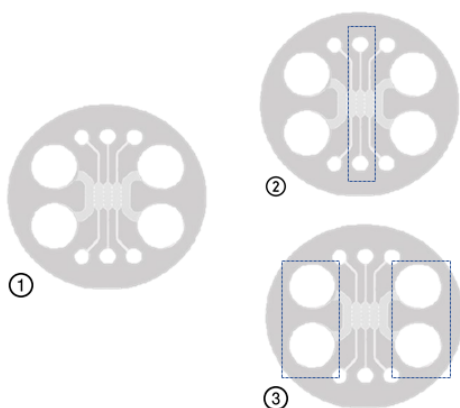


Figura 2.8: **1:** Dispositivo microfluídico de tres canales donde se va a realizar la siembra. **2:** Canal central a través del cual se introduce el hidrogel. **3:** Canales a través de los cuales se introduce el medio de cultivo.

Por último, se cubren los dispositivos individualmente con sus respectivas tapas que habían sido previamente esterilizadas, como se ha explicado en la sección 2.1. Una vez tapados, las muestras se agrupan en una placa petri que se mantiene en la incubadora a las condiciones óptimas de crecimiento (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , 21%  $\text{O}_2$ ). Hasta el final del experimento, cada 48 horas es necesario cambiar el medio de cultivo de las muestras para asegurar la llegada de nutrientes. Para ello, retirar con una micropipeta el medio viejo y verter otros 200  $\mu\text{L}$  de medio nuevo (atemperado previamente en un baño a 37°C).

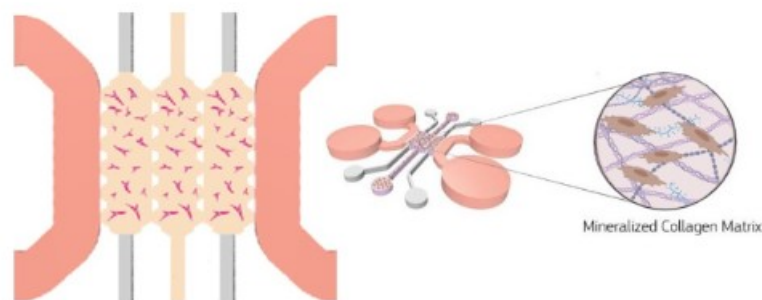


Figura 2.9: Esquema de la geometría interior de un dispositivo microfluídico donde se muestra: la cámara de cultivo compuesta por tres canales donde se embebe el hidrogel que contiene el cultivo celular 3D; y los canales de medio de cultivo a través de los cuales llegan los nutrientes al cultivo por difusión atravesando el gel hasta las células. Figura adaptada de Nasello *et al.* (2020) [29].

Los cultivos en los dispositivos microfluídicos se mantienen durante nueve días. Cada 48 horas se realiza la medición de viabilidad celular y el seguimiento por microscopía que se va a detallar a continuación.

### 2.2.5. Cocultivo con células madre

En este trabajo, se ha realizado el cocultivo de células MG63-uADSC en un ratio 1:1 [30], en una matriz de 6 mg/mL dentro de dispositivos microfluídicos. Para la siembra del gel que contiene ambas líneas, se sigue nuevamente el procedimiento resumido en la tabla 2.1. En este caso, la suspensión celular que se añade a la mezcla de colágeno contiene 50% de cada una de las líneas. Es decir, de manera individual, cada línea celular se resuspende en una concentración de  $2 \cdot 10^5$  (se decidió trabajar en las mismas condiciones que en los cultivos realizados de las líneas celulares por independiente, apartado 2.2.2).

Además de la proporción de cada una de las líneas, otro de los parámetros del estudio es el medio de cultivo utilizado. Por separado, ambas líneas se crecen con medios diferentes. Por ello, se ha realizado el experimento duplicado y cada uno se ha hidratado con un medio (DMEM alta y baja glucosa).

Los cocultivos se incuban durante siete días, durante los cuales se lleva a cabo un seguimiento visual por microscopía óptica (apartado 2.5.1). Al finalizar este periodo, las muestras se fijan y se tiñen (apartado 2.5.2) para poder observar su morfología con fluorescencia.

### 2.3. Estudio de viabilidad celular

Se ha cuantificado la viabilidad celular mediante ensayos colorimétricos. Se ha utilizado el reactivo *AlamarBlue* (AB), que es un indicador redox que produce un cambio colorimétrico y una señal fluorescente en respuesta a la actividad celular [31]. Específicamente, se basa en la capacidad de las células vivas y metabólicamente activas para reducir un indicador químico, conocido como *resazurina* a *resorufina*, un producto fluorescente. Entre sus características, destaca su alta sensibilidad y citocompatibilidad, no interviniendo su uso en ensayos posteriores a la medición y siendo compatible con instrumentación de absorbancia y fluorescencia. [32].

Para cada condición se van a evaluar tres muestras (n=3) y se va a estudiar la viabilidad cada 48h a lo largo de 9 días de cultivo, como se ha indicado previamente. Para cada día de medida, el procedimiento para realizar el ensayo comienza por preparar una disolución 1:10 en volumen de AB y medio de cultivo. Son necesarios 200  $\mu\text{L}$  por cada dispositivo microfluídico y 200  $\mu\text{L}$  adicionales para disponer de un blanco de ensayo. El AB es sensible a la radiación, por lo que es necesario realizar todo el procedimiento en ausencia de luz.

Una vez preparada la disolución, retirar el medio de cultivo viejo de cada dispositivo y, de la misma manera que se renueva el medio, depositar los correspondientes 200  $\mu\text{L}$  en cada dispositivo, asegurando que atraviesan el canal y quedan en contacto con el gel. Posteriormente, tapar los dispositivos, envolverlos en papel de aluminio para evitar su exposición a la luz. Posteriormente, se incuban durante tres horas a 37°C.

Transcurrido el periodo de incubación se puede realizar la lectura. Para ello, el volumen de la disolución de AB de cada dispositivo (200  $\mu\text{L}$ ) se reparte en pocillos de una placa de lectura de 96. A continuación, la placa de pocillos se introduce en el espectrofotómetro (Synergy HT Multi-mode microplate reader, BioTek Instruments) y se realiza la lectura con fluorescencia, excitando el AB a  $\lambda = 530 - 560\text{nm}$ . En la figura 2.10 se esquematiza el protocolo de la medida de viabilidad.

Al finalizar la lectura los datos se almacenan en Excel. Este experimento se ha realizado en todos los cultivos cada 48 horas hasta nueve días de cultivo. Los experimentos se han realizado en triplicados para obtener una estadística fiable. Finalmente, una vez realizada la medida, los dispositivos pueden continuar con su incubación en medio de cultivo. Para ello, se realiza un lavado con PBS de cada muestra y se introduce medio de cultivo previamente atemperado.

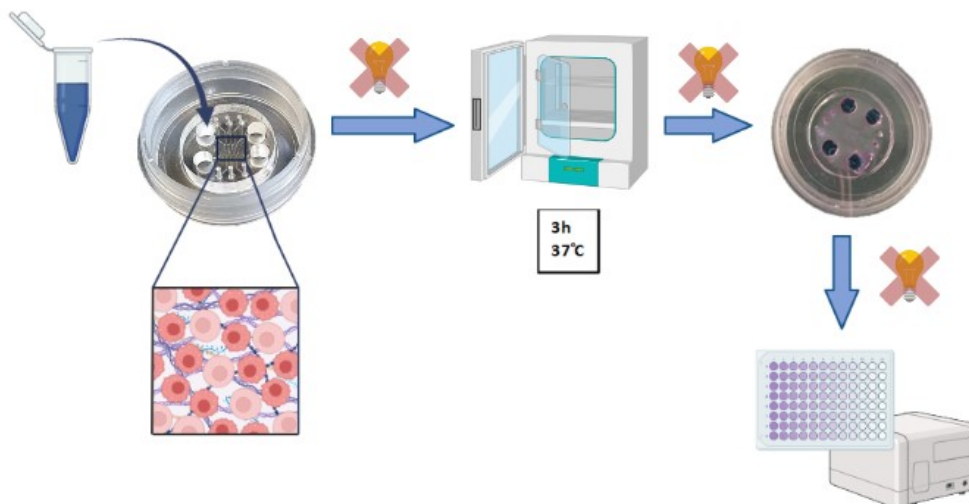


Figura 2.10: Esquematización del procedimiento seguido para el estudio de viabilidad celular en las muestras: introducción de la dilución AB-medio de cultivo en las muestras, incubación del reactivo, recogida de muestras y toma de datos con el espectrofotómetro.

## 2.4. Formación de esferoides por gota colgante

Para la creación de los esferoides se ha utilizado el método de “gota colgante”. Este método consiste en crear gotas de una suspensión celular sobre una superficie de vidrio o plástico, en este caso, sobre la tapa de una placa de Petri (Figura 2.11). De esta manera, las células contenidas en cada gota creada se desplazan por gravedad hacia el fondo de ésta para, al cabo de 3-5 días [33], formar el esferoide (Figura 2.12). El parámetro principal que va a determinar el tiempo de creación del esferoides, así como su tamaño, es la cantidad de células introducidas en la gota.

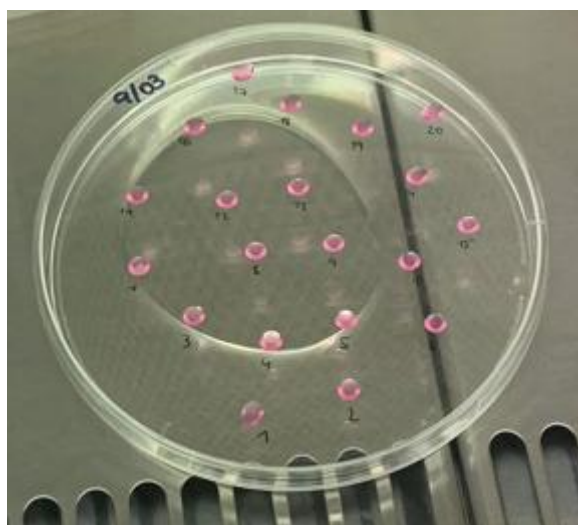


Figura 2.11: Placa de Petri donde se forma un esferoide por cada gota mediante el método de gota colgante.

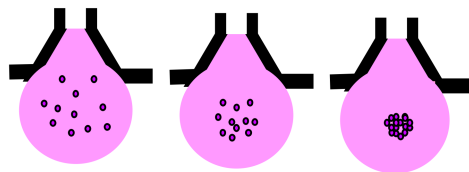


Figura 2.12: Diagrama que muestra el proceso de desplazamiento celular durante la formación de un esferoide en el interior de una gota colgante [33].

El procedimiento correspondiente se detalla a continuación: En primer lugar, se crea la disolución de la concentración deseada de células siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1. En este Trabajo de Fin de Grado, todos los experimentos de gota colgante se han realizado con disoluciones de densidad correspondiente a  $2 \cdot 10^5$  células/mL. Existen resultados previos obtenidos para esferoides de MG63 con densidades de  $5 \cdot 10^5$  células/mL (publicados ya hace varios años por el grupo de Santini *et al.* [34, 35]) y  $1 \cdot 10^5$  células/mL [36]. Por otro lado, se ha demostrado que a mayor densidad celular, menos viabilidad celular [37] por lo que en este trabajo se ha decidido utilizar con una densidad intermedia.

Una vez creada dicha disolución, con la pipeta, coger el volumen correspondiente a cada gota ( $40 \mu\text{L}$ ), e ir depositándolas sobre la parte interior de la tapa de la placa de Petri. A la densidad celular seleccionada, esto implica una cantidad aproximada de 8.000 células/mL. A continuación, depositar agua estéril sobre la parte inferior de la placa para evitar la evaporación de las gotas. Por último, darle la vuelta a la tapa, cerrar la placa y llevarla a la incubadora a condiciones de  $37^\circ\text{C}$  and  $5\% \text{CO}_2$ . Cada 2-3 días se le debe cambiar el medio de cultivo a cada gota. Para ello, aspirar suavemente con la pipeta el medio de cultivo viejo y depositar sobre el esferoide medio de cultivo nuevo para formar la nueva gota y aportar nutrientes a la muestra.

## 2.5. Seguimiento del cultivo por microscopía óptica

### 2.5.1. Microscopía de campo claro

Se utilizó un microscopio Nikon D-Eclipse C1 para obtener imágenes de la evolución de los cultivos celulares a lo largo del tiempo. En cada punto temporal, los dispositivos microfluídicos de cada experimento se colocaron en la platina del microscopio y se tomaron varias imágenes a diferentes aumentos. Se observó cualitativamente la evolución del cultivo durante el experimento. Asimismo, para el estudio de crecimiento de esferoides que se plantea en la sección 3.3, se realizó una cuantificación del área de los mismos con el programa ImageJ.

### 2.5.2. Fluorescencia: visualización del núcleo y esqueleto celular

Para visualizar las células mediante microscopía de fluorescencia y confocal, las muestras han sido teñidas con marcadores fluorescentes. Se ha observado el núcleo celular y los filamentos de actina (Figura 2.13) gracias a los fluoróforos DAPI y faloidina, respectivamente:

- **DAPI** (Invitrogen): Es un colorante que se adhiere firmemente al ADN, permitiendo así la observación de los núcleos celulares a través de un microscopio de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y emisión de este compuesto son de 340 y 454 nm, respectivamente.
- **Faloidina** (Sigma - Aldrich): Es un péptido que se adhiere a los filamentos de actina de las células, lo que permite la observación de parte del citoesqueleto y la distinción del contorno celular. Las longitudes de onda necesarias para excitar y emitir la fluorescencia son de 540 y 570 nm, respectivamente.

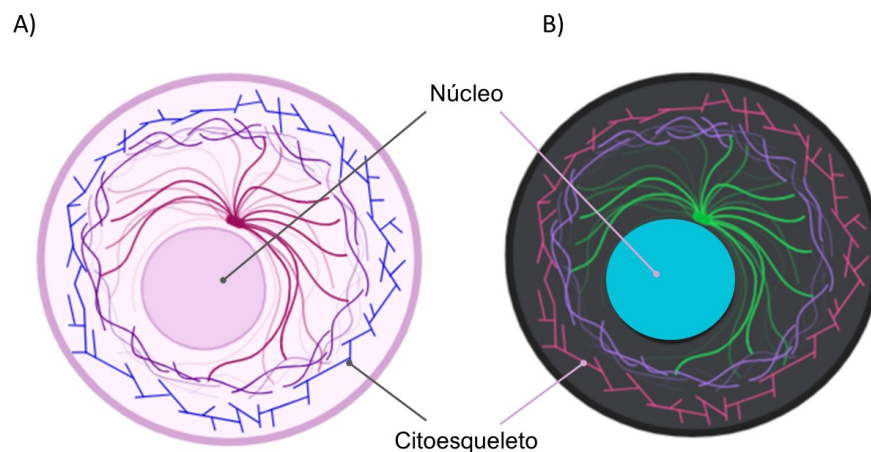


Figura 2.13: Esquema de la composición interior de una célula: núcleo y citoesqueleto (A). Al realizar la tinción se pueden marcar las diferentes partes para observar estas partes de la célula con fluorescencia (B).

Para realizar la tinción, el primer paso es fijar las muestras. Para ello, una vez finalizado el cultivo, se retira el medio y se lava la muestra (tres veces con PBS durante cinco minutos). Después, se realiza la fijación con un tratamiento de 15 minutos con una disolución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Pasados los 15 minutos, se realizan otros tres ciclos de lavado con PBS.

Posteriormente, y previo a la introducción de los reactivos fluorescentes, es necesario permeabilizar la membrana celular para permitir el paso de los tintes y bloquear las

inespecificidades haciendo que cada tinte se adhiera de forma selectiva. Los procesos de bloqueo, permeabilización y tinción duran un total de dos días. Las tinciones fluorescentes tradicionales de una monocapa sobre una placa tienen una duración menor. No obstante, en las muestras aquí utilizadas hay que considerar la difusión de las moléculas a través de la matriz 3D hasta los marcadores. Las disoluciones preliminares a preparar son:

- **0.1 % de tritón X -100 en PBS** (Calbiochem): Su función es hacer permeable la membrana celular y permitir que los reactivos fluorescentes penetren en el cuerpo celular.
- **5 % de Albúmina de Suero Bovino (BSA) en PBS** (Dow Corning): Actúa como agente bloqueante impidiendo las uniones no específicas.

Tras la fijación de las muestras, se pueden almacenar a 4°C durante un mes. Cuando se desee llevar a cabo la tinción de las muestras, se realiza el proceso aquí detallado:

**DÍA 1 - Bloqueo y permeabilización de la membrana:** Mantener las muestras agitándose durante 30 minutos con la disolución de tritón. Transcurrido este tiempo, lavar tres veces con PBS. Posteriormente, añadir la disolución de BSA y mantener las muestras toda la noche sobre un agitador a 4°C.

**DÍA 2 - Tinción:** Retirar la disolución de BSA y añadir la disolución con los marcadores fluorescentes\*. Esta disolución contiene unas proporciones de 1:100 y 1:200 en volumen de DAPI y faloidina, respectivamente, sobre un 1 % de BSA en PBS. El volumen total viene dado por el número de muestras a teñir (aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  por dispositivo). Se recomienda crear la disolución en un eppendorf del volumen necesario y, una vez añadidos los marcadores, agitar en el *vortex* para asegurar una buena mezcla de los compuestos. Una vez añadida, mantener las muestras agitándose durante tres horas. Finalmente, retirar la disolución y las muestras ya están preparadas para ser observadas al microscopio.

*\*NOTA: Es muy importante trabajar durante todo el proceso de tinción en condiciones mínimas de luz para evitar la destrucción fotoquímica de los fluoróforos. [28]*

Una vez realizado el lavado, la muestra ya está teñida y lista para ser observada al microscopio óptico de fluorescencia. En nuestro caso, para la visualización se ha utilizado el microscopio Axio Observer 7 (Zeiss).

## 2.6. Parafinado de esferoides

En este trabajo, se realizó una evaluación del crecimiento en forma de *cluster* y se ha observado la morfología esférica desde las etapas iniciales de su formación (apartado 2.5.1). Sin embargo, no se ha investigado por el momento la funcionalidad de estos esferoides como modelo *in vitro* tumoral.

Para poder utilizar este modelo de cáncer en aplicaciones tan relevantes como el estudio de liberación de fármacos, es esencial verificar si el comportamiento de estos esferoides emula ciertos estadios característicos de un tumor. En este trabajo se han propuesto diferentes ensayos en esta línea, basados en diferentes artículos científicos y evidencias recientes. No obstante, para poder realizar estos ensayos futuros, que se detallarán en la discusión, hay una etapa previa de preparación de las muestras. Durante la realización de este Trabajo Fin de Grado se ha puesto en práctica este procedimiento para realizar la formación de los equipos y preparar muestras de cara a la realización de los experimentos propuestos en esta sección. Estos experimentos se han realizado en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

En primer lugar, se han fijado los esferoides con el protocolo descrito en la sección 2.5.2. Después se han deshidratado las muestras con baños en etanol y n-butanol. Con las muestras deshidratadas, se comienza a parafinar realizando diferentes inmersiones en parafina a 65°C en un termobloque. Posteriormente, los esferoides se transfieren al centro de un molde junto con un poco de parafina (Figura 2.14-a). Rápidamente, se coloca la muestra al baño de hielo y se coloca el porta de histología en el molde, añadiendo la parafina para formar el bloque. Una vez solidificado en el hielo, se retira el porta del molde y se tiene la muestra parafinada lista para realizar cortes transversales (Figura 2.14-b-c).

Los cortes transversales se han realizado con un microtomo (Microm HM 355S, Thermo Scientific) y son recogidos en portas de vidrio como se observa en la Figura 2.15. Estas muestras ya preparadas servirán para comenzar los procedimientos de tinción propuestos a lo largo de este apartado.

Las futuras tinciones realizadas a este tipo de muestras se realizan en 2D- No obstante, los resultados obtenidos son extrapolables a 3D puesto que se está viendo el interior del esferoide gracias a los corte transversal realizados a lo largo de todo el espesor.

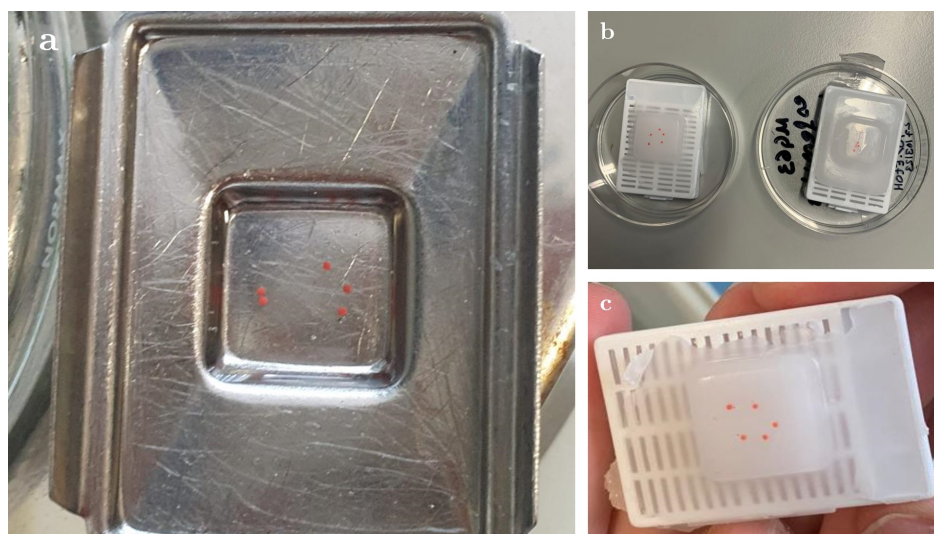


Figura 2.14: Proceso de parafinado de esferoides. a) Esferoides transferidos al centro del molde junto con un poco de parafina. b y c) Bloque de parafina creados con los esferoides inmersos, listos para cortar en microláminas.



Figura 2.15: Microláminas de los bloques de parafina con los cortes transversales de los esferoides inmersos depositadas sobre un porta. Muestras preparadas para comenzar con la tinción.

# Capítulo 3

## Resultados y discusión

### 3.1. Estudio de viabilidad

#### 3.1.1. Evolución de la línea de OS

La viabilidad celular se ha calculado como el incremento porcentual de la intensidad de fluorescencia obtenida entre los días final e inicial del estudio para las diferentes muestras, como se ha detallado en la sección 2.3. De esta manera, se ha estudiado el efecto de la concentración de colágeno y el efecto de la presencia de nanoarcillas de Laponita para cada una de ellas.

En la figura 3.1 se muestra el porcentaje de incremento de viabilidad de las células de OS. Se observa que cuanto mayor es la concentración de colágeno, mayor es este incremento. Especialmente, se observan diferencias significativas en los resultados del gel de 6 mg/mL (p valor = 0, test no paramétrico Kruskal-Wallis). Para la condición de 2,5 mg/mL a tiempo final, únicamente se tiene un dato de viabilidad por los problemas de estabilidad serán comentados posteriormente (apartado 3.2, figura 3.7).

Se sabe por bibliografía que las células de OS poseen mayor crecimiento en matrices más rígidas, por lo que estos resultados coinciden con nuestra hipótesis. Coincidiendo con esta tendencia, Tong-Meng Jiang *et al.* demostraron el mayor crecimiento y mayor malignidad tumoral en este tipo de células comparando cuatro matrices de diferentes rigidez, concretamente: colágeno, matrigel, alginato y agarosa [38].

Por ese motivo, y dados los resultados de la caracterización de los geles suplementados con Laponita (apartado 2.2.3), se esperaba que la viabilidad de las células de OS en los geles suplementados fuera mayor. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones para ninguno de los geles (resultados no mostrados). Uno de los motivos que puede explicar esta discrepancia es que la densidad celular sembrada al inicio puede no ser óptima para apreciar el efecto de la rigidez en la viabilidad en este tipo celular. Por ejemplo, como se observará próximamente, en el estudio del comportamiento las células madre, sí se aprecia este

efecto. Finalmente, debido a la inherente variabilidad en la actividad biológica de las células que conlleva a la variabilidad de los datos, sería aconsejable realizar un análisis estadístico con un número mayor de repeticiones.

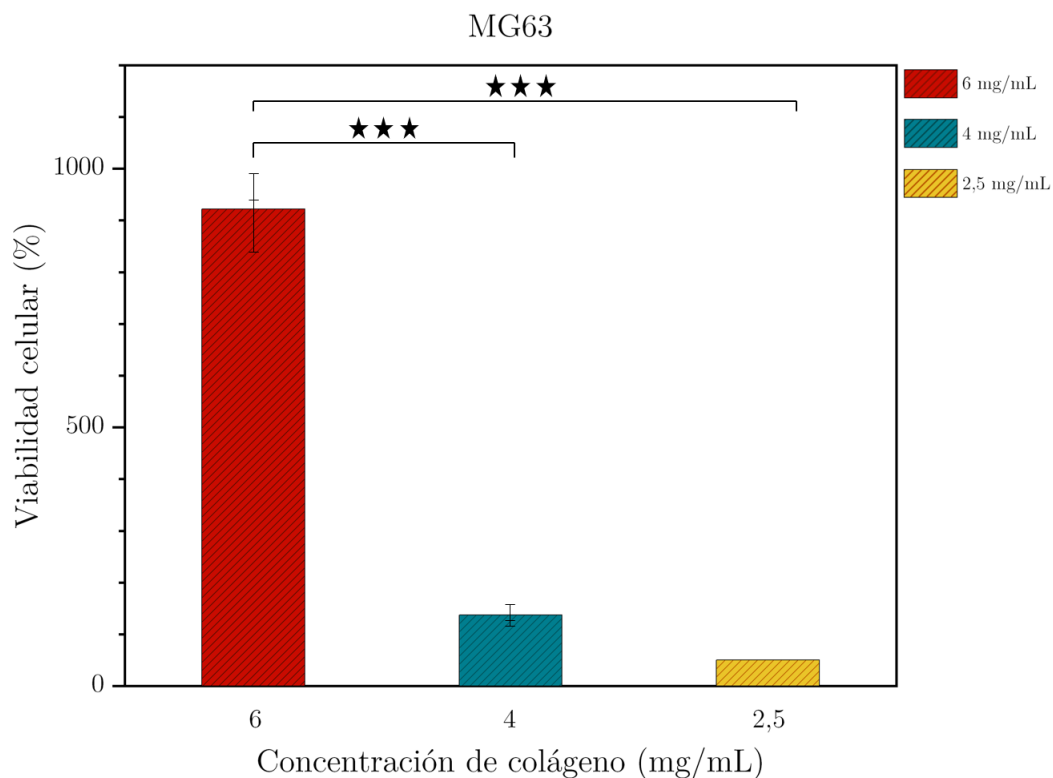


Figura 3.1: Porcentaje de incremento de viabilidad entre la siembra y el final del cultivo (día 10) para la línea celular de OS (MG63) embebidas en los geles de colágeno a diferente densidad (6, 4 y 2.5 mg/mL).\*\*\* p valor < 0.005

No obstante, la introducción de Laponita en los hidrogeles como sistema de cultivo de células cancerosas es altamente prometedora. Se ha visto que la Laponita tiene mucho potencial como vector de fármacos debido a sus propiedades superficiales en la nanoescala. Diferentes artículos han demostrado que la liberación sostenida de fármacos antitumorales mediante su adsorción en las láminas de Laponita es favorable frente a la liberación directa del mismo [24]. Por ello, aunque los experimentos realizados con las células de OS en matrices con Laponita no hayan sido concluyentes, es necesario continuar con la investigación en esta línea de trabajo.

### 3.1.2. Evolución de la línea de uADSC

En relación al estudio de las uADSC, no existe ninguna evidencia científica hasta donde llega nuestro conocimiento de que proliferen más o menos en respuesta a una

mayor concentración de colágeno. No obstante, se sabe que hay una relación en su capacidad proliferativa y de diferenciación en función de parámetros físicos y mecánicos del sustrato [39]. Por ello, el enfoque estudiado sobre las uADSC se ha centrado en la comparación de la viabilidad celular entre los hidrogeles suplementados con Laponita y aquellos sin suplementar.

Los resultados obtenidos para el estudio de las células uADSC en geles con Laponita se muestran en la figura 3.2. Se observó que para las matrices de 2.5 y 4 mg/mL, la viabilidad celular es mayor en el gel suplementado (p valor < 0.05, test no paramétrico Kruskarwallis). Por ello, podemos afirmar que la presencia de Laponita en la matriz de colágeno afecta al crecimiento y proliferación de las células uADSC. Sin embargo, para matrices de alta concentración de colágeno se observa lo opuesto (figura 3.2).

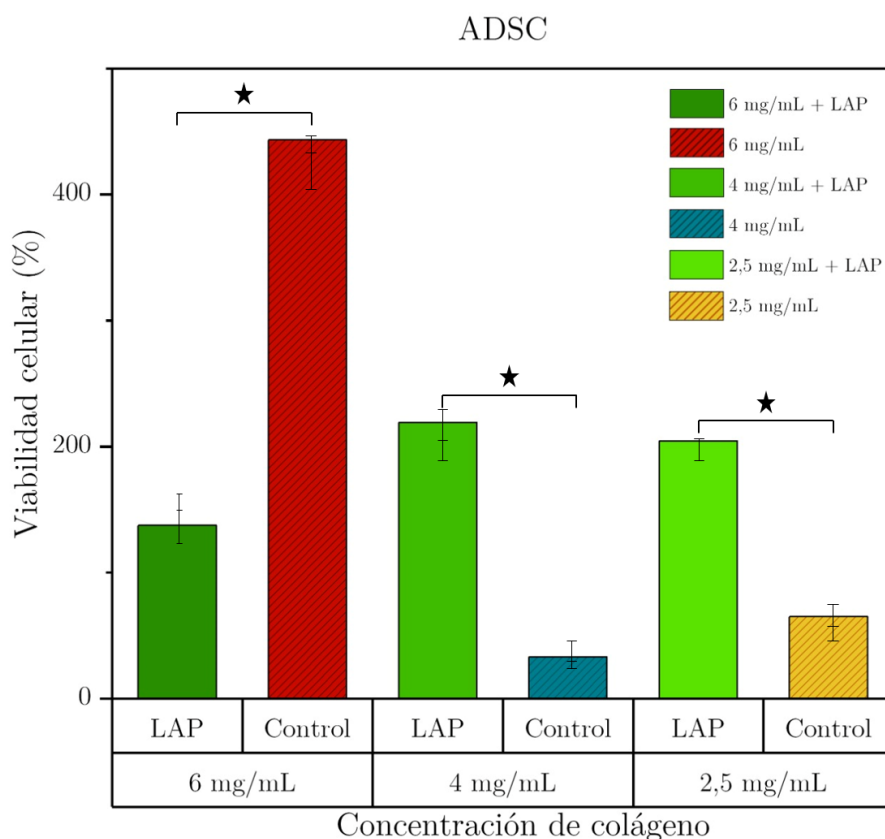


Figura 3.2: Resultados obtenidos del estudio de viabilidad realizado a las células uADSC en las diferentes matrices de colágeno. \* p valor < 0.05

Zanotelli *et al.* [40] estudiaron matrices colagenosas entre 1 y 10 mg/mL y demostraron que a partir de una rigidez determinada, las células pueden perder su capacidad migratoria y de proliferación temprana. Se sabe que el módulo de almacenamiento de las matrices de 6 mg/mL suplementadas con Laponitas es aproximadamente 600 Pa, mientras que la no suplementada es de 450 Pa [26]. Por

ello, nuestra hipótesis es que el gel suplementado sobrepasa el umbral de rigidez en el que las células siguen la tendencia descrita anteriormente y pierden esta capacidad proliferativa.

En conclusión, se ha demostrado un aumento en la proliferación de las células de OS en matrices más rígidas, lo que sugiere la importancia de continuar investigando el efecto de las Laponitas en esta línea celular. Por otro lado, con respecto a las células uADSC, se ha visto como para los hidrogeles de densidades correspondientes a 2,5 y 4 mg/mL, la introducción de Laponitas estimula la reproducción celular mientras que al aumentar la rigidez del gel a 6 mg/mL, este estímulo se pierde al sobrepasar un umbral determinado.

La posibilidad de modificar las propiedades del hidrogel de una manera selectiva, ofrece un amplio rango de potenciales aplicaciones. Además de lo previamente mencionado para el estudio de OS, otra posible utilidad puede ser potenciar la diferenciación osteogénica de las uADSC. En el grupo M2BE se ha publicado un modelo óseo *in vitro* en dispositivos microfluídicos donde se observaba que las uADSC necesitan un periodo de diferenciación en cultivo 2D previo a la siembra en 3D en los geles para lograr una diferenciación completa [26]. Con la aplicación de este hidrogel, se podría conseguir un modelo óseo completo sin necesidad de prediferenciar. Además, el potencial de Laponita como vector de fármacos podría suponer un avance en este aspecto. Por ejemplo, liberando de manera controlada ciertas proteínas que potencien la osteogénesis como ciertas proteínas morfogénicas (BMP2, BMP7) [41].

### 3.2. Seguimiento de los cultivos por microscopia

Los cultivos en los dispositivos microfluídicos se incubaron durante nueve días en las seis matrices: 2.5, 4 y 6 mg/mL de colágeno; con y sin la adición de Laponita. Cada 48 horas se tomaron imágenes del centro del canal para estudiar cualitativamente la evolución del cultivo celular dentro del chip. En las figuras 3.3 - 3.6 se observan dispositivos representativos de cada grupo experimental, sobre los que se van a comentar los resultados generales observados.

En primer lugar, se puede observar como los geles están más poblados conforme avanzan los días de cultivo, lo que reafirma la proliferación celular observada previamente en los resultados de viabilidad del apartado anterior. Este efecto se observa tanto en OS como en uADSC.

Por otro lado, se ha observado en los dispositivos la estabilidad del hidrogel con el tiempo. Este hecho es importante para poder asegurar un sistema de cultivo celular fiable para diferentes ensayos. No obstante, para geles de baja concentración de colágeno

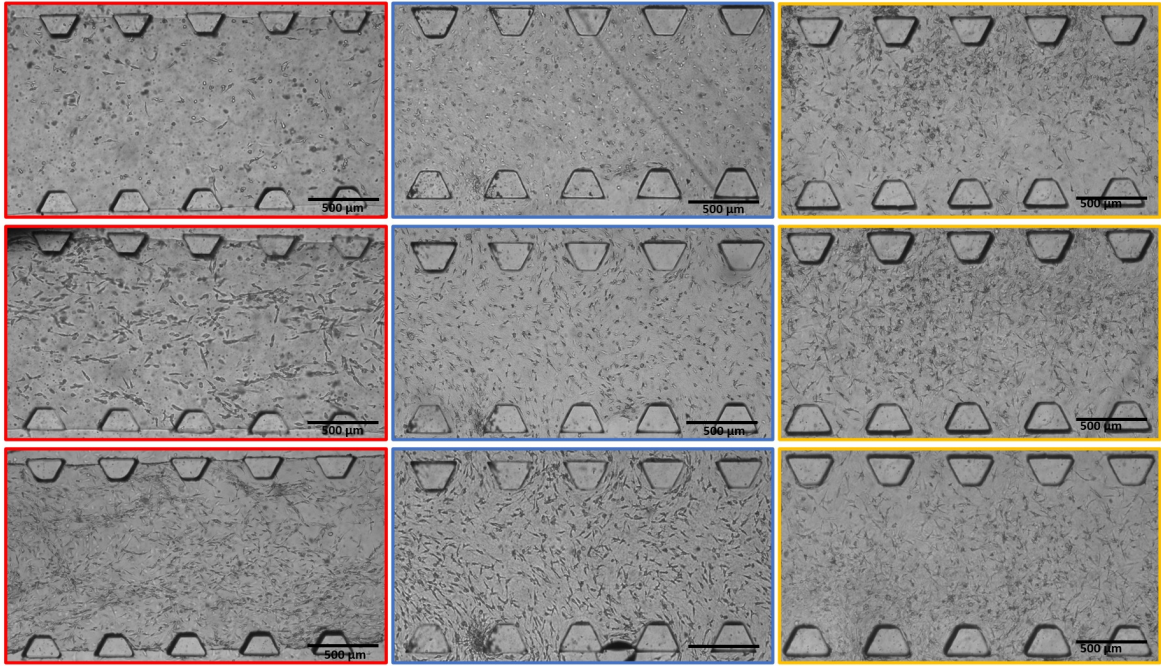


Figura 3.3: Imágenes tomadas a 4X de células OS (MG63) en matrices de 6 (rojo), 4 (azul) y 2,5 (amarillo) mg/mL de colágeno. Días 1, 5 y 9 de cultivo, verticalmente. La escala indicada en negro corresponde a 500  $\mu\text{m}$ .

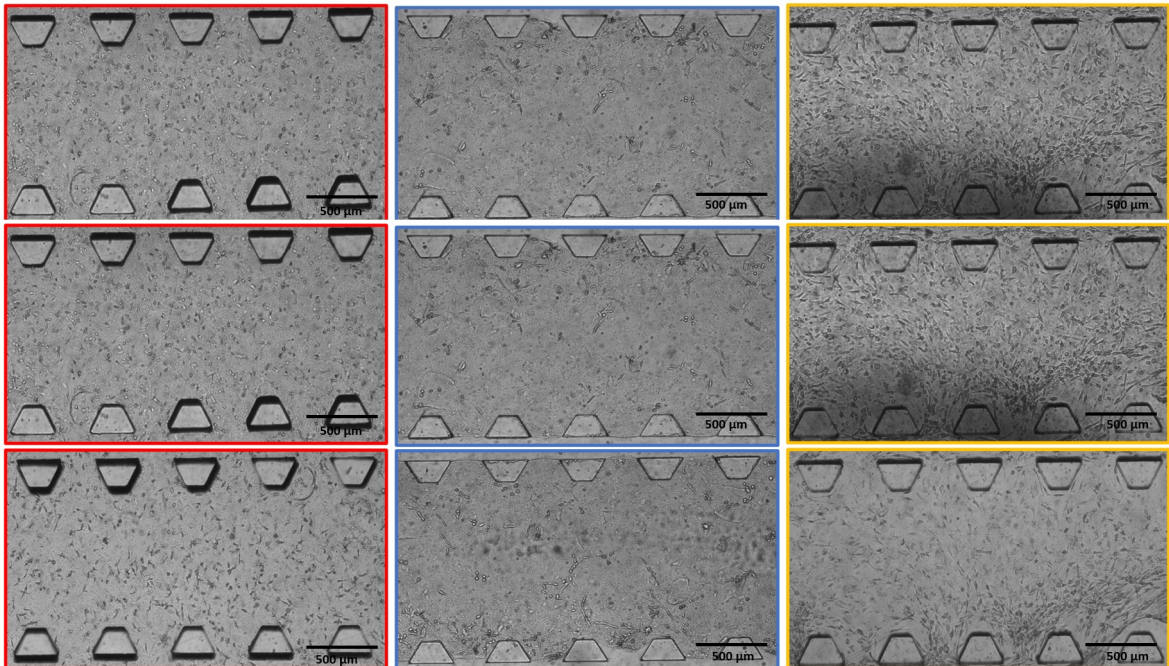


Figura 3.4: Imágenes tomadas a 4X de células OS (MG63) en matrices de 6 (rojo), 4 (azul) y 2,5 (amarillo) mg/mL de colágeno + Laponita. Días 1, 5 y 9 de cultivo, verticalmente. La escala indicada en negro corresponde a 500  $\mu\text{m}$ .

sin Laponita (cuya rigidez promedio es unos 150 Pa), se ha observado que el gel se inestabiliza y se despega de los postes de PDMS del dispositivo aproximadamente a partir del día tres de cultivo (figura 3.7-a).

Debido a este efecto, para los resultados expuestos en el apartado 3.1 solo se obtiene un único dato de viabilidad ( $n=1$ ) a tiempo final de cultivo para las muestras de menor concentración de colágeno. Este hecho se debe a la capacidad que tienen ambos tipos de células de ejercer fuerza y conseguir comprimir el gel. Sin embargo, se observa que, para los geles de alta concentración (4 y 6 mg/mL) y de baja concentración suplementado, se puede mantener un cultivo en 3D, sin alteración del hidrogel. Esto nos permite la experimentación en entornos fisiológicos en largos periodos, que se aproximan a tiempos mas realistas para replicar procesos biológicos.

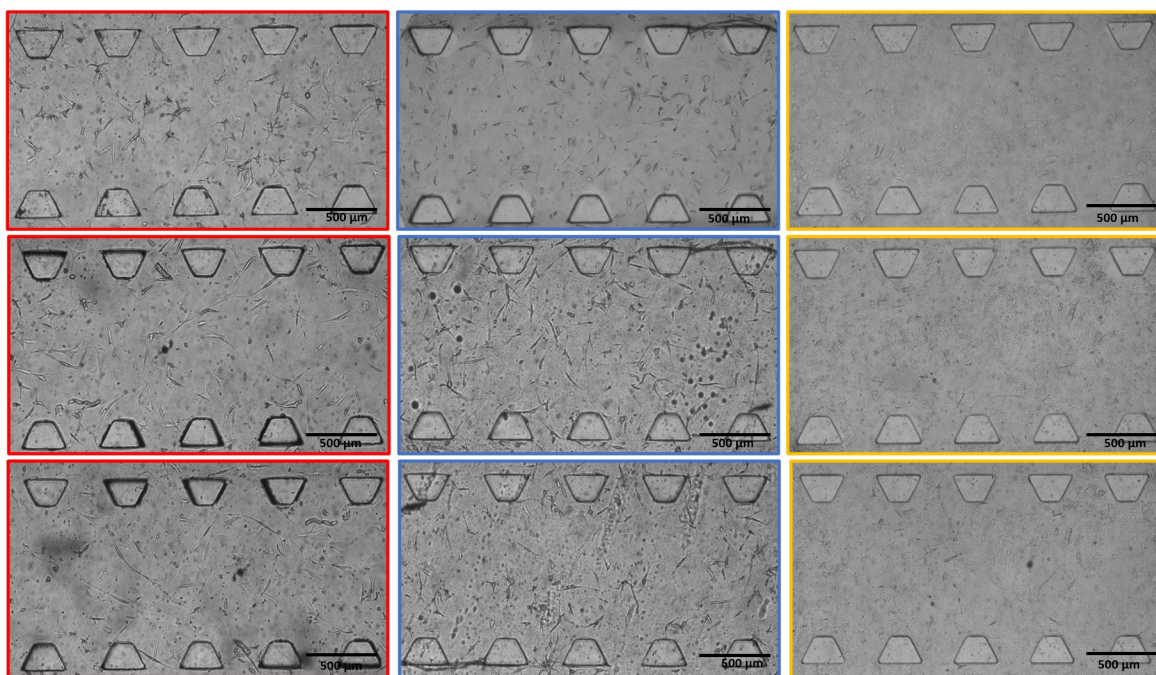


Figura 3.5: Imágenes tomadas a 4X de células madre (uADSC) en matrices de 6 (rojo), 4 (azul) y 2,5 (amarillo) mg/mL de colágeno. Días 1, 5 y 9 de cultivo, verticalmente. La escala en negro indicada corresponde a  $500\mu\text{m}$ .

Por otro lado, también se puede afirmar que las células uADSC exhiben una mayor capacidad para generar fuerzas mecánicas, ya que se ha observado inestabilidad del gel en los días finales incluso en geles con una alta concentración de colágeno (figura 3.7-b). Este hecho, concuerda con lo observado en la bibliografía [42].

Gracias al seguimiento de los cultivos realizado con el microscopio óptico se ha logrado verificar los resultados de viabilidad obtenidos en el apartado anterior. Así como poder llegar a la conclusión de que las células uADSC exhiben mayor capacidad para generar fuerzas mecánicas, probablemente debido a esas elongaciones características que poseen. Por último, el procedimiento desarrollado en este Trabajo de Fin de Grado para realizar los cultivos celulares ha demostrado ser seguro y adecuado.

Las observaciones destacadas en este apartado apoyan los resultados cuantitativos

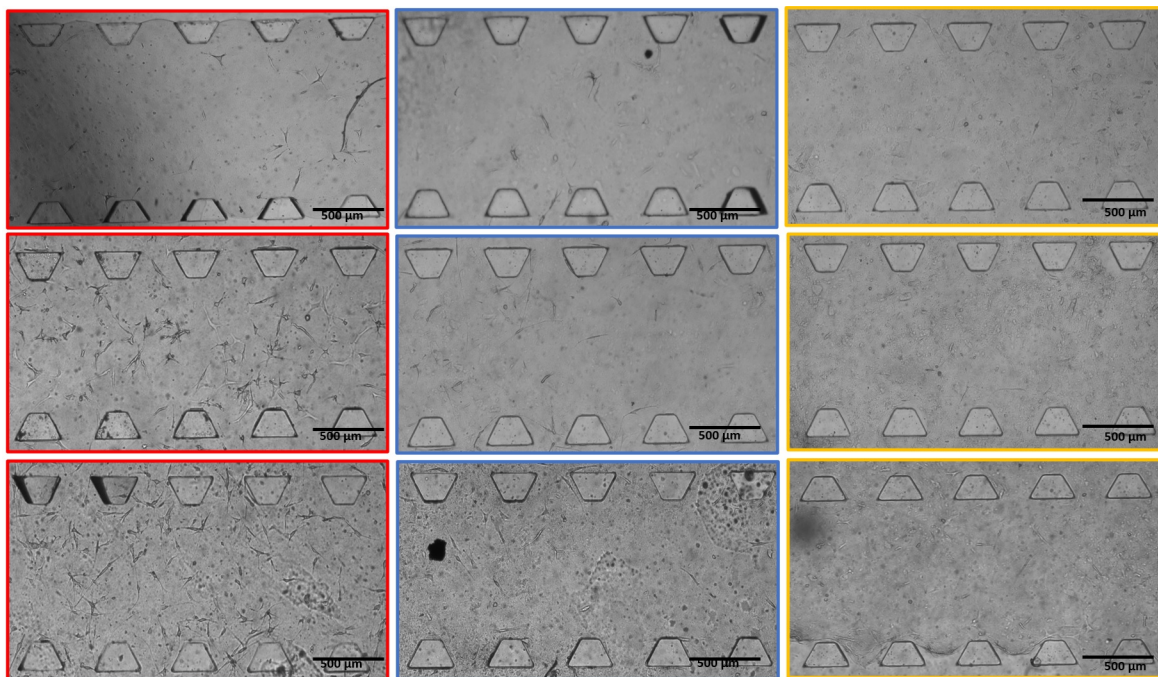


Figura 3.6: Imágenes de células uADSC en matrices de 6 (rojo), 4 (azul) y 2,5 (amarillo) mg/mL de colágeno + Laponita. Días 1, 5 y 9 de cultivo, verticalmente. La escala indicada en negro corresponde a  $500\mu\text{m}$ .

obtenidos previamente. No obstante, podría ser de gran interés llevar a cabo una cuantificación de la morfología celular. Se propone como línea futura utilizar un software para medir de forma semi-automática las protrusiones celulares tanto de OS como de uADSC y analizar posibles diferencias numéricas en la expresión de dendritas o en su longitud. Este ensayo podría ser de gran interés debido a la repercusión que tienen diferentes procesos biológicos sobre la morfología celular como la diferenciación o la capacidad migratoria [43, 29].

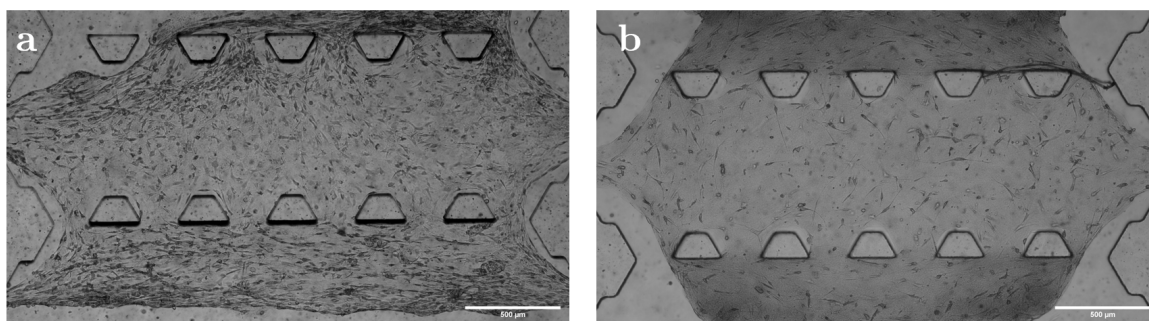


Figura 3.7: a) Efecto de las fuerzas causadas por las células de OS en un gel de baja concentración de colágeno (2,5 mg/mL) y b) Efecto de las fuerzas causadas por las células uADSC en un gel de alta concentración 6 mg/mL al cabo del tiempo. La escala indicada en negro corresponde a  $500\mu\text{m}$ .

### 3.3. Esferoides como modelos tumorales

#### 3.3.1. Cuantificación del área con el tiempo

En esta sección se exponen los resultados obtenidos sobre la morfología, proliferación y crecimiento de los esferoides generados mediante la técnica de gota colgante. Adicionalmente, se ha realizado un análisis preliminar para evaluar la funcionalidad de los esferoides como modelos de cáncer *in vitro*.

En la figura 3.9 se muestran las imágenes de un esferoide representativo, tomadas a lo largo del tiempo total de cultivo. Por un lado, con respecto al estudio morfológico, desde el primer día se observa en la punta de la gota una agrupación celular. No obstante, no es hasta el tercer día que se empieza a apreciar una sola estructura compacta. Esta estructura, con el tiempo se torna esférica y cada vez mas homogénea. El esferoide va aumentando de tamaño conforme avanzan los DDC gracias al crecimiento celular en tres dimensiones.

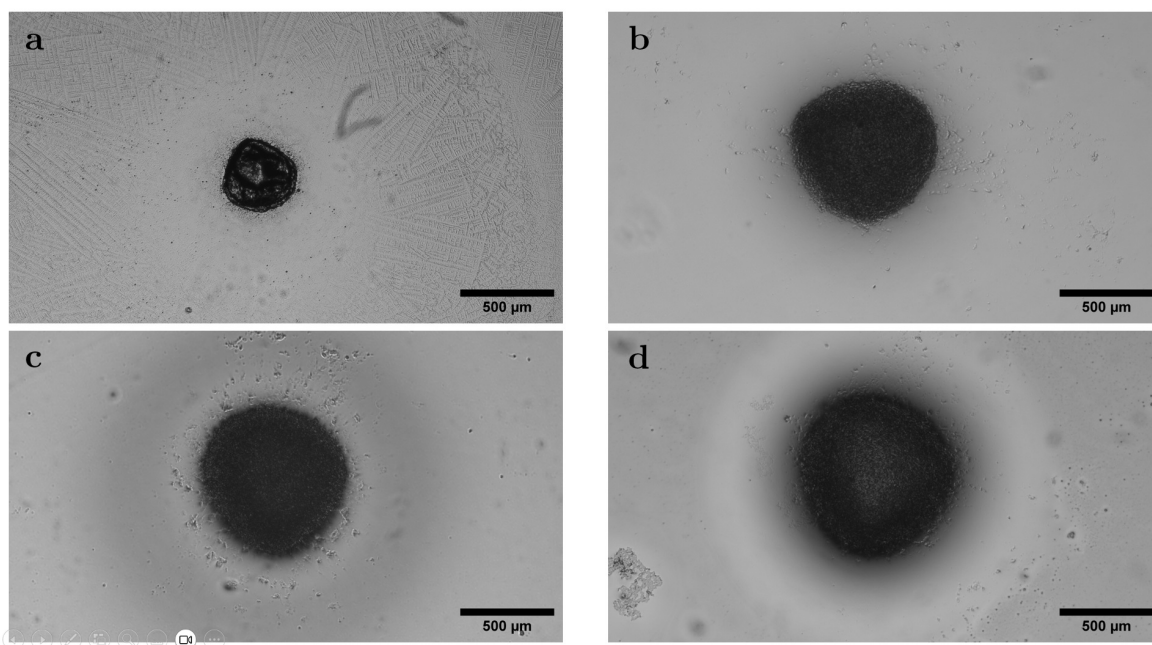


Figura 3.8: Imágenes de la evolución de un esferoide a lo largo del tiempo de cultivo. a) Día 3 b) Día 4 c) Día 5 d) Día 7.

Por otro lado, para evaluar cuantitativamente la capacidad de los esferoides para proliferar y crecer, se han tomado medidas del área de seis muestras mediante ( $n = 6$ ) el programa ImageJ, cuantificando así datos del radio de cada esferoide. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.9, donde se puede apreciar el significativo crecimiento de los esferoides con el tiempo. Además de su crecimiento en función del tiempo, se observa también que inicialmente hay una mayor variabilidad (mayor desviación estándar). Con el trascurso de los DDC, los esferoides alcanzan un

tamaño similar, dando lugar a menor dispersión en los datos.

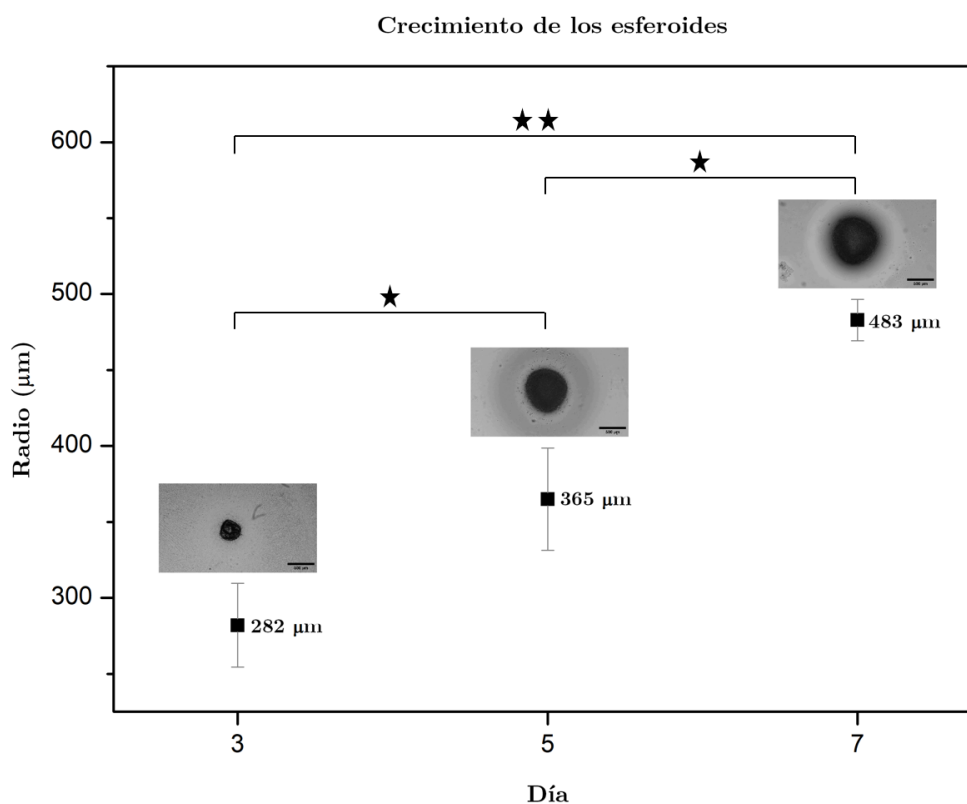


Figura 3.9: Evolución del tamaño de los esferoides en el tiempo. \* p valor < 0.05, \*\* p valor < 0.01.

Luca *et al.* [44] publicaron un estudio en el que utilizan varias técnicas para la creación de modelos 3D con células de OS. Con respecto a la formación de esferoides en gota colgante para esta misma línea celular, empleando el mismo tamaño de gota y con una densidad celular menor ( $1 \cdot 10^4$  células/mL) obtienen esferoides de OS de 400  $\mu\text{m}$  de diámetro. En este trabajo la densidad celular es de  $2 \cdot 10^5$  células/mL, lo cual da lugar a esferoides de mayor tamaño. Este hecho evidencia que el parámetro fundamental es el número inicial de células en cada gota, determinado por la densidad celular en la suspensión y el volumen de la misma que conforme cada gota. En consecuencia, se abre la posibilidad de personalizar el tamaño de los esferoides en estudio para la realización de experimentos diversos o para el análisis de diferentes tipos de tejidos que requieran condiciones específicas.

En la investigación realizada por Monteiro *et al.* [45] en lugar del método de gota colgante usan el modelo *scaffold-free model*, que consiste en depositar un número conocido de células de OS sobre un pocillo en el que se agrupan formando el esferoide. Realizan el estudio colocando entre 1 y  $3 \cdot 10^4$  células en cada pocillo (equivalente

al número de células por esferoide) y toman medidas del área los días 3, 7 y 14. El experimento para  $1 \cdot 10^4$  células por esferoide permite una comparación directa con los realizados en este Trabajo Fin de Grado, donde los esferoides se han generado a partir de aproximadamente  $8 \cdot 10^3$  células. En consecuencia, tras siete días de crecimiento, en este Trabajo Fin de Grado se han obtenido esferoides el doble de grandes que los reportados.

Por último, comparando con otras líneas celulares, Zhao *et al.*, en su trabajo con líneas celulares de cáncer de mama y colon [46], muestran como partiendo de 6.000 células por gota, obtienen esferoides de  $400 \mu\text{m}$  de diámetro ya el segundo día de cultivo. Evidenciando la mayor capacidad de agrupación celular que ambas líneas poseen con respecto a las células de OS, las cuales tardan más en proliferar y además forman esferoides de menor tamaño.

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado establecen una base sólida y un punto de partida para continuar investigando hacia la funcionalidad de los esferoides en este contexto. Y no solo como modelos de cáncer *in vitro* sino que, los modelos 3D de células de OS constituyen un avance en estudios de biomineralización y remodelación ósea [47].

### **3.3.2. Evaluación de la funcionalidad de los esferoides como modelo tumoral *in vitro***

Para poder utilizar los esferoides como modelo de cáncer, es esencial verificar si el comportamiento de estas muestras es capaz de replicar *in vitro* ciertos comportamientos de un tumor *in vivo*. Para ello, se van a proponer a continuación diferentes líneas de trabajo en este campo. Para evaluar la funcionalidad de los esferoides aquí creados (Figura 3.8) como modelo tumoral de OS, se propone realizar diferentes tinciones, cuyos pasos previos sí que se han completado a lo largo de este trabajo. La preparación de las muestras realizada (apartado 2.6), ha servido también para comprobar la viabilidad técnica en la manipulación de las muestras.

Como se detalla posteriormente, las tinciones que se proponen son: Tinción HE e inmunotinciones con anticuerpos específicos. Finalmente, también se propone evaluar el consumo de oxígeno para la detección de gradientes del mismo. Conociendo la actividad metabólica y estructural de los tumores de OS, se puede comparar los resultados obtenidos con la evidencia clínica y determinar si, efectivamente, estos modelos pueden ser representativos en el laboratorio.

A diferencia de otro tipo de muestras 3D donde los reactivos penetran en toda la muestra, el gran tamaño de estos esferoides puede comprometer la difusión de los tintes, no llegando a visualizar el centro de la muestra. Por ello, para muestras de este tipo,

se realizan cortes transversales micrométricos (apartado 2.6) y se realiza una tinción 2D de dichos cortes. Con lo cual, para realizar las tinciones propuestas a continuación, es necesario llevar a cabo una preparación de la muestra de la forma que se ha descrito previamente en este trabajo (Figuras 2.6 y 2.15).

### **Tinción HE**

La tinción de Hematoxilina y Eosina (HE) nos otorgará información sobre la morfología, estructura y composición celular en muestras histológicas. La hematoxilina tiñe los núcleos celulares de color azul o violeta, mientras que el eosina tiñe el citoplasma y otros componentes celulares de color rosa o rojo. Esta tinción facilita la identificación de diferentes tipos celulares, la evaluación del grado de diferenciación, la presencia de tejidos patológicos y proporciona una visión general de la organización tisular.

Esta tinción se va a realizar en cortes transversales del esferoide, lo que nos dará información adicional sobre el *core* del esferoide (Figura 1.3). Debido a la rápida proliferación de las células cancerosas y a los gradientes de gases, ocurre que las células del centro del esferoide se mueren, dando lugar a un interior necrótico.

### **Inmunotinción**

Tras la evaluación total de la morfología y arquitectura interior, se continuará el estudio con una tinción inmunohistoquímica (IHC). Este proceso también requiere de la preparación realizada en este Trabajo (Figura 2.15). Este ensayo permitirá visualizar la expresión de proteínas específicas que son características de las células de OS. Esta visualización de la actividad proteica en función del estado de maduración del esferoide nos dará mucha información de su representación de la realidad. En la figura 3.10 se esquematiza el funcionamiento de la inmunotinción con anticuerpos.

Tras la correspondiente búsqueda bibliográfica, se propone realizar la inmunotinción a la proteína Interleucina-6 (IL-6). La IL-6 es una citoquina que se libera en el TME y que puede tener efectos tanto pro-tumorales como antitumorales en el OS. Por parte de las células tumorales, la secreción de IL-6 induce la migración de las MSC al tejido tumoral, estimulando el crecimiento de las células de OS [12, 11, 48]. De la misma manera, se propone la inmunotinción con el anticuerpo anti-CD133. CD133, también llamado prominina-1, es una glicoproteína transmembrana que se ha identificado como un posible marcador específico de células madre en varios tejidos, incluidos los tumores cancerosos [49]. En general, la expresión de CD133 en células madre de tejido tumoral se ha asociado con características que contribuyen a la progresión del tumor y a la resistencia a la terapia.

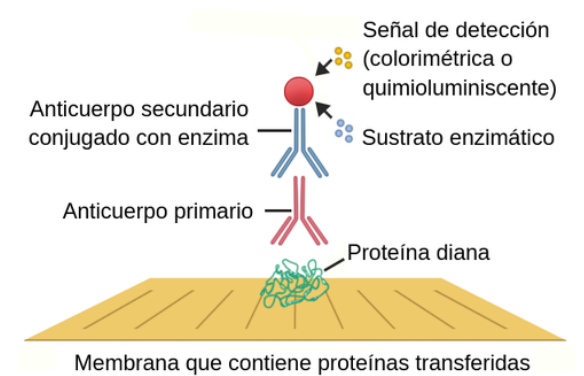


Figura 3.10: Representación esquemática del funcionamiento de una inmunotinción con anticuerpos. Los anticuerpos específicos (anticuerpo primario, rojo) se unen a antígenos de interés en la muestra biológica (proteína diana, verde). Luego, se agregan anticuerpos secundarios (azul) marcados con un fluorocromo o una enzima, que se unen a los anticuerpos primarios. Esto permite la detección visual o la generación de señales amplificadas para identificar y cuantificar la presencia de los antígenos específicos de manera precisa y específica con un microscopio como el AXIO (Zeiss) utilizado en este trabajo.

## Consumo de oxígeno

Finalmente, con estas dos tinciones realizadas y evaluadas, se procederá a la realización de un ensayo de consumo de oxígeno. Los tumores sólidos, donde se incluye el OS, a menudo presentan regiones con baja disponibilidad de oxígeno debido a un inadecuado suministro sanguíneo [50]. Entender cómo los esferoides tumorales consumen oxígeno puede ayudar a comprender mejor la fisiología de estos tumores y las respuestas adaptativas que desarrollan. Por otro lado, la hipoxia es un factor importante que puede afectar la respuesta de los tumores a la terapia, por lo que la evaluación del consumo de oxígeno puede proporcionar información relevante para desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y específicas.

La cuantificación del consumo de oxígeno en el esferoide se podría realizar mediante técnicas específicas de medición y cambios en el gradiente de oxígeno en el interior del esferoide. Algunos métodos comunes para realizar esta evaluación son: 1) utilización de microelectrodos de oxígeno. 2) Microscopía de fluorescencia con sondas de oxígeno, donde se podría visualizar y evaluar los niveles de consumo de oxígeno en el esferoide en tiempo real. 3) Cultivos en condiciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia): mediante el cultivo del esferoide en condiciones de hipoxia, se puede evaluar cómo responde y se adapta el esferoide a las condiciones de falta de oxígeno [51, 52].

### 3.4. Cocultivo de células madre y osteosarcoma

En la figura 3.11 se muestran las imágenes de dos muestras representativas del cocultivo. Con ellas se empezó a intuir en este Trabajo que cuando las células MG63 se cultivaban junto con las uADSC, no se organizaban de manera habitual que se ha visto previamente (Figuras 3.3 - 3.6). A diferencia de lo visto anteriormente, se observó que en el cocultivo se formaban ciertas estructuras, quedando las MG63 alrededor de las uADSC.

Partiendo de esta observación, se decidió realizar las tinciones de núcleo y citoesqueleto (apartado 2.5.2). Esta tinción, no permite distinguir entre ambas líneas celulares ya los núcleos y fibras de actina de ambos fenotipos se tiñen de la misma manera. Sin embargo, al haber realizado tinciones de las células cultivadas individualmente en la misma matriz, se han podido extraer conclusiones acerca de la morfología celular que podrían llevar a una idea intuitiva de cara a distinguirlas.

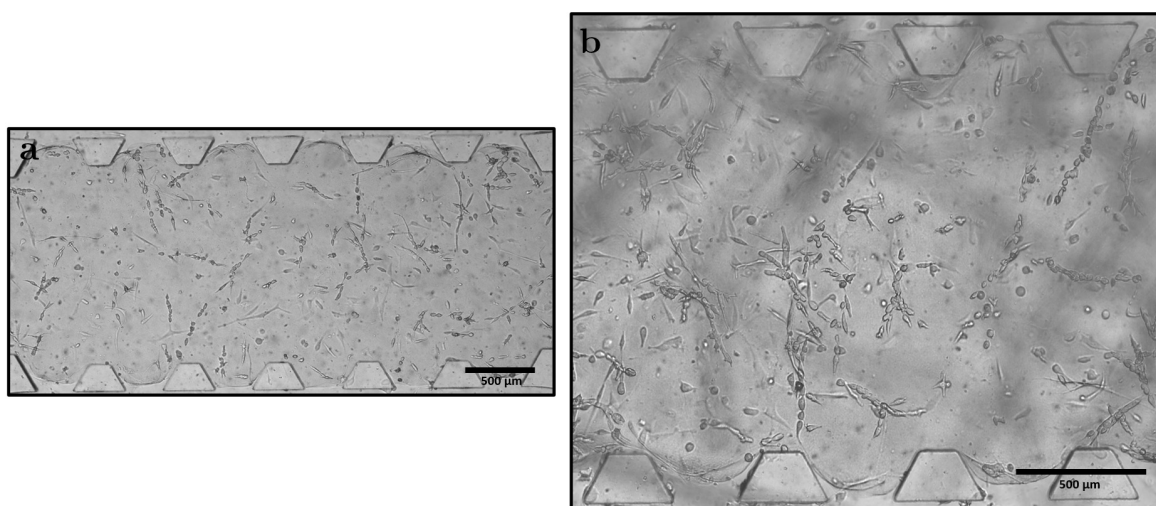


Figura 3.11: Imágenes de dos muestras distintas (a y b) mostrando la evolución del cocultivo donde se puede intuir la característica distribución celular existente. Se han sembrado células de OS junto con células madre en un gel de colágeno de 6 mg/mL.

En las figuras 3.12-3.13 se muestran las tinciones DAPI-faloidina realizadas a las células cultivadas individualmente. Se puede apreciar la diferencia de tamaño existente entre ambas líneas celulares. Por un lado, las células MG63 son más pequeñas (50-70  $\mu\text{m}$ ) y no poseen las protusiones características de las células uADSC, las cuales son notablemente más grandes (100-150  $\mu\text{m}$ ). Por otro lado, se observa también que el citoesqueleto (2.13) de las células MG63 rodea al núcleo en una estructura más esférica que en caso de las uADSC.

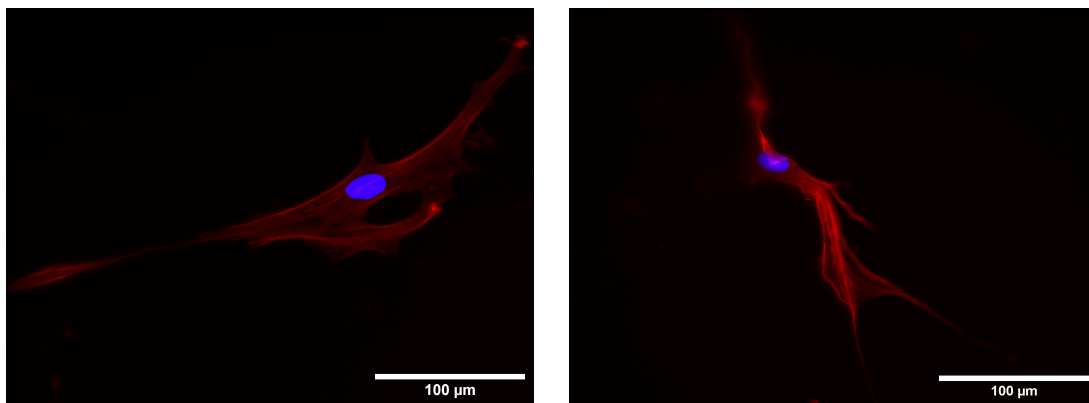


Figura 3.12: Dos ejemplos de células individuales uADSC teñidas con DAPI y Faloidina vistas al microscopio (25X).

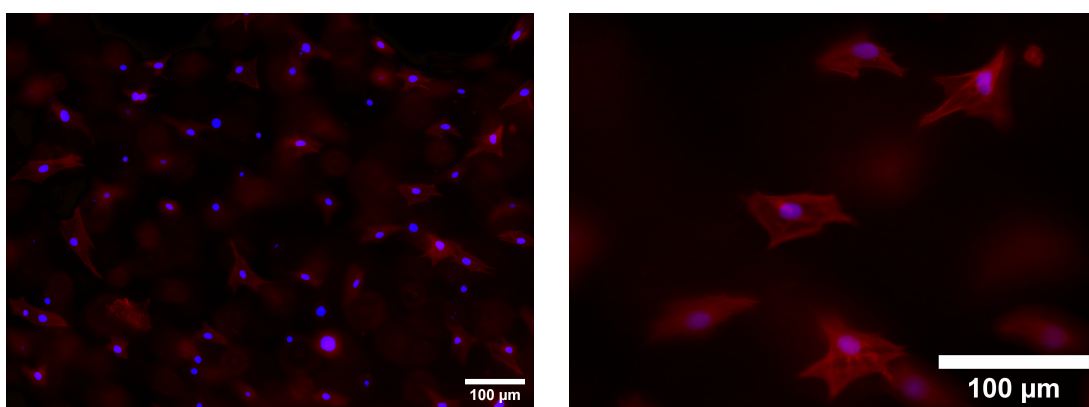


Figura 3.13: Dos ejemplos de células MG63 teñidas con DAPI y Faloidina vistas al microscopio (4X izquierda y 25X derecha).

En las figuras 3.14-3.15 se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas para el cocultivo MG63-uADSC (ratio 1:1). Coincidiendo con la hipótesis inicial, se puede apreciar como las células de OS (MG63), que son más pequeñas y esféricas, se sitúan alrededor de las uADSC (más grandes y extendidas). Este efecto se aprecia especialmente en la figura 3.15. La explicación propuesta es que la comunicación se lleva a cabo a través del contacto entre las células, causante del ciclo pro-tumoral y antitumoral establecido entre ambas células, el cual ha sido descrito a lo largo de este Trabajo de Fin de Grado.

Con respecto los resultados obtenidos acerca de la influencia del medio de cultivo, no se han observado diferencias entre el crecimiento y la organización celular entre las muestras con medio de alta y baja glucosa.

Los cocultivos preliminares realizados en este Trabajo de Fin de Grado nos sirven como punto de partida para la futura realización de futuros ensayos mas biológicos. La continuación más inmediata a este estudio es una tinción específica para cada línea celular, donde no se tiñan las dos líneas con los mismos reactivos, sino que cada tipo de

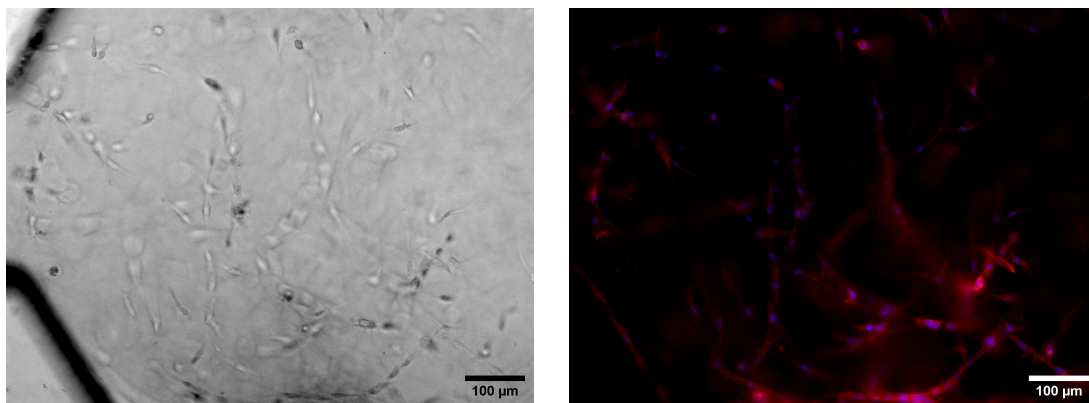


Figura 3.14: Imágen representativa del cocultivo MG63-uADSC: imagen de campo claro (izquierda), B) imagen con fluorescencia (derecha).

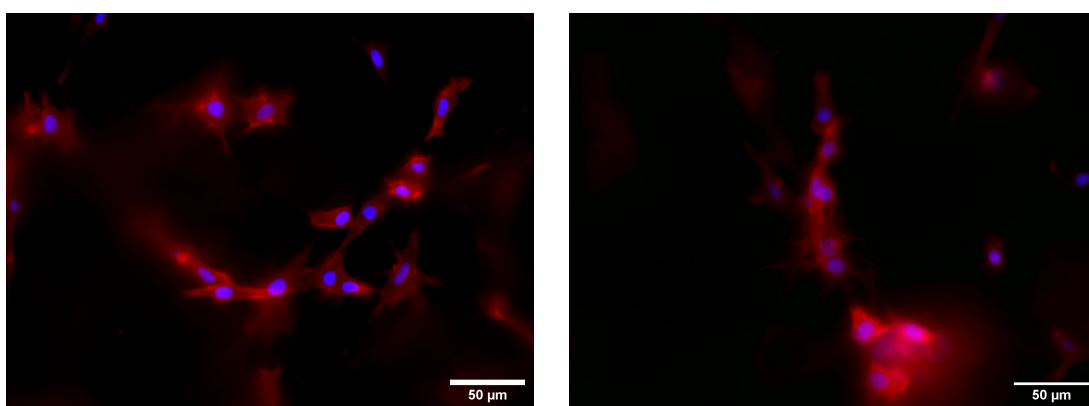


Figura 3.15: Ampliaciones de las muestras de cocultivo teñidas con DAPI y faloidina, donde se intuye la estructuración de las células de OS (MG63) alrededor de las uADSC.

célula quede perfectamente identificada. De esta manera, se pueden realizar otro tipo de análisis específicos que detecten la comunicación entre ambas líneas celulares, así como corroborar la no influencia del medio de cultivo observada.

Por ejemplo, se propone un ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, por sus siglas en inglés) con el que cuantificar estas proteínas y comparar la expresión de ellas en los cultivos de las células por independiente junto con el cocultivo. Por otro lado, también se propone teñir las proteínas específicas de interés para visualizarlas mediante microscopía de fluorescencia. Y, de esta manera, al igual que se han obtenido los resultados de la tinción de núcleo y citoesqueleto, se obtendría de manera visual la comparación de la expresión de la proteína en los cultivos de las células por independiente y en el cocultivo.

# Capítulo 4

## Conclusiones y líneas futuras

El cáncer de hueso, en especial el OS, es una enfermedad muy agresiva, con gran probabilidad de desarrollar complicaciones y producir metástasis en otros lugares del cuerpo humano. La detección temprana y un tratamiento adecuado y personalizado son cruciales para mejorar las perspectivas de los pacientes. Es aquí donde emerge la necesidad de un análisis profundo sobre el comportamiento y metabolismo del OS.

En este Trabajo de Fin De Grado, que aborda la evolución de parámetros biológicos, como la viabilidad y el cultivo celular de OS en matrices de diferentes propiedades mecánicas, con la introducción de nanomateriales, se muestra la importancia de la inclusión de diferentes disciplinas como son la ingeniería y la biomedicina.

Por un lado, el estudio de las matrices de diferentes propiedades mecánicas es esencial para diseñar y desarrollar andamios de ingeniería de tejidos que sean capaces de proporcionar el soporte estructural necesario para el crecimiento y la diferenciación celular. Estos andamios deben ser capaces de replicar tanto las propiedades mecánicas como las características biológicas de los tejidos nativos, lo que implica la necesidad de combinar el conocimiento de la ingeniería química con los principios de la química, mecánica, la biología y la biotecnología.

La incorporación de la microfluídica ha representado un salto cualitativo en nuestra investigación, brindándonos una mayor resolución en los análisis y una mejor comprensión de los procesos biológicos aquí estudiados. Con ella se ha logrado una optimización significativa de los recursos y una reducción en la cantidad de muestras y reactivos necesarios. Sin duda, esta tecnología seguirá siendo un pilar importante en futuros desarrollos y avances en el campo de la ingeniería biomédica y la investigación de nanomateriales.

Por otro lado, el estudio de las células de OS en interacción con las células madre y la creación de esferoides representa un enfoque novedoso y prometedor en la investigación del cáncer óseo. Los esferoides permiten un mejor entendimiento de la biología tumoral y ofrecen una alternativa para probar terapias personalizadas y combinadas. Si bien aún

hay muchos desafíos por superar, esta área de investigación ofrece un gran potencial para avanzar en el campo del diagnóstico y tratamiento del OS, mejorando así las perspectivas de los pacientes afectados por esta enfermedad devastadora.

Cabe mencionar que aunque la investigación en este contexto es un proceso continuo y complejo, este trabajo ha aportado perspectivas y avances que enriquecen el panorama general. Cada descubrimiento y contribución realizada aquí representa un valioso aporte al campo y sienta las bases para futuros desarrollos en esta área de estudio.

Finalmente, se exponen a continuación las conclusiones obtenidas de este Trabajo de Fin de Grado:

- **Las células de OS poseen mayor capacidad proliferativa en matrices más rígidas:** Revela que las propiedades mecánicas del TME afectan directamente a la capacidad de estas células para proliferar, por lo que el microambiente mecánico ha de ser un factor a tener en cuenta en el estudio de la progresión y expansión del cáncer de hueso. Esta conclusión aporta información útil para el diseño de andamios y matrices que puedan tener implicaciones en el desarrollo de terapias dirigidas y personalizadas.
- **La incorporación de Laponita en los geles de colágeno estimula la proliferación de las uADSC hasta alcanzar un umbral específico de rigidez:** Esta observación señala la importancia del uso de los nanomateriales en ingeniería de tejidos y su capacidad para modular la rigidez del sustrato, así como su implicación en la regeneración e ingeniería de tejidos, donde la capacidad de estimular la proliferación celular podría acelerar la curación de heridas y la reparación de tejidos dañados. Por otro lado, el hecho de que la proliferación de las uADSC alcance un umbral específico de rigidez, sugiere que existe una relación directa entre la rigidez del entorno y la respuesta celular.
- **La mayor concentración de colágeno en los hidrogeles garantiza un sistema de cultivo más fiable debido a su mayor estabilidad:** El colágeno, una proteína de vital importancia en el tejido conectivo, ejerce una función esencial como componente clave en los andamios de ingeniería de tejidos. La presencia de una concentración elevada de colágeno garantiza una mayor estabilidad, favoreciendo así un entorno de cultivo más propicio para el crecimiento y la diferenciación celular. Este hecho resalta la relevancia del colágeno como elemento esencial para optimizar los procesos biológicos en la ingeniería de tejidos. Por otro lado, al asegurar un ambiente de cultivo óptimo, se sientan las bases para estudios posteriores y para desarrollar terapias regenerativas más efectivas y seguras.

- **El método de gota colgante para la creación de esferoides es eficaz para las células de OS:** El cultivo de células de OS en esferoides ofrece información sobre la interacción celular, la resistencia a tratamientos y otros aspectos relevantes del cáncer de hueso. Bajo esta perspectiva, se podría ayudar a mejorar los modelos de investigación y facilitar la evaluación de terapias potenciales en un contexto más cercano al entorno tumoral in vivo.
- **Las células madre y las células de OS cocultivadas se agrupan formando estructuras, estando en contacto unas con otras:** Este hallazgo sugiere que ambas células pueden interactuar y comunicarse entre sí en el microambiente tridimensional, lo que podría influir directamente en su comportamiento y función. El estudio de la comunicación celular en un cocultivo es esencial para comprender la complejidad de las interacciones celulares en el cáncer de hueso. Estos resultados pueden abrir nuevas vías de investigación para estudiar las señales paracrinas y endocrinas que podrían estar involucradas en la progresión del cáncer y ofrecer nuevas oportunidades para desarrollar terapias dirigidas.
- **La realización de cocultivos puede ayudar a comprender el sistema de comunicación celular células madre - OS:** El conocimiento de las interacciones entre ambas líneas celulares es esencial para comprender la progresión del cáncer y diseñar estrategias terapéuticas más efectivas, descubriendo así revelar nuevas dianas terapéuticas o señales clave que podrían ser manipuladas para controlar el crecimiento tumoral.

Con los resultados obtenidos y las conclusiones recogidas, se pueden enumerar diferentes líneas futuras de investigación:

- Para el seguimiento de la evolución de los cultivos celulares:

**Cuantificación de la morfología celular:** Para una mejora en la caracterización de los cultivos, se propone la obtención de información cuantitativa acerca de la morfología celular de ambas líneas celulares. Esto ayudará a la comprensión del comportamiento celular, explicando así algunas de las observaciones correspondientes al estudio del cocultivo.

- Para la evaluación de la funcionalidad de los esferoides:

**Tinción HE:** Esta tinción proporcionará una visión estructural de los esferoides de OS, caracterizando así su morfología y arquitectura interior. Lo que dará respuesta a posibles preguntas acerca del comportamiento del tumor de OS en entornos fisiológicos.

**Tinción IHC:** Por otro lado, las tinciones de la proteína IL-6 y de la CD133 en los esferoides, aportaran información sobre el TME. Sacando así conclusiones acerca de la influencia de las células madre en la progresión y crecimiento del tumor de OS y comprendiendo la respuesta del organismo al tumor.

**Consumo de oxígeno:** La cuantificación del consumo de oxígeno por parte de los esferoides permite comprender su fisiología, metabolismo y respuesta a diferentes condiciones y tratamientos, ayudando así al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

- Para el estudio del cocultivo de células madre y células de OS:

**Tinción de cada línea celular específicamente:** En primer lugar una tinción específica para cada tipo de célula. Se ha de encontrar un fluoróforo capaz de marcar las células uADSC y otro que emita a una longitud de onda distinta, capaz de marcar las células MG63. De esta manera, se podrá realizar un estudio visual y preciso de la distribución celular en el cocultivo. Así, se podrá confirmar la estructuración específica de ambas células que aquí se intuye.

**Ensayo ELISA:** Permitirá estudiar a nivel molecular las interacciones entre ambas células y su respuesta. El principal objetivo aquí es el estudio de la influencia de las células madre en el crecimiento del OS. Por lo que la sobre expresión de las proteínas características en células de OS en presencia de las células madre será aquí estudiada.

# Capítulo 5

## Bibliografía

- [1] Anna M Czarnecka, Kamil Synoradzki, Wiktoria Firlej, Ewa Bartnik, Pawel Sobczuk, Michal Fiedorowicz, Pawel Grieb, and Piotr Rutkowski. Molecular biology of osteosarcoma. Cancers, 12(8):2130, 2020.
- [2] Lisa Mirabello, Rebecca J Troisi, and Sharon A Savage. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the surveillance, epidemiology, and end results program. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 115(7):1531–1543, 2009.
- [3] Chaofei Yang, Ye Tian, Fan Zhao, Zhihao Chen, Peihong Su, Yu Li, and Airong Qian. Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis. International journal of molecular sciences, 21(19):6985, 2020.
- [4] Amirhossein Misaghi, Amanda Goldin, Moayd Awad, and Anna A Kulidjian. Osteosarcoma: a comprehensive review. Sicot-j, 4, 2018.
- [5] Isabel Fernández Tresguerres, Alobera Gracia, M Del Canto Pingarrón, and Luis Blanco Jérez. Physiological bases of bone regeneration ii: The remodeling process. 2006.
- [6] Gerry L Koons, Mani Diba, and Antonios G Mikos. Materials design for bone-tissue engineering. Nature Reviews Materials, 5(8):584–603, 2020.
- [7] Marie-Charlotte Trojani, Sabine Santucci-Darmanin, Véronique Breuil, Georges F Carle, and Valérie Pierrefite-Carle. Autophagy and bone diseases. Joint bone spine, 89(3):105301, 2022.
- [8] Audrey Lamora, Julie Talbot, Mathilde Mullard, Benedicte Brounais-Le Royer, Françoise Redini, and Franck Verrecchia. Tgf- $\beta$  signaling in bone remodeling and osteosarcoma progression. Journal of clinical medicine, 5(11):96, 2016.

- [9] Ying Zheng, Gangyang Wang, Ruiling Chen, Yingqi Hua, and Zhengdong Cai. Mesenchymal stem cells in the osteosarcoma microenvironment: their biological properties, influence on tumor growth, and therapeutic implications. Stem Cell Research & Therapy, 9(1):22, 2018.
- [10] Ingrid Lilienthal and Nikolas Herold. Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma: a review of current and future strategies. International journal of molecular sciences, 21(18):6885, 2020.
- [11] Zhen-Yu Bian, Qi-Ming Fan, Gang Li, Wen-Ting Xu, and Ting-Ting Tang. Human mesenchymal stem cells promote growth of osteosarcoma: Involvement of interleukin-6 in the interaction between human mesenchymal stem cells and saos-2. Cancer science, 101(12):2554–2560, 2010.
- [12] Zhao Sun, Shihua Wang, and Robert Chunhua Zhao. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. Journal of hematology & oncology, 7(1):1–10, 2014.
- [13] Filipa Macedo, Katia Ladeira, Filipa Pinho, Nadine Saraiva, Nuno Bonito, Luisa Pinto, and Francisco Gonçalves. Bone metastases: an overview. Oncology reviews, 11(1), 2017.
- [14] Office of the Surgeon General (US et al. Bone health and osteoporosis: a report of the surgeon general. 2004.
- [15] David A Lee, Martin M Knight, Jonathan J Campbell, and Dan L Bader. Stem cell mechanobiology. Journal of cellular biochemistry, 112(1):1–9, 2011.
- [16] Pilar Alamán-Díez, Elena García-Gareta, Manuel Arruebo, and María Ángeles Pérez. A bone-on-a-chip collagen hydrogel-based model using pre-differentiated adipose-derived stem cells for personalized bone tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 111(1):88–105, 2023.
- [17] Markus Rimann, Sandra Laternser, Ana Gvozdenovic, Roman Muff, Bruno Fuchs, Jens M Kelm, and Ursula Graf-Hausner. An in vitro osteosarcoma 3d microtissue model for drug development. Journal of biotechnology, 189:129–135, 2014.
- [18] Bárbara Pinto, Ana C Henriques, Patrícia MA Silva, and Hassan Bousbaa. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. Pharmaceutics, 12(12):1186, 2020.

- [19] X Cui, Y Hartanto, and H Zhang. Advances in multicellular spheroids formation. Journal of the Royal Society Interface, 14(127):20160877, 2017.
- [20] Sreenivasulu Gunti, Austin TK Hoke, Kenny P Vu, and Nyall R London Jr. Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. Cancers, 13(4):874, 2021.
- [21] Umesh D Wankhade, Michael Shen, Ravindra Kolhe, and Sadanand Fulzele. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. Stem cells international, 2016, 2016.
- [22] Xian Zhao, Liu Liu, Fu-Ke Wang, De-Pin Zhao, Xiao-Ming Dai, and Xue-Song Han. Coculture of vascular endothelial cells and adipose-derived stem cells as a source for bone engineering. Annals of plastic surgery, 69(1):91–98, 2012.
- [23] Yan Wang, Yijing Chu, Bin Yue, Xuexiao Ma, Guoqing Zhang, Hongfei Xiang, Yong Liu, Tianrui Wang, Xiaolin Wu, and Bohua Chen. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the stat3 pathway. Oncotarget, 8(14):23803, 2017.
- [24] Akhilesh K Gaharwar, Lauren M Cross, Charles W Peak, Karli Gold, James K Carrow, Anna Brokesh, and Kanwar Abhay Singh. 2d nanoclay for biomedical applications: regenerative medicine, therapeutic delivery, and additive manufacturing. Advanced Materials, 31(23):1900332, 2019.
- [25] M. Rosa Castillo, José M. Fraile, and José A. Mayoral. Structure and dynamics of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate phases on silica and laponite clay: From liquid to solid behavior. Langmuir, 28(31):11364–11375, 2012.
- [26] Pilar Alamán-Díez, Carlos Borau, Pedro Enrique Guerrero, Hippolyte Amaveda, Mario Mora, José María Fraile, Elena García-Gareta, José Manuel García-Aznar, and María Ángeles Pérez. Collagen-laponite nanoclay hydrogels for tumor spheroid growth. Biomacromolecules, 2023.
- [27] C Del Amo, C Borau, N Movilla, Jesús Asín, and JM García-Aznar. Quantifying 3d chemotaxis in microfluidic-based chips with step gradients of collagen hydrogel concentrations. Integrative Biology, 9(4):339–349, 2017.
- [28] Melanie Rodrigues, Linda G Griffith, and Alan Wells. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. Stem cell research & therapy, 1(4):1–12, 2010.

- [29] Gabriele Nasello, Pilar Alamán-Díez, Jessica Schiavi, María Ángeles Pérez, Laoise McNamara, and José Manuel García-Aznar. Primary human osteoblasts cultured in a 3d microenvironment create a unique representative model of their differentiation into osteocytes. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 8:336, 2020.
- [30] Peng Zhang, Ling Dong, Kang Yan, HUA Long, Tong-Tao Yang, Ming-Qing Dong, Yong Zhou, Qing-Yu Fan, and Bao-An Ma. Cxcr4-mediated osteosarcoma growth and pulmonary metastasis is promoted by mesenchymal stem cells through vegf. Oncology reports, 30(4):1753–1761, 2013.
- [31] Sephra N Rampersad. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors, 12(9):12347–12360, 2012.
- [32] Marahaini Musa, Thirumulu Ponnuraj Kannan, and Shyamoli Mustafa. Cell proliferation study of human osteosarcoma cell line (u2os) using alamar blue assay and live cell imaging. IOSR J. Dent. Med. Sci, 8(2):60–65, 2013.
- [33] José Meseguer, María de los Ángeles Esteban Abad, Victoriano Francisco Mulero Méndez, Alberto Cuesta Peñafiel, and María Pilar Sepulcre Cortés. Esferoides y esferas líquidas. cultivos celulares en 3d para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. Eubacteria, nº34, 2015, 2015.
- [34] Gabriella Rainaldi, Antonella Ferrante, Pietro Luigi Indovina, and Maria Teresa Santini. Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependent in mg-63 osteosarcoma multicellular spheroids. Anticancer research, 23(3B):2505–2518, 2003.
- [35] Paola Indovina, Maddalena Collini, Giuseppe Chirico, and Maria Teresa Santini. Three-dimensional cell organization leads to almost immediate hre activity as demonstrated by molecular imaging of mg-63 spheroids using two-photon excitation microscopy. FEBS letters, 581(4):719–726, 2007.
- [36] Paola Indovina, Antonella Ferrante, Gabriella Rainaldi, and Maria Teresa Santini. Hypoxia and ionizing radiation: changes in adhesive properties and cell adhesion molecule expression in mg-63 three-dimensional tumor spheroids. Cell Communication & Adhesion, 13(3):185–198, 2006.
- [37] Takahisa Anada, Taisuke Masuda, Yoshitomo Honda, Junji Fukuda, Fumihito Arai, Toshio Fukuda, and Osamu Suzuki. Three-dimensional cell culture device

- utilizing thin membrane deformation by decompression. Sensors and Actuators B: Chemical, 147(1):376–379, 2010.
- [38] Tongmeng Jiang, Guojie Xu, Xiaoming Chen, Xianyuan Huang, Jinmin Zhao, and Li Zheng. Impact of hydrogel elasticity and adherence on osteosarcoma cells and osteoblasts. Advanced Healthcare Materials, 8(9):1801587, 2019.
- [39] Shahin Bonakdar, Morteza Mahmoudi, Leila Montazeri, Mojtaba Taghipoor, Arnaud Bertsch, Mohammad Ali Shokrgozar, Shahriar Sharifi, Mohammad Majidi, Omid Mashinchian, Mohammad Hamrang Sekachaei, et al. Cell-imprinted substrates modulate differentiation, redifferentiation, and transdifferentiation. ACS applied materials & interfaces, 8(22):13777–13784, 2016.
- [40] Matthew R Zanutelli, Jian Zhang, Ismael Ortiz, Wenjun Wang, Neil C Chada, and Cynthia A Reinhart-King. Highly motile cells are metabolically responsive to collagen density. Proceedings of the National Academy of Sciences, 119(18):e2114672119, 2022.
- [41] Qing Wang, Guang Xing Chen, Lin Guo, and Liu Yang. The osteogenic study of tissue engineering bone with BMP2 and BMP7 gene-modified rat adipose-derived stem cell. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 2012.
- [42] Pere Roca-Cusachs, Vito Conte, and Xavier Trepap. Quantifying forces in cell biology. Nature cell biology, 19(7):742–751, 2017.
- [43] Nieves Movilla, Clara Valero, Carlos Borau, and Jose Manuel García-Aznar. Matrix degradation regulates osteoblast protrusion dynamics and individual migration. Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro, 11(11):404–413, 2019.
- [44] Angela De Luca, Lavinia Raimondi, Francesca Salamanna, Valeria Carina, Viviana Costa, Daniele Bellavia, Riccardo Alessandro, Milena Fini, and Gianluca Giavaresi. Relevance of 3d culture systems to study osteosarcoma environment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 37:1–15, 2018.
- [45] Maria V Monteiro, Vítor M Gaspar, Luís P Ferreira, and João F Mano. Hydrogel 3d in vitro tumor models for screening cell aggregation mediated drug response. Biomaterials science, 8(7):1855–1864, 2020.
- [46] Liang Zhao, Jidong Xiu, Yang Liu, Tianye Zhang, Wenjie Pan, Xiaonan Zheng, and Xueji Zhang. A 3d printed hanging drop dripper for tumor spheroids analysis without recovery. Scientific reports, 9(1):19717, 2019.

- [47] Javier Munoz-Garcia, Camille Jubelin, Aurélie Loussouarn, Matisse Goumard, Laurent Griscom, Axelle Renodon-Cornière, Marie-Françoise Heymann, and Dominique Heymann. In vitro three-dimensional cell cultures for bone sarcomas. Journal of Bone Oncology, 30:100379, 2021.
- [48] Margherita Cortini, Annamaria Massa, Sofia Avnet, Gloria Bonuccelli, and Nicola Baldini. Tumor-activated mesenchymal stromal cells promote osteosarcoma stemness and migratory potential via il-6 secretion. PloS one, 11(11):e0166500, 2016.
- [49] Sukru Ozturk, Cansu Gorgun, Sevtap Gokalp, Seda Vatansever, and Aylin Sendemir. Development and characterization of cancer stem cell-based tumoroids as an osteosarcoma model. Biotechnology and bioengineering, 117(8):2527–2539, 2020.
- [50] Stephen Riffle and Rashmi S Hegde. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 36:1–10, 2017.
- [51] Rei Mukomoto, Yuji Nashimoto, Takato Terai, Takuto Imaizumi, Kaoru Hiramoto, Kosuke Ino, Ryuji Yokokawa, Takashi Miura, and Hitoshi Shiku. Oxygen consumption rate of tumour spheroids during necrotic-like core formation. Analyst, 145(19):6342–6348, 2020.
- [52] Johannes Dornhof, Viktoria Zieger, Jochen Kieninger, Daniel Frejek, Roland Zengerle, Gerald A Urban, Sabrina Kartmann, and Andreas Weltin. Bioprinting-based automated deposition of single cancer cell spheroids into oxygen sensor microelectrode wells. Lab on a Chip, 22(22):4369–4381, 2022.
- [53] V Ivanov, S Ivanova, MW Roomi, T Kalinovsky, A Niedzwiecki, and M Rath. Naturally produced extracellular matrix inhibits growth rate and invasiveness of human osteosarcoma cancer cells. Medical Oncology, 24:209–217, 2007.
- [54] M Horowitz. Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblast function and bone formation. Calcified tissue international, 72(1):5, 2003.
- [55] MF Young. Bone matrix proteins: more than markers. Calcified tissue international, 72(1):2, 2003.
- [56] JS Kenkre and JHD Bassett. The bone remodelling cycle. Annals of clinical biochemistry, 55(3):308–327, 2018.

- [57] Mingming Wu and A. Swartz Melody. Modeling tumor microenvironments in Vitro. Journal of Biomechanical Engineering, 136(2):1–7, 2014.