



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular

DESARROLLO DE UN ADAMIAJE DE MATRIZ EXTRACELULAR PARA MODELOS DE CANCER ÓSEO

Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular

FRANCISCO JAVIER VERDUGO AVELLO
CONCEPCIÓN-CHILE
2024

Profesor Guía: Jorge R. Toledo Alonso
Dpto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Jorge R. Toledo Alonso
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Soraya E. Gutiérrez Gallegos
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Carolina P. Gómez Gaete
Facultad de Farmacia

Dr. Juan P. Acevedo Cox
Profesor Evaluador Externo
Facultad de Medicina
Universidad de los Andes

Dra. Raquel Montecino Segui
Directora
Programa Doctorado en Biotecnología Molecular

No se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

DEDICATORIA

Este proyecto de Tesis de doctorado no hubiera sido posible sin el apoyo de mi familia, quienes entregaron su apoyo, tiempo de vida y amor durante los momentos más arduos para promover el avance durante esta etapa de desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo recibido por parte del equipo docente del Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, en especial a mi referente, supervisor y guía Jorge R. Toledo, pero también a los profesores Raquel Montecino, Coralia Rivas e Iván González por su apoyo durante estos cuatro años.

As su vez varios docentes de la misma casa de estudios realizaron una contribución al proyecto en varios aspectos, destacando la utilización de infraestructura de la Facultad de Medicina con la Unidad de Anatomía Patológica a cargo de la Prof. Dra. Carolina Delgado Schneider, Facultad de Ingeniería a través del Prof. Dr. Carlos Medina Muñoz, Facultad de Ciencias Químicas con el Prof. Dr. Bruno Urbano Cantillana y de la Facultad de Química y Farmacia con la Prof. Dra. Carolina Gómez Gaete.

Finalmente, como todo proyecto de investigación biomédico, se agradece el tiempo y colaboración de funcionarios del Hospital Clínico Regional Dr. Guillermo Grant Benavente del Servicio Salud Concepción, especialmente a la Unidad Local de Procuramiento, Equipo de Coloproctología y Equipo de Cadera del Hospital Traumatológico de Concepción.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo General.....	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. MARCO TEÓRICO.....	8
4.1 El tejido óseo.....	8
4.2 La Matriz extracelular ósea.....	11
4.3 Andamiajes celulares para ingeniería de tejidos.....	16
4.4 Biomecánica del andamiaje celular.....	19
4.5 Andamiajes celulares compuestos.....	21
4.6 Las patologías óseas.....	24
4.7 Modelos óseos <i>in vitro</i>	25
4.8 El cultivo celular 3D.....	27
4.9 Modelos avanzados de cáncer óseo <i>in vitro</i>	28
V. METOLOGÍA.....	32
5.1 Procesamiento de hueso humano.....	32
5.1.1 Descelularización ósea.....	32
5.1.2 Procesamiento del hueso.....	32
5.1.3 Análisis de descelularización.....	33
5.2 Preparación de hidrogel compuesto.....	34
5.3 Caracterización físico química.....	35
5.3.1 Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.....	35
5.3.2 Microscopía electrónica de barrido.....	35
5.3.3 Microscopía electrónica de transmisión.....	35
5.3.4 Test de hinchamiento.....	36
5.3.5 Caracterización reológica.....	36
5.4 Test de impresión 3D de microextrusión.....	36

5.5 Cultivo celular.....	37
5.5.1. Células MCF7 y Saos2.....	37
5.5.2. Cultivo Primario de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....	38
5.6 Evaluación de biocompatibilidad.....	39
5.6.1. Evaluación de toxicidad <i>in vitro</i> mediante tinción de calceína AM etidio homodimero-1.....	39
5.6.2 Evaluación de viabilidad <i>in vitro</i> mediante ensayo con medio condicionado.....	39
5.6.3 Morfología de los constructos por histología.....	40
5.6.4. Tinción con rojo de alizarina.....	41
5.6.5 Microscopía confocal.....	41
5.7 Inmunofluorescencia.....	42
5.8 Inmunohistoquímica.....	44
5.9 Cuantificación de la rigidez de la matriz.....	45
5.10 Ensayo de citotoxicidad de quimioterapéutico	45
VI. RESULTADOS.....	46
6.1 Descelularización.....	46
6.2 Caracterización físico-química.....	47
6.3 Test de impresión 3D.....	55
6.4 Análisis de biocompatibilidad.....	56
6.5 Análisis con microscopia combinada.....	64
6.6 Caracterización de mineralización.....	65
6.7 Inmunofluorescencia.....	68
6.8 Análisis reológico.....	70
6.9 Inmunohistoquímica.....	72
6.10 Toxicología “drug screening”.....	73
VII. DISCUSIÓN.....	76
VIII. CONCLUSIONES.....	88
VIII. REFERENCIAS.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Signos específicos y características de la matriz extracelular de diferentes enfermedades óseas.....	11
Tabla 2. Medio osteogénico.....	43

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Representación esquemática de la arquitectura ósea.....	9
Figura 2. Imágenes en relación a procesamiento de cabeza femoral humana donada por estudio CEC 19-06-42.....	46
Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de DBMP por tamiz de 200 μm	47
Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de DBMP por tamiz de 90 μm	48
Figura 5. Gráfico de medición de micropartículas descelularizadas de hueso de mayor tamaño.....	48
Figura 6. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	49
Figura 7. Test de hinchamiento del hidrogel gelatina metacrilada (GelMA, GM) y compuesto BG (BG1 y BG2)	51
Figura 8. SEM de hidrogeles por criofractura.....	52
Figura 9. TEM de nanopartículas obtenidas del ensayo de medio condicionado.....	53
Figura 10. SEM-EDS del hidrogel compuesto con DBMP.....	54
Figura 11. Ensayo reológico para evaluación de las propiedades del hidrogel compuesto BG.....	55
Figura 12. Impresión 3D con el hidrogel compuesto.....	56
Figura 13. Gráficos de ensayo de viabilidad celular según ISO 10993-5.....	57
Figura 14. Imagen de microscopía de inmunofluorescencia con células MCF7 con tinción de Calceina AM.....	58

Figura 15. Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia con ensayo LIVE/DEAD.....	59
Figura 16. Imágenes y gráficos del cultivo celular 3D para biofabricación de un modelo <i>in vitro</i> óseo 3D.....	60
Figura 17. Imágenes de microscopía óptica directa para contrastar la diferencia morfológica entre las líneas celulares.....	62
Figura 18. Gráficos de cuantificación de viabilidad celular a los días 7, 14 y 21 de cultivo 3D con líneas celulares de cáncer.....	63
Figura 19. Imágenes de microscopía óptica directa de los montajes histológicos del cultivo celular 3D hasta los 21 días.....	64
Figura 20. Análisis de microscopía óptica asociada a inmunofluorescencia de las estructuras celulares de Saos2 mediante tinción con rojo de alizarina y DAPI.....	65
Figura 21. Imágenes de microscopía óptica directa 10x de ensayo de osteodiferenciación con medio osteogénico en cultivo por 30 días.....	66
Figura 22. Imágenes de citometría de flujo para evaluación de marcadores de células madre mesenquimales.....	67
Figura 23. Microscopía de inmunofluorescencia confocal para evaluar presencia celular en relación con las DBMP en hidrogeles compuestos BG a los 14 días.....	68
Figura 24. Microscopía de inmunofluorescencia confocal de células Saos2 (A-C) y ADMSCs (D-F) a los 30 días de cultivo celular 3D.....	69
Figura 25. Gráficos de ensayos reológicos de los hidrogeles con línea celular MCF7.....	71
Figura 26. Microscopía óptica directa de ensayo de inmunohistoquímica de cultivo celular 3D con línea celular MCF7.....	72
Figura 27. Ensayo de IC50 con dos líneas celulares (A) Saos2 y (B) MCF7 con el quimioterápico docetaxel a diferentes concentraciones por 72 h.....	74

RESUMEN

Los tumores y las metástasis en el tejido óseo son un problema sanitario relevante debido a su impacto en la salud y el bienestar. Los tumores óseos metastásicos y tumores malignos con un diagnóstico tardío presentan una tasa de supervivencia reducida, siendo inferior a un año para los pacientes metastásicos. Es urgente la necesidad de desarrollar medidas complementarias para mejorar la eficacia de las terapias farmacológicas actuales y también el reducir la duración del tratamiento para evitar una carga económica creciente en los pacientes y en el sistema sanitario. Los modelos óseos tridimensionales *in vitro* tienen la capacidad de simular al microambiente óseo en el laboratorio con la posibilidad de introducir células derivadas de pacientes a partir de biopsias de tejido de cáncer óseo para estudiar tratamientos personalizados que puedan conducir a terapias más efectivas y personalizadas para los pacientes. Sin embargo, para lograr una traslación clínica de los resultados *in vitro* se requiere de un biomaterial que pueda reproducir la fisiopatología del tejido óseo en sus propiedades que permita a las células adherirse, sobrevivir, expandirse y generar procesos de relación con la matriz extracelular.

El objetivo de este trabajo fue el desarrollar un andamio tridimensional que simule la matriz extracelular ósea con la capacidad de biofabricación de modelos de tejido óseo *in vitro* que simulen patologías tumorales. Para esto se trabajó con células asociadas al cáncer óseo y otras relevantes para conformar modelos más complejos, tales como de cáncer de mama (MCF7), osteosarcoma (Saos2), pre-osteoblastos (MC3T3-E1) y cultivo primario (células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo). El modelo de ingeniería de tejidos se basó en un enfoque de hidrogel de gelatina metacrilada con el empleo de un componente biológico, en este caso micropartículas descelularizadas de hueso humano como parte de un biomaterial compuesto que fue validado mediante caracterización físico-químicas y biológicas.

Se desarrolló un hidrogel compuesto por gelatina metacrilada y micropartículas óseas humanas con comportamiento pseudoplástico. Estas propiedades fueron validadas mediante

procedimientos de bioimpresión, mientras que la presencia de micro y nanopartículas óseas se confirmó mediante microscopía electrónica. La biocompatibilidad del hidrogel se evaluó a través de diversos ensayos para la cuantificación de la citocompatibilidad, incluyendo análisis por imágenes y mediciones moleculares. No se registraron efectos tóxicos, lo que indica que las células pudieron adherirse y proliferar dentro del andamiaje, manteniendo su viabilidad durante un período de hasta 30 días en cultivos celulares tridimensionales. Además, las diferentes validaciones demostraron ser compatible con procesos clínicos para distintos tipos de análisis celulares y moleculares. El hidrogel compuesto desarrollado en este trabajo contribuye a la innovación en la ingeniería de tejidos en el área músculo esquelético, específicamente de biofabricación de tejido óseo y al reemplazo de modelos animales para estudios del tejido óseo por la sustitución de modelos *in vitro*.

ABSTRACT

Bone tissue tumours and metastases are a significant healthcare problem due to their impact on health and well-being. Metastatic bone tumours and late-diagnosed malignant tumours have a reduced survival rate, being less than one year for metastatic patients. There is an urgent need to develop complementary measures to improve the efficacy of current drug therapies and also to reduce treatment time to avoid an increasing economic burden on patients and the healthcare system. Three-dimensional *in vitro* bone models can simulate the bone microenvironment in the laboratory, offering the possibility of introducing patient-derived cells from bone cancer tissue biopsies to study personalized treatments that may lead to more effective and personalized therapies for patients. However, achieving clinical translation of *in vitro* results requires a biomaterial that can reproduce the pathophysiology of bone tissue in its properties, allowing cells to adhere, survive, expand, and generate processes related to the extracellular matrix.

The objective of this work was to develop a three-dimensional scaffold that simulates the bone extracellular matrix and is capable of biofabricating *in vitro* bone tissue models that mimic tumour pathologies. To this end, we worked with cells associated with bone cancer and other relevant cells to form more complex models, such as breast cancer (MCF7), osteosarcoma (Saos2), pre-osteoblasts (MC3T3-E1), and primary cultures (adipose-derived mesenchymal stem cells).

The tissue engineering model was based on a methacrylated gelatin hydrogel approach using a biological component, in this case decellularized human bone microparticles as part of a composite biomaterial that was validated through physicochemical and biological characterization. A hydrogel composed with pseudoplastic behaviour was developed. These properties were validated using bioprinting procedures, while the presence of bone micro- and nanoparticles was confirmed by electron microscopy. The hydrogel's biocompatibility was evaluated through various cytocompatibility quantification assays, including imaging analysis

and molecular measurements. No toxic effects were recorded, indicating that cells were able to adhere and proliferate within the scaffold, maintaining their viability for up to 30 days in three-dimensional cell cultures. Furthermore, the various validations demonstrated its compatibility with clinical processes for various types of cellular and molecular analyses. The composite hydrogel developed in this work contributes to innovation in musculoskeletal tissue engineering, specifically in the biofabrication of bone tissue, and to the replacement of animal models for bone tissue studies with *in vitro* models.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades óseas están presentes en todo el mundo y la gran mayoría de ellas aún carecen de un tratamiento terapéutico específico. Con frecuencia, la población de mayor edad experimenta un dolor considerable y posiblemente una discapacidad, mientras que muchas personas más jóvenes a menudo se ven afectadas por enfermedades óseas relacionadas con lesiones. Un informe reciente estimó que 1.71 mil millones de personas tienen una afección musculoesquelética en el mundo, como cáncer de hueso y osteoporosis, entre muchas otras (1). Por ejemplo, la osteoporosis por sí sola está afectando a más de 200 millones de personas, causando algún grado de discapacidad y predisponiendo a fracturas, un contribuyente mayor a la necesidad mundial de rehabilitación. Además, debido a la comunicación cruzada permanente del hueso con diferentes células, tejidos y órganos, inevitablemente la presencia de afecciones relacionadas con los huesos puede aumentar el riesgo clínico de desarrollar enfermedades cardiovasculares y/o mentales asociadas (2). La mayoría de estas afecciones óseas aún se tratan sin terapias curativas definitivas y muchas de ellas solo tienen indicaciones de suplementos dietéticos o escaleras de tratamiento interminables, por ejemplo, con medicamentos antiinflamatorios, que no se dirigen eficazmente a las raíces de la enfermedad, sino simplemente a sus síntomas (3). Un ejemplo bien conocido de enfermedades óseas son los tumores óseos y las metástasis, estos pueden desequilibrar aún más la homeostasis y actualmente existe una falta de efectividad terapéutica debido principalmente al producto de la variabilidad biológica interpersonal en contraposición al diseño terapéutico enfocado en un paciente estándar o promedio (4). Hoy en día, se sabe que la homeostasis ósea mantenida por el componente celular se altera por las interacciones producidas por las células cancerosas, lo que suele evidenciarse por una sobreexpresión de citocinas que estimulan la resorción ósea (p. ej. cascada RANK-RANKL-OPG en cáncer de mama avanzado) (5). Las interacciones tumor-hueso juegan un papel fundamental en el diseño terapéutico, pero esta interacción entre componentes celulares varía entre pacientes

con la misma enfermedad y la remodelación puede verse afectada por diversos estímulos mecánicos y moleculares debido a las diferencias étnicas, el envejecimiento, la menopausia y el tipo y duración de su actividad física típica que determinan variaciones en las respuestas a diferentes fármacos (6-8). Además, en algunos casos, como en el cáncer de mama avanzado con metástasis óseas, hay una transformación de células epiteliales a mesenquimales con múltiples mutaciones genéticas desde el primer diagnóstico anatomopatológico (es decir, Hipótesis de Goldie-Coldman), lo que provoca una heterogeneidad tumoral dependiente del paciente (9). Por lo tanto, la variabilidad entre pacientes influye en el pronóstico del cáncer, por lo que es obligatorio adaptar las terapias a las características individuales de los pacientes para mejorar la efectividad general.

En el proceso de desarrollo de fármacos, más de la mitad de todos los fármacos fracasan en los ensayos clínicos de Fase II y Fase III debido a la falta de eficacia, y alrededor de otro tercio fracasan debido a problemas de bioseguridad, con un promedio de inversión que oscila entre \$161 millones y \$4,54 mil millones y entre \$944 millones y \$4,54 mil millones para fármacos contra el cáncer (10-12). La industria biotecnológica ha mejorado varias técnicas una vez que se ha demostrado la eficacia de un nuevo compuesto *in vivo*, generalmente con modelos de roedores (13-15), sin embargo, es difícil homologar la misma acción en pacientes debido a la variabilidad en las vías intracelulares del segundo mensajero, así como a las respuestas inmunológicas drásticamente diferentes en roedores en comparación con los humanos (16, 17). Las técnicas de cribado de alto rendimiento (HTS) existentes se basan principalmente en cultivos celulares en monocapa (2D), que difieren en gran medida de la matriz extracelular (MEC) humana tridimensional (3D) (18, 19). Los ensayos bioquímicos y de expresión génica en 2D no logran predicciones adecuadas cuando se emplean en la función de los genes a nivel posterior de un tejido u órgano (13). La necesidad de mejorar los métodos actuales de desarrollo de nuevos fármacos contra enfermedades óseas, como por ejemplo

tumores óseos y metástasis, es imperativa, ya que los modelos *in vivo* e *in vitro* actuales no han demostrado la efectividad necesaria para los pacientes de hoy (17).

Los sistemas innovadores de plataformas basadas en células y tejidos que pueden asemejarse mejor al comportamiento fisiológico humano, junto con las tecnologías de ensayos emergentes, han dado como resultado modelos mejorados que pueden cambiar el proceso de descubrimiento/desarrollo de fármacos. El empleo simultáneo de células derivadas de pacientes, modelos de cultivo celular en 3D, bioimpresión, dispositivos microfluídicos, automatización, entre otros, puede brindar nuevas oportunidades para tener éxito en el descubrimiento de fármacos asociados a enfermedades óseas (18).

Los tumores óseos y las metástasis pueden plantear importantes problemas sanitarios debido a su impacto en la salud y el bienestar general de los pacientes. Los tumores óseos primarios, originados en el propio hueso, en general son de baja incidencia comparado con la enfermedad ósea metastásica (tumores secundarios), en la que el cáncer se propaga a los huesos desde otros tejidos u órganos provienen principalmente de otros cánceres comunes como el de mama, pulmón, próstata (19). El cáncer óseo puede provocar diversas complicaciones, tales como dolor óseo, pérdida de masa ósea, fracturas, daño a los nervios e incluso parálisis si afectan a la médula espinal (20-22). El cáncer de huesos es relativamente poco común en comparación con otros tipos de cáncer, las tasas de incidencia en los Estados Unidos estiman que en el año 2024 se diagnosticarán alrededor de 3970 casos nuevos de cáncer de huesos primario, con aproximadamente 2270 casos en hombres y 1700 en mujeres (23), representando menos del 1 % de todos los cánceres diagnosticados anualmente. Por ejemplo en el Reino Unido, el osteosarcoma representa menos del 1% de todos los casos nuevos de cáncer, con alrededor de 600 casos nuevos diagnosticados cada año (24). Esto contrasta con la situación de la metástasis ósea que es mucho más común, lo que representa un problema de salud importante, el 5,1% de los pacientes con cáncer en los Estados Unidos

son diagnosticados con metástasis ósea, lo que se traduce en alrededor de 18,8 casos por cada 100.000 personas al año (25).

La probabilidad de desarrollar metástasis óseas varía significativamente según el tipo de cáncer, el cáncer de próstata tiene una incidencia muy alta, con estimaciones que varían del 18% al 29%(26). El cáncer de mama muestra una incidencia acumulada de aproximadamente el 64% en casos metastásicos (27). El cáncer de pulmón tiene una prevalencia de aproximadamente el 35% para aquellos con enfermedad metastásica (26, 27). En Chile, la prevalencia de metástasis óseas ha sido evidenciada ser particularmente común entre pacientes con cáncer de mama. Según un estudio de Lobos et al. (28) que incluyó a 822 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, aproximadamente el 8,88% presentó metástasis ósea. Esta condición impacta significativamente la mortalidad de los pacientes, con una tasa de mortalidad del 74% observada en aquellos con metástasis ósea en comparación con el 16,69% en aquellos sin ella. El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres en Chile, y el hueso se identifica como el sitio primario de metástasis en el 26-50% de los casos. Además, alrededor del 75% de los pacientes que mueren por cáncer de mama tienen metástasis óseas al momento de la muerte (28).

El desarrollo de una plataforma óseo *in vitro* para estudiar el cáncer y la metástasis es relevante debido a su potencial para proporcionar conocimientos más profundos sobre los mecanismos de la enfermedad. Existen interacciones directas entre las células tumorales y el microambiente óseo que los modelos *in vitro*, en particular los sistemas tridimensionales (3D), pueden replicar, permitiendo a los investigadores estudiar cómo las células cancerosas invaden el tejido óseo, interactúan con las células óseas e influyen en los procesos de remodelación ósea (29, 30). Los modelos *in vitro* 3D pueden imitar la arquitectura y la composición de la MEC del tejido óseo, lo que proporciona una representación más precisa del microambiente tumoral (31, 32). Además, son fundamentales los modelos para el desarrollo y selección de fármacos, ya que con estos modelos se realizan las pruebas de

eficacia de los nuevos candidatos farmacéuticos a través de la selección de alto rendimiento de agentes quimioterapéuticos en un entorno controlado. Este enfoque puede generar datos preclínicos más confiables que predicen mejor los resultados clínicos (29, 33). Por otro lado, al utilizar células derivadas de pacientes en estos modelos, los investigadores pueden adaptar las pruebas de fármacos a los perfiles de cada paciente, lo que mejora la probabilidad de identificar tratamientos efectivos y minimiza los efectos adversos a modo de enfoque de medicina personalizada (30, 33).

El estudio de las enfermedades oncológicas que afectan al tejido óseo son de gran relevancia debido a su alta prevalencia en la población actual. Por ello, es crucial disponer de plataformas para realizar estudios fisiopatológicos óseos *in vitro*, que permitan generar tanto conocimiento básico (por ejemplo, a nivel molecular) como aplicado (por ejemplo, en el desarrollo de nuevas terapias y diagnósticos). A pesar de los avances en ingeniería de tejidos, aún no se dispone del biomaterial ideal que cumpla con todas las características deseables a modo de que su uso como modelo *in vitro* 3D y biofabricación de tejido óseo, pueda generar las mismas interacciones que el tejido óseo humano, lo que resalta la necesidad de una nueva propuesta que pueda integrarse con las tecnologías actuales. Es por esto que se estableció como objetivo el desarrollar un nuevo andamiaje celular 3D para modelamiento *in vitro* de cáncer óseo en base al diseño de un biomaterial costo-eficiente utilizando los avances y conceptos de la ingeniería de tejidos con visión de biomimética y escalabilidad. Para esto se desarrolló un hidrogel en base a la ciencia de descelularización, en este caso de tejido óseo para ser parte de un compuesto mixto con características de biotinta de impresión 3D. El hidrogel cual fue caracterizado como MEC o andamiaje celular. A continuación, se detalla cómo se realizó este desarrollo en dos secciones; la primera contiene la información de la fabricación y caracterización del hidrogel para después continuar con la siguiente sección de validaciones biológicas *in vitro*.

II. HIPÓTESIS

En base a la información bibliográfica revisada, se identificó la necesidad de desarrollar nuevos modelos de tejido óseo para estudios fisiopatológicos y para desarrollar nuevas terapias basadas en ingeniería de tejidos, se propone el diseñar y producir un andamiaje celular 3D basado en un principio activo biológico que simule la matriz extracelular ósea utilizando hueso humano donado y procesado para poder ser utilizado como una plataforma de automatización de cultivos celulares 3D en líneas de investigación biomédica del área musculo-esqueletal.

Con el anterior desafío, aparecen varias preguntas de investigación tales como; ¿Es posible la producción de micropartículas óseas descelularizadas? ¿Son las micropartículas óseas descelularizadas potencialmente combinables con un polímero con propiedades pseudoplásticas? ¿Qué características fisicoquímicas y estructurales tienen las micropartículas óseas descelularizadas al ser combinadas con un polímero biocompatible? ¿Es posible realizar manufactura aditiva con un hidrogel compuesto con micropartículas óseas descelularizadas? ¿Son las micropartículas óseas descelularizadas biocompatibles para la biofabricación de un modelo óseo *in vitro*? ¿Qué procesos a nivel celular soporta y produce esta combinación, y a qué nivel se pueden hacer mediciones de esta?

Estas preguntas definen la siguiente hipótesis de investigación: Es posible desarrollar un andamiaje celular 3D basado en un hidrogel de matriz ósea humana descelularizada que proporcione un microambiente biomimético, favoreciendo la viabilidad celular, la adhesión y la proliferación en modelos *in vitro* de tejido óseo para estudios de cáncer óseo.

III. OBJETIVOS

La ingeniería de tejidos busca desarrollar soluciones innovadoras para la generación de modelos de tejidos humanos. En este contexto, el presente proyecto tiene como objetivo desarrollar y validar un nuevo hidrogel como andamiaje celular 3D, elaborado a partir de componentes derivados de hueso humano, con propiedades óptimas para su aplicación en el desarrollo de modelos *in vitro* más representativos del microambiente natural del tejido. Este andamiaje celular se plantea como una herramienta biocompatible y funcional, que promueve la proliferación, adhesión y diferenciación celular, ofreciendo un modelo alternativo que cumple con los principios de las 3R en investigación biomédica y abre nuevas oportunidades para el estudio de enfermedades óseas y el ensayo de terapias regenerativas.

3.1 Objetivo General

Desarrollar un andamiaje celular 3D basado en un hidrogel de matriz ósea humana descelularizada que proporcione un microambiente biomimético, optimizando la viabilidad, adhesión y proliferación celular para la biofabricación de modelos *in vitro* de tejido óseo aplicables a estudios de cáncer óseo.

3.2 Objetivos específicos

1. Diseñar la composición del hidrogel compuesto por micropartículas de tejido óseo humano descelularizado.
2. Caracterizar el hidrogel compuesto mediante evaluación físico-químicas.
3. Evaluar la biocompatibilidad del hidrogel compuesto en líneas celulares humanas tumorales y no tumorales.
4. Analizar las interacciones entre los componentes celulares y andamiaje del hidrogel.

IV. MARCO TEORICO

4.1.- El tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo derivado de dos capas germinales primarias del desarrollo embrionario, la bóveda craneofacial y la cara derivan de la cresta neural del ectodermo y el resto de huesos largos provienen del mesodermo, lo que resulta en una diferencia en su proceso de formación y mineralización por la presencia (huesos largos) o ausencia (craneofacial) de cartílago. El tejido óseo se caracteriza por tener una estructura altamente jerárquica compuesta por ensambles de proteína orgánica y matriz mineralizada de colágeno principalmente tipo I con fase de nanopartículas minerales de cristales de hidroxiapatita a base de fosfato de calcio (34). La composición de diferentes matrices y su estructura anatómica varía dependiendo del sitio esquelético, edad, sexo, función fisiológica y carga mecánica (35) debido a que tiene una capacidad de adaptación modelada por su entorno mecánico que causa un reordenamiento fluctuante de sus bloques de construcción básicos internos (36) o como partes unitarias de la jerarquía, p. ej. osteón.

El hueso tiene dos divisiones principales de matriz histológica separadas por función, mientras que el hueso esponjoso es menos compacto y con formas irregulares que contienen médula ósea y células progenitoras, el hueso cortical tiene propiedades mecánicas superiores y es responsable del soporte del cuerpo debido a su disposición mecánica que le permite soportar ciertas cantidades de rigidez. Esto produce altas variaciones en el módulo de elasticidad y la resistencia última (resistencia entre 5.3-193 MPa y elasticidad 0.4-17 MPa) (37-39). La médula o hueso trabecular se encuentra dentro de las áreas corticales y su unidad funcional es la trabécula que se alinea de acuerdo a la carga mecánica (40). La médula es altamente vascular compuesta de médula grasa inactiva amarilla y médula hematopoyética activa roja que proporciona poblaciones de células madre para propósitos hematopoyéticos, estromales (tejido conectivo) y endoteliales (41). (Fig. 1A).

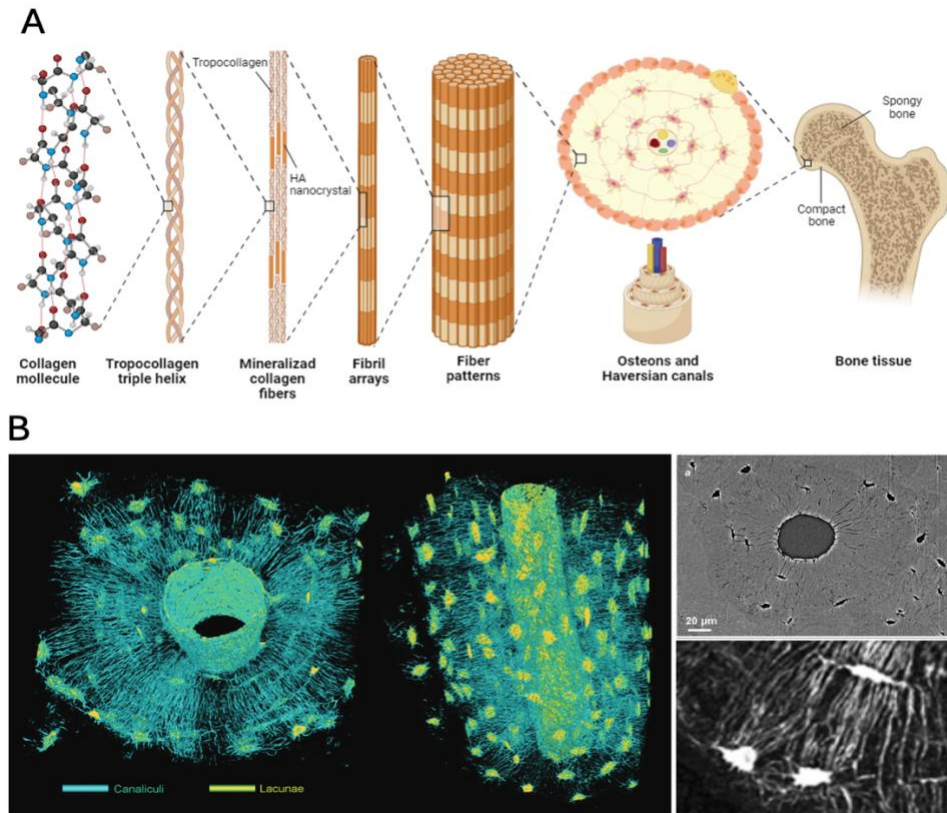


Figura 1. Representación esquemática de la arquitectura ósea. A. Niveles de jerarquía del tejido óseo. Creado con *BioRender.com*. B. Resolución espacial a nanoescala de imágenes de sincrotrón de hueso y reconstrucción 3D de imágenes para la red lacunocanalicular en análisis tridimensional (33). *Modificado de:* © 2021 John Wiley & sons, Inc.

El hueso cortical está cubierto en su superficie externa por el periostio, una membrana fibrosa inervada e irrigada, y en la cara interna por el endostio que da a la médula ósea. La unidad funcional básica del tejido óseo es la osteona, es decir, el sistema de Havers, una estructura de entre 100 y 200 mm (34, 40) orientada en una disposición “similar a un fractal” de muchas capas de láminas concéntricas (3-7 μm de espesor) que rodean a las células residentes osteocitos (90% de las células óseas totales y alrededor de 25.000 osteocitos por mm³ de hueso cortical) (Fig. 1). Los osteocitos son células residentes en el hueso que están interconectadas por canales, es decir, canalículos, estas células pueden vivir hasta alrededor

de 25 años y supervisan la regulación mineral de la MEC. La forma circular de las osteonas secundarias (remodeladas), de alrededor de 50 a 90 μm de diámetro, se encuentran en orden de disposición de los vasos sanguíneos que se ubican concéntricamente a un canal vascular central. Este suministro de nutrientes se complementa con los canales de Volkmann que interconectan los vasos principales (36). La osteona (Fig. 1) en un solo caso de una sola sección de hueso cortical tiene áreas dentro que son altamente variables (42) y el tamaño de los canales de Havers es mucho más variable que el tamaño de la osteona, aunque varias mediciones en humanos han estimado un diámetro del ostión de 200 a 260 μm (43).

En la jerarquía del hueso (Fig. 1), los bloques de construcción comienzan en la nano escala con fibrillas de colágeno mineralizadas (100 nm de diámetro y 5 - 10 μm de longitud) (44, 45). Estas fibrillas están compuestas por varias moléculas de colágeno que se autoensamblan en fibrillas ordenadas para posteriormente ser recubiertas y compiladas entre sí con hidroxapatita (espesor de 1,5–4,5 nm), causando el crecimiento y mineralización de las fibrillas en un "patrón repetido y escalonado". La disposición osteona de los bloques de construcción en diferentes escalas de longitud forma una estructura jerárquica que controla sus propiedades mecánicas (46-48) y se correlaciona con diferentes mecanismos de resistencia a la fractura: la nanoestructura ósea permite el desenrollado molecular de las moléculas de colágeno, las fibrillas de colágeno mineralizadas se deslizan para proporcionar puentes de fibras de colágeno y, a microescala, la unión de ligamentos y la torsión de deflexión de grietas por osteonas en la interface óseo/matriz.

El hueso tiene una capacidad de auto-reparación bien conocida que es eficiente en la remoción y reemplazo de material dañado (49, 50) debido a su contenido celular en un periodo que dura 120-200 días en el caso del hueso cortical (51). Las fuentes celulares en el hueso son células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos (52). La matriz mineral rodea a las células osteocitos, mientras que los osteoblastos y osteoclastos se encuentran en zonas de remodelación ósea que permiten la adaptación estructural a los requerimientos

externos funcionales y la reparación (36, 49, 50). Los osteoblastos son derivados de células madre mesenquimales (MSCs) o precursores y responsables de la deposición de matriz mineralizada. Una vez que se han encontrado rodeados de matriz, se convierten en osteocitos en un espacio llamado “lagunas”. La eliminación del hueso “dañado o viejo” es mantenida por osteoclastos derivados de precursores hematopoyéticos de células multinucleadas con resorción ósea mineralizada (53). Todas estas fuentes celulares mantienen la homeostasis ósea mediante una comunicación activa regulada por dos proteínas, el ligando del activador del receptor para el factor nuclear KB (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) (54). El proceso dinámico de remodelación, orquestado por los componentes celulares, cambia dependiendo de la carga mecánica inducida por la tensión y el flujo de fluido intersticial (55) que causa una microestructura de crecimiento jerárquico adaptable para optimizar su estructura bajo funciones específicas (56-58).

4.2.- La matriz extracelular ósea

La MEC ósea ha sido objeto de una investigación activa en los últimos años por su relevancia en los campos de la regeneración tisular y el modelado de enfermedades que han empleado nuevas estrategias de diseño biomimético y biofabricación (59). Sin embargo, los diferentes estados del hueso lo convierten en un tejido dinámico con varias características diferentes dependiendo de las características de la persona y la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Signos específicos y características de la MEC de diferentes enfermedades óseas.

Enfermedad	Descripción	Características de la MEC	Ref.
Osteopenia	Baja masa ósea y baja densidad mineral ósea. Mayor riesgo de desarrollar osteoporosis.	La porosidad intracortical aumenta con la edad y la edad avanzada está fuertemente correlacionada con una disminución de la densidad lacunar de osteocitos (menos células óseas).	(46, 47)

Osteoporosis	<p>Trastorno esquelético caracterizado por una disminución de la resistencia ósea que conduce a un mayor riesgo de fractura.</p> <p>Reducción de la masa ósea y alteración de la arquitectura ósea.</p>	<p>La mineralización de la matriz ósea trabecular se reduce, se producen alteraciones en la alineación del colágeno.</p> <p>El aumento de la edad provoca una disminución de los niveles de fosforilación de proteínas totales, aproximadamente un 20% para las proteínas de la matriz ósea y aproximadamente un 30% para la osteopontina.</p> <p>Reducción de la matriz ósea con zonas de trabéculas más delgadas, microfisuras, agrandamiento de los espacios medulares del hueso y aumento de la degeneración adiposa de la médula.</p>	(48-51)
Osteogenesis imperfecta	<p>La “enfermedad de los huesos de cristal”, trastorno genético caracterizado por una disminución de la densidad ósea con un mayor riesgo de fracturas óseas.</p> <p>Las mutaciones en los genes COL1A1 o COL1A2 se asocian con anomalías en la síntesis y/o procesamiento del colágeno tipo I, por lo tanto en la arquitectura ósea.</p>	<p>La mineralización está aumentada, aunque hay una formación y estructura alterada de la MEC ósea. Las láminas están presentes con una organización irregular y una apariencia de malla.</p> <p>Hay cristales de apatita significativamente más pequeños, altamente compactados y desorientados.</p> <p>MEC con menor rigidez y elasticidad.</p> <p>La histopatología muestra un gran aumento en la porosidad cortical, el diámetro del canal y la conectividad.</p>	(52-55)
Osteosarcoma	Transformación neoplásica de las células óseas. Comúnmente, subtipo	Transformación de la MEC con una matriz robusta con osteoide patógena	(56-58)

	<p>derivado de osteoblastos.</p> <p>Esto conduce a una disminución de la resistencia ósea y puede causar fractura patológica por un traumatismo menor.</p>	<p>La MEC del osteosarcoma es un andamiaje para la rápida progresión tumoral, rápida resorción ósea y deposición.</p> <p>Presenta una alineación desorganizada y una isotropía aumentada en la porosidad y las fibras de colágeno.</p> <p>Muchas proteínas de la matriz extracelular, como los colágenos I, III, IV y V, la fibronectina y la laminina. Otros proteoglicanos están aumentados en la MEC.</p>	
Secondary bone metastasis	<p>Dependiendo del tumor primario, por ejemplo, de mama y próstata, entre otros.</p> <p>Comúnmente provoca un dolor repentino y notorio y puede predisponer a fracturas óseas.</p>	<p>Existe un fenotipo esquelético de microarquitectura de colágeno desorganizada, disposición anormal de osteoblastos y cristales de apatita</p> <p>La mayor actividad osteolítica producida por tumores secundarios provoca un recambio óseo acelerado con menor rigidez (módulo de Young 14% menor) y más frágil que el hueso laminar normal.</p>	(60, 61)

La MEC ósea es un material compuesto de proteínas y minerales rígidos, que en su configuración otorgan un sistema ligero pero resistente, flexible y adaptable con la capacidad de soportar diversos grados de tensiones mecánicas manteniendo un cierto grado de elasticidad y capacidad de remodelación. La deposición y remodelación del hueso permiten una flexibilidad en su estructura, ya sea engrosando o eliminando material calcificado para facilitar las necesidades funcionales biomecánicas. Este modelado sirve para adaptarse a las necesidades de cada individuo y se produce como resultado de la actividad del componente celular que lo habita, los osteoclastos que reabsorben hueso y los osteoblastos que sintetizan y/o depositan hueso. Los osteoclastos se originan a partir de células madre hematopoyéticas

en una vía similar a los macrófagos y excretan ácidos desmineralizantes y proteasas de matriz para eliminar activamente la matriz ósea mineralizada de la superficie del hueso en las llamadas fosas osteoclásticas (60). Por su parte, los osteoblastos se originan a partir de las células madre mesenquimales y tienen la función principal de producir tejido conectivo mineralizado en respuesta a factores de reabsorción o cicatrización. Estos dos tipos de células funcionan en respuesta a las señales del factor de crecimiento del tipo endocrino y paracrino de otros tipos de células, y también son fundamentales las interacciones entre los dos tipos para producir hueso nuevo (61, 62).

El tejido conjuntivo biológico, derivación del mesodermo que a su vez forma el tejido mesénquimal, se compone principalmente de fibrillas de colágeno tipo I, junto con una multitud de diferentes proteínas conectivas no colágenas que incluyen osteocalcina, osteopontina, fibronectina, laminina, ácido hialurónico y sialoproteína ósea (63-65). Los constituyentes de esta MEC ósea pueden direccionar la naturaleza bioquímica del hueso producido, influyendo en la migración, unión, el comportamiento y la diferenciación de las células osteogénicas y los osteoclastos y, además, la presencia de estas moléculas determina la producción y remodelación ósea (66). Esto es causado por diferentes moléculas de MEC que otorgan propiedades adhesivas y reguladoras de la actividad celular (67, 68). Dos de estas proteínas, la osteopontina y la osteocalcina, son las proteínas no colágenas más abundantes presentes en la MEC y se ha establecido que ambas proteínas están involucradas en los procesos de mineralización y reabsorción pueden servir no solo para la quimiotaxis y unión de las células óseas, sino también para interconectar la red de proteínas y mejorar la dureza de la MEC (69). Algunas proteínas adicionales de MEC no colágenas, como la laminina o la fibronectina, determinan la actividad celular a través de interacciones específicas con las integrinas de la membrana celular (70) y la posterior señalización (71) puede conducir efectos en la viabilidad celular, formación de hueso nuevo y apoptosis (72, 73).

Esta MEC orgánica está unida a la hidroxiapatita, una forma de mineral de calcio carbonatado, que los osteoblastos depositan cuando producen la nueva matriz orgánica y son depositadas en formas de teselas (74). Posteriormente, la hidroxiapatita se recambia enzimáticamente por una isoenzima no específica llamada fosfatasa alcalina (ALP) (75, 76), que es una variante con unión a membrana presente en múltiples tipos de tejidos, incluidos hígado, hueso y riñón, pero que se expresa en gran medida en osteoblastos con capacidad mineralizante. Si bien esta proteína está unida a la membrana celular son esenciales para la formación de tejido mineralizado, para esto el osteoblasto la libera en vesículas formadoras de matriz que actúan como sitios de activantes para la mineralización MEC (77). Hasta hoy, no se comprende a completamente el mecanismo completo por el cual funciona esta enzima ALP, pero si se sabe con certeza que la enzima trabaja para aumentar la concentración local de iones de fosfato, que se unen posteriormente a la red de proteína/hidroxiapatita para poder producir un tejido mineralizado denso y rígido (76, 78). Las propiedades mecánicas del hueso también están influenciadas por la concentración, modificación y orden de las proteínas de la MEC.

La MEC produce una señalización extracelular y mecano-señalización a las células residentes que a su vez producen señales intracelulares determinando la deposición, degradación y modificación de la matriz ósea, lo que es conocido como mecanotransducción (79). Esta MEC ósea en cierta forma determina la diferenciación de células multipotentes para la renovación del tejido. En primera instancia se conoció que la especificación del linaje de células madre mesenquimales (MSC) no diferenciadas o “naive” puede ser inducida por estímulos solubles (80), pero más tarde se evidenció una fuerte influencia de la rigidez del microambiente en la especificación de las células madre (81). En este estudio realizado por Engler et al. se ratificó que las MSC “naive” no expresan niveles basales de marcadores específicos de linaje, a diferencia de las células ya comprometidas (osteoblastos), y que responden dramáticamente tanto en morfología como en linaje a la matriz presente. El osteoide

es el componente orgánico sin mineralizar de la matriz ósea, es secretado por osteoblastos y es la matriz sobre la cual las MSCs experimentan una transición a preosteoblastos (82-84) y tiene una rigidez de 27 ± 10 kPa (25-40 kPa).

4.3.- Andamiajes celulares para Ingeniería de Tejidos

La disciplina de la ingeniería de tejidos, también conocida como medicina regenerativa, es un nuevo campo interdisciplinar que aplica los principios de las ciencias biológicas y de la ingeniería con el objetivo de generar construcciones de tejidos y órganos para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas y para el estudio de diferentes procesos fisiopatológicos mediante la creación de modelos *in vitro* que se asemejan de mejor manera al cuerpo humano. Desde su primera definición y publicación en el año 1993 por los investigadores Langer y Vacanti (85), esta disciplina innovadora ha combinado diferentes desarrollos tecnológicos estableciendo convergencias para la generación de constructos viables a través de las diferentes ciencias que la componen, tal es el caso con las ciencias de la ingeniería de los biomateriales, con la cual se entrega el soporte celular necesario a modo de andamiaje a las células inmersas en él y que son obtenidas desde el área biológica, ya sea cultivo primario o desde líneas celulares, para efectos de biofabricación de diferentes tejidos y órganos. Durante los últimos años, se han logrado enormes avances, tales como el desarrollo de nuevas fuentes celulares (e.g. células madre mesenquimales y pluripotenciales inducidas), el desarrollo de nuevos biomateriales con propiedades para su aplicación al área de la impresión 3D o mejor llamada “bioimpresión” y los grandes avances en la vascularización, la cual es considerada como uno de los hitos más críticos para lograr una construcción biológica exitosa (86).

En el cultivo celular 3D, la combinación de una MEC, o andamio, con una fuente de células enfocada en el hueso en un sistema estático (p. ej. matraces T) o dinámico (p. ej. biorreactor) durante un período de tiempo bajo temperatura y humedad fisiológicas es la estrategia más común para bioingeniería ósea o para crear hueso artificialmente *in vitro*, ya

que el biomaterial apoya la diferenciación, proliferación y migración celular emulando las condiciones *in vivo* hasta cierto punto (87). Aunque, para lograr un modelo óseo traslacional, el andamio seleccionado debe tratar de imitar la MEC ósea, cumpliendo con lo siguiente: (i) biocompatibilidad, (ii) facilitar la diferenciación y proliferación celular, (iii) cerca de la biomecánica natural, (iv) una estructura porosa que permita la reorganización celular promoviendo la angiogénesis y (v) biodegradabilidad adecuada para promover la remodelación (88, 89).

La biocompatibilidad es la característica fundamental para el soporte de la actividad de celular ósea y está estimado que no debe ser menor a un 70% comparado con su control positivo según el ISO 10993-5(90). Las células óseas, como los osteocitos residentes, se adhieren a un andamio de colágeno u otras proteínas de matriz mediante receptores de membrana llamados integrinas, particularmente aquellas que se unen a motivos de arginina – glicina - ácido aspártico (RGD) presentes en las proteínas de la MEC. La MEC ósea contiene al menos ocho glicoproteínas que contienen RGD (el principal colágeno, trombospondina, fibronectina, vitronectina, fibrilina, osteoadherina, osteopontina y sialoproteína ósea) (37). Estos péptidos permiten que los osteocitos se adhieran al andamio si tienen motivos RGD y promueven la unión a través de la unión de integrinas. Se pueden agregar diferentes proteínas y péptidos que son reconocidos por los receptores de la superficie celular al andamio para mejorar las interacciones célula-sustrato (91-93), como péptidos (RGD) que se unen a los receptores de integrinas en la superficie celular permitiendo la adhesión célula-MEC. Esta secuencia de motivo de adhesión celular está presente en varias proteínas que forman parte de la MEC, incluido el colágeno tipo I, la gelatina, la laminina y la fibronectina (94). Los péptidos RGD son moléculas bien conocidas que se utilizan para mejorar la adherencia inicial de las células osteoblásticas y las líneas celulares (p. ej., SaOS-2 y MC3T3-E1) en matrices de ingeniería tisular basadas en polímeros sintéticos degradables. Por ejemplo, se realizó un estudio comparativo entre RGD y RGE (péptido de control en experimentos que involucran

RGD debido a que no se une a las integrinas) para evaluar el potencial de diferenciación osteogénica en un cultivo celular 3D con MSC. En este estudio se demostró que los hidrogeles con RGD fueron muy superiores en la adhesión celular, la viabilidad y la diferenciación osteogénica que el grupo de hidrogeles RGE (95). Por lo tanto, esta secuencia peptídica es fundamental en lo que se refiere a la capacidad de facilitar el crecimiento óseo, influyendo positivamente en la adhesión celular, la proliferación y la deposición de MEC ósea (96, 97).

La potencia de osteoinductividad es esencial para promover la diferenciación ósea de las células óseas, como las líneas celulares relacionadas con osteoblastos, células osteoprogenitoras, MSC, entre otras, incrustadas en ella por la interacción célula-MEC que puede desencadenar la osteodiferenciación (98). Al mismo tiempo, se requiere un diseño apropiado de un andamio con las mismas señales mecanotransduccionales del hueso (99, 100). La biodegradabilidad juega un papel clave en la ingeniería ósea y su tasa debe ser inversamente proporcional a la tasa de deposición ósea para imitar la fisiología ósea natural (101), esta tasa depende de las características del andamiaje (p. ej. composición química, microarquitectura y propiedades mecánicas), del microambiente fisicoquímico (p. ej. temperatura, pH, O₂ y CO₂) y de factores biológicos (fuente celular y medio de cultivo empleado) (17, 102-104). La porosidad del hueso esponjoso es del 50 al 90% y en el hueso cortical está en el rango del 3 al 12%, esta baja porosidad en una disposición de osteonas hace que el hueso cortical sea mucho más resistente (104-109). Se ha descrito previamente que se requiere un tamaño de poro mínimo de 120 a 325 μm de diámetro para inducir la osificación y el posterior suministro de oxígeno en condiciones hipóxicas (105, 110).

Se han testeado diferentes componentes naturales y sintéticos para conformar andamiajes celulares: (i) biomateriales naturales como fibrina, ácido hialurónico, tejido óseo desmineralizado y componentes de MEC descelularizados; (ii) biopolímeros que se pueden subdividir en polímeros naturales como gelatina, gelatina metacrilada (GelMA), alginato, fibrina, colágeno, quitosano, ácido hialurónico y polímeros sintéticos como poli-(láctido) (PL),

poli-(glicólido) (PG), poli-(láctida-co-glicólida) (PLG), poli-(láctida-co-láctida) (PLL), poli-(caprolactona) (PCL); (iii) biocerámicos como bioglass, calcio (apatita), fosfatos bicálcicos y tricálcicos y algunos corales; (iv) metales y sus aleaciones tales como aleaciones de cobalto-cromo, acero inoxidable, aleaciones de aluminio y titanio y; (v) combinaciones de diferentes grupos de materiales como polímeros/cerámicas naturales, polímeros/cerámicas sintéticas o metal/cerámica (111).

4.4.- Biomecánica del Andamiaje Celular

La rigidez mecánica del andamiaje celular debe intentar imitar la rigidez ósea humana y la arquitectura de la matriz para asemejarse al hueso, esto varía según el proceso que se vaya a imitar, ya que difieren los usos para reemplazo óseo, donde se debe tener una matriz rígida, versus el tejido en formación osteoide de la reparación y regeneración ósea, ya que presenta una matriz menos rígida. En el año 2006, Engler et al. (81) identificaron un rango de la elasticidad del microambiente de la matriz como un regulador clave para el linaje del destino de las MSC y proporcionaron evidencia de que cuando ocurren cambios en la rigidez del sustrato, las MSC podrían ser diferenciadas hacia linajes óseos. Utilizando microscopía de fuerza atómica, midieron la deposición de la matriz de osteoblastos humanos después de 7 días de cultivo *in vitro*, lo que resultó en una rigidez de 27 ± 10 kPa. Ese rango se simuló más tarde con geles de poliacrilamida (rigidez de ~ 34 kPa) como sustrato para MSC que pudieron expresar linaje óseo al regular positivamente la osteocalcina y el factor de transcripción temprana RUNX2 (es decir, CBFa1). Por lo tanto, parece que el nicho de células madre es crucial para la diferenciación del linaje osteogénico de las MSC a través de la rigidez y la topografía del sustrato. En un estudio de Li y colegas (112), se combinaron estas tres características para evaluar las respuestas de las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSC) en diferentes geometría topográfica en geles de poliacrilamida. Informaron que un sustrato 3D específico es crucial para guiar la diferenciación osteogénica de las BM-

MSC, estableciendo que la rigidez del sustrato era la característica más relevante que la topografía de los geles para la proliferación y la diferenciación, específicamente en el linaje osteogénico observaron una mayor expresión de RUNX2 y β 3-tubulina cuando los geles estaban en el rango de rigidez de 25-40 kPa.

Las características de resistencia a la compresión, rigidez y elasticidad varían significativamente entre el hueso esponjoso (medular) y el cortical (compacto), y estas cambian durante las fases de reparación y remodelación. En términos de diferencias biomecánicas, se ha informado que el hueso cortical de las cabezas femorales tiene un módulo elástico de $18 \pm 1,8$ GPa y $153,5 \pm 21,6$ GPa de tensión última medida por carga de compresión (109). Por otro lado, el hueso esponjoso es mucho más difícil de estimar, ya que es mucho más activo y depende de factores individuales y externos (es decir, se informaron valores de módulo elástico en el rango de 1 - 22,3 GPa) (113). Huebsch et al. (114) cultivaron MSC murinas en hidrogeles compuestos hechos de alginato, agarosa y péptidos con módulo elástico en el rango de 2 a 110 kPa y encontraron que el mejor compromiso osteogénico estaba presente en hidrogeles con módulos entre 11 y 30 kPa. Además, Olivares-Navarrete et al. (115) demostraron que las MSC son capaces de diferenciación osteogénica dependiendo de la rigidez del sustrato. Sin factores de crecimiento exógenos, cultivaron MSC humanas en la superficie de acrilato de metilo y metacrilato de metilo reticulados con hidrogeles de poli(etilenglicol) dimetacrilato (PEGDMA) al 10%. Compararon las respuestas de las hMSC con osteoblastos humanos y encontraron que los niveles más altos de RUNX2 en la expresión génica se observaron en superficies más blandas (es decir, $0,8 \pm 0,1$ MPa) en ambos tipos de células y que las MSC eran más sensibles a la rigidez que los osteoblastos. Sorprendentemente, este estudio reveló que las rigideces en el rango de 40 MPa fueron mejores para inducir la diferenciación osteogénica de las MSC, muy por debajo de la rigidez máxima de 72 MPa probada. Zhang et al. (116) imprimieron construcciones de ingeniería similares a huesos en 3D cargadas de células mediante la combinación de hidrogeles de

alginate y gelatina con hMSC en una densidad de 5 millones de células por 1 ml de solución de tinta en dos formulaciones principales (módulo elástico de 1,8% de alginate: 750 ± 81 Pa y 0,8% de alginate: 484 ± 46 Pa). Después de un cultivo tridimensional en medios osteogénicos durante 42 días, sus hallazgos fueron significativamente diferentes a los de la mayoría de los demás estudios, es decir, que los andamios más blandos indujeron una mejor proliferación de hMSC, una mayor diferenciación osteogénica y una formación de minerales similares a la hidroxiapatita significativamente mayor en comparación con los andamios más rígidos. Esto se explicó probablemente porque los andamios más blandos permitieron una mayor propagación celular y facilitaron una degradación mediada por células más fácil para lograr mayores grados de propagación celular.

4.5.- Andamiajes Celulares Compuestos

Desde el inicio del concepto de ingeniería de tejidos, los hidrogeles se han utilizado ampliamente como andamiajes celulares para biofabricación ósea y para investigar la formación de tumores debido a sus propiedades biofísicas y mecánicas ajustables, facilidad de síntesis y reproducibilidad (114). Estos independiente de su origen tienen la propiedad de formar estructuras que retienen una gran cantidad de agua, facilitando la comunicación intercelular y por sus propiedades poliméricas a modo de biomaterial es capaz de soportar su crecimiento y expansión.

Una estrategia innovadora es el uso de MEC derivado de tejido óseo para cultivos 3D con o sin otros biomateriales para modelar las interacciones fisiopatológicas. Para modelar las interacciones entre mieloma y la MEC de la médula ósea, de la Puente et al. (113) crearon un biomaterial llamado 3DTEBM: una médula ósea creada por ingeniería de tejidos derivada de sobrenadantes de pacientes con mieloma. En este estudio se utilizaron explantes de médula ósea para la obtención de células de mieloma, células estromales y células endoteliales, lo que permitió gradientes de oxígeno y fármacos *in vitro*, favoreció la proliferación de células

tumorales e indujo más resistencia a los fármacos que los sistemas de cultivo de tejidos 2D o 3D comerciales. A su vez, otro equipo utilizó fragmentos de tejido extraídos del hueso sin más procesamiento y co-cultivados con células de cáncer de mama para investigar la migración, la colonización y la proliferación de células cancerosas, demostrando la posibilidad de mantener la viabilidad celular por un tiempo de cultivo corto (48 a 72 h) (117). Esto demostró la factibilidad de utilizar MEC derivada de tejido óseo como plataforma de investigación en modelos preclínicos. Otro gran avance fueron las investigaciones realizadas con matriz ósea descelularizada, el grupo de Richardson et al. utilizaron una técnica de descelularización para generar nuevos andamiajes que promocionaban la osteoinducción en MSCs (118). A su vez, otro grupo utilizó matriz mineralizada descelularizada de osteoblastos humanos para crear modelos *in vitro* de cáncer de próstata 3D, donde se evidenció la presencia de osteocalcina, osteonectina y osteopontina, tres proteínas de MEC ósea que pueden ser un factor relevante para imitar la fisiopatología de la metástasis ósea (119).

Los andamios celulares óseos sintéticos disponibles aún no han demostrado una formación ósea adecuada en la clínica y carecen del microambiente que imite las cualidades del hueso nativo. Es por esto que los materiales biológicos todavía se consideran los más efectivos y los más ampliamente utilizados como alternativa para simular la MEC ósea (120). Para obtener una MEC ósea con las cualidades innatas del hueso se pueden emplear tecnologías de descelularización para eliminar todas las células y los componentes inmunogénicos (121), obteniéndose una MEC con las propiedades microambientales del tejido nativo (122). En primer lugar, se debe obtener una MEC ósea biocompatible y con ausencia de contaminantes biológicos. Los métodos de esterilización por lavado múltiple constituyen un nuevo método de limpieza que utilizan centrifugación mecánica para eliminar físicamente la médula ósea y lavados químicos para esterilizar la matriz, desnaturalizar ADN, partículas virales y proteínas solubles, lo que causa la “descelularización” del material (122, 123). Estos métodos a menudo incluyen una gran cantidad de detergentes químicos, enjuagues y potentes

agentes oxidantes (124). Lavados simples de hueso congelado han demostrado una mejora en la biocompatibilidad (125). Además, se ha demostrado que estas técnicas de lavado compuesto disminuyen los agentes infecciosos virales y bacterianos, ya que al eliminar el tejido blando permite que la acción de agentes químicos destruya los componentes biológicos remanentes. El método de esterilización por ácido acético, paso de la descelularización ósea propuesta, ha demostrado ser eficiente en eliminar todos los virus y bacterias en pruebas de carga bacteriana o “bioburden” (126). Además, los resultados de varios estudios que utilizan estos productos químicos en los métodos de lavado no han registrado ninguna alteración en la biocompatibilidad, la capacidad osteoinductora o las propiedades mecánicas del hueso (127-130) y, por lo tanto, sugieren que la esterilización química es menos dañina que la radiación gamma (131, 132).

Existe un tipo de procesamiento de tejido óseo para la producción de andamiajes celulares de forma que puedan imitar de mejor manera la ECM. Este proceso conocido como descelularización genera una conservación estructural del tejido procesado, que lo hace biocompatible y le permite soportar la adhesión y proliferación celular (118) (133). Inicialmente se comenzó a producir desde tejidos biológicos de tejidos blandos, tales como intestino delgado porcino, hígado y tejido cardíaco entre otros. Más tarde, este concepto fue aplicado al tejido óseo, el cual confirmó sus propiedades de biocompatibilidad y osteoinductividad (118), cumpliendo así con los criterios de un andamiaje de MEC óseo. La técnica de descelularización ósea como complemento al tejido óseo donado comenzó alrededor del año 2000 (Yorkshire Regional Tissue Bank, National Blood Service) (134), donde se evidenció la capacidad de remoción de proteínas y hemoglobina en un 98% tras un proceso de dos días. Este protocolo fue modificado y perfeccionado, por la NHS Blood and Transplant Tissue Services, con la adición de etapas logrando una eliminación 99.85% de proteínas, 99.95% de ADN y 100% de hemoglobina, demostrando también una excelente biocompatibilidad y ausencia de crecimiento bacteriano (135). Posteriormente, se realizó una caracterización del injerto óseo

descelularizado cultivado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, demostrando potencial de generar una osteodiferenciación de las células madre (118), confirmando la capacidad osteodiferenciadora del andamio para estrategias de bioingeniería ósea.

Actualmente, un diseño de un nuevo andamiaje óseo requiere no solo de las capacidades de biocompatibilidad para su utilización acorde a las últimas tendencias biotecnológicas y biomédicas, sino que también de capacidades de funcionamiento para análisis de alto rendimiento que requieren de propiedades biomecánicas acorde a su mecánica de fluidos para poder ser inyectada. Esta capacidad pseudoplástica de fluir ante presión y recuperación de su estructura una vez terminada la aplicación de la fuerza permiten su integración a sistemas de bioimpresión y cultivos en sistemas microfisiológicos o llamados órgano en un chip (*organ-on-chip*, OOC). Con estos antecedentes, sería lógico diseñar un hidrogel compuesto en base a un polímero de alta retención de agua y que por sus características biológicas presente adhesiones celulares en conjunto con una MEC ósea descelsularizada y microparticulada a modo de poder fluir y después ser el soporte para el crecimiento de un tejido artificial a modo de biofabricación dentro del campo científico de la bioingeniería.

4.6.- Las patologías óseas

La matriz ósea es un tejido dinámico capaz de producir diferentes tipos de estructuras óseas con modificaciones en la longitud cortical y medular, minerales, densidad celular y fases de actividad biológica dependiendo de las características ambientales e individuales (37). Con el proceso de envejecimiento, los cambios en la MEC ósea causan y mantienen varias enfermedades con implicaciones locales profundas que pueden causar fragilidad y fracturas óseas, siendo la fractura femoral altamente asociada a la edad (46-50). Además, existen varias patologías óseas comunes (47-53) que han reportado cambios en la MEC con implicación

clínica, tal es el caso de la metástasis ósea secundaria de cáncer de mama y próstata que usualmente se caracterizan por un estado alterado y aumentado del proceso de remodelación ósea con una pérdida ósea reemplazada por células tumorales malignas aumentando las probabilidades de fracturas patológicas, entre ellas.

Los tumores tienen múltiples efectos sobre el tejido óseo, todos ellos mediados por células tumorales que alteran el comportamiento de las células óseas y causan interrupciones en el proceso normal de remodelación ósea. Estos efectos sobre las células óseas son causados por el aumento de la producción de péptidos desde los tumores, algunos de los cuales actúan a corta distancia y otros a larga distancia (factores sistémicos u hormonales), que posteriormente modulan la actividad de las células óseas(136). Es posible que las células tumorales también interactúen directamente con las células óseas por contacto célula-célula, o directamente con la matriz ósea mineralizada sin la intervención de las células óseas, pero la importancia biológica o clínica de estos efectos aún no está clara (37).

4.7.- Modelos óseos *in vitro*

Las células y los tejidos pueden estudiarse para la regeneración tisular, la medicina de precisión y los nuevos biomarcadores para adquirir nuevos y mejorados modelos preclínicos que se asemejen a la biología humana. La reproducibilidad de los modelos *in vitro* mediante ingeniería tisular es un avance importante que puede permitir una mejor tasa de éxito en el desarrollo farmacéutico y los diagnósticos *in vitro* (137-139). Por lo tanto, la fuente celular seleccionada debe comportarse como en el cuerpo humano, y es necesario proporcionar las señales mecánicas apropiadas de la MEC para lograr la reproducibilidad crítica de los experimentos *in vivo*. El grupo de Bissell en la década de 1980 estableció la importancia de los componentes de la MEC en el comportamiento celular y hoy en día es bien sabido que el cultivo celular 3D imita el tejido de una manera que es mucho más representativa del entorno *in vivo* que los cultivos 2D tradicionales (140, 141). Aunque el método estándar sigue siendo

el más utilizado para los ensayos HTS, el cultivo celular 3D se está empleando cada vez más (142-145). Los protocolos que involucran cultivos celulares en 3D permiten la formación de tejidos multicelulares con mejores interacciones célula-célula y célula-ECM que pueden imitar los procesos fisiológicos de expansión, función y diferenciación tisular. El uso de modelos celulares en 3D para el estudio de la progresión de enfermedades *in vitro* es particularmente útil cuando existen organizaciones tisulares anormales con cambios en la composición de la ECM (p. ej. fibrosis, cánceres sólidos u osteoporosis) (146-148). Por ejemplo, hay cambios morfológicos importantes que ocurren cuando las células (tanto primarias como de líneas celulares) se cultivan en 2D vs. 3D (149) y cuando se utilizan diferentes andamiajes 3D para imitar la MEC. Estos pueden resultar en varias vías moleculares modificadas con impacto en la osteoconductividad y la capacidad de mineralización (150).

Un modelo ideal de cultivo celular en 3D es aquel que genera un microambiente fisiológico y/o patofisiológico de un tejido específico adaptado a una enfermedad específica y, por lo tanto, permite que las células proliferen, se agreguen y se diferencien de una manera específica para su nicho. Estos modelos en 3D permiten interacciones célula-célula-ECM, otorgando una rigidez específica con gradientes de oxígeno, nutrientes y desechos metabólicos típicos del tejido a estudiar (151). Cuando se utilizan organizaciones "esferoides" sin andamiaje, no cumplen los criterios de una ECM sin imitar la polaridad específica de la célula y el tejido, pero pueden desarrollar gradientes metabólicos que crean poblaciones celulares heterogéneas con interacciones célula a célula, y son más fáciles de producir y manipular para HTS. Este enfoque de fácil manejo se ha empleado para estudios de desarrollo óseo (152, 153) y curación ósea, especialmente cuando se utilizan células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en un entorno de co-cultivo, (154-157) demostrando una plataforma útil para replicar procesos fisiológicos. A diferencia de los modelos 3D con andamios u "organoides" que imitan mejor las condiciones *in vivo* gracias al uso de un biomaterial o andamio donde se encapsulan las células, proporcionando un microambiente

adecuado para su polaridad, migración, crecimiento e interacción para lograr mini-órganos o mini-tejidos.

4.8.- El cultivo Celular 3D

Durante años, el cultivo celular en 3D se centró en el uso de hidrogeles derivados de extracciones de membrana basal de origen animal (p. ej. Matrigel derivado de células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm), lo que permite el crecimiento de células que de otro modo serían difíciles de cultivar, como las células primarias. Aunque tienen propiedades relativamente estables, tienen una composición muy variable de lote a lote, lo que dificulta la reproducibilidad de los ensayos y, a menudo, los hace inestables (158). Para superar este obstáculo, se propusieron biomateriales sintéticos como una solución para la reproducibilidad precisa de lote a lote y la posible personalización (159). Sin embargo, la mayoría de los andamios puramente sintéticos carecen de proteínas ECM, lo que limita la relevancia fisiológica de los sustratos de un solo componente sintético a nivel de anclaje e interacción celular (18). Las células cultivadas en hidrogeles inertes o andamios puramente sintéticos pueden crecer con baja adherencia, y lo hacen a través de la secreción de proteínas ECM endógenas o debido a mutaciones oncogénicas que confieren independencia de anclaje (160). Por lo tanto, la estrategia de utilizar matrices híbridas que combinan biomateriales sintéticos y orgánicos para mejorar la adhesión celular y los estímulos mecánicos se ha expandido (161, 162), así como el uso de estas plataformas con diferentes tipos de células como osteoblastos y células osteoprogenitoras que sintetizan nueva MEC (163-165).

En general, las estrategias de cultivo celular 3D para diseñar nuevos modelos preclínicos relacionados con el hueso deben considerar los desafíos asociados con los altos costos de los biomateriales de andamiaje (p. ej. Matrigel) (166), ensayos que requieren penetración e interacciones de marcadores en el gel (p. ej. tinción de anticuerpos), ajustes en la viscosidad y gelificación que es sensible a la temperatura causando dificultades en el manejo

automatizado para HTS (167, 168). Sin embargo, la integración de diferentes estrategias de diseño complementadas con HTS y tecnologías de automatización (p. ej. bioimpresión y manejo de líquidos instrumentado) pueden generar ensayos mejorados con mayor reproducibilidad y similitud fisiológica (169-171).

4.9.- Modelos avanzados de cáncer óseo *in vitro*

El tejido óseo es uno de los sitios de metástasis tumorales más comunes, especialmente en el cáncer de mama, próstata y pulmón. Entre estos, el 65-75% de los pacientes con metástasis de mama y próstata pueden presentar lesiones esqueléticas, ya que ambos representan más del 80% de todos los casos de enfermedad ósea metastásica (172). Por lo tanto, la metástasis del cáncer es uno de los mayores desafíos en la investigación del cáncer, ya que es un proceso que se ve alterado por múltiples factores, como las células del estroma, la MEC y las propias células tumorales (173).

Hasta la fecha, los modelos tradicionales de metástasis óseas de cáncer *in vitro* contienen limitaciones inherentes en cuanto a la reproducibilidad y adaptabilidad de diseño. Si bien los modelos de cultivo celular 2D convencionales han proporcionado una mejor comprensión de la capacidad de las células tumorales para crecer, no pueden proporcionar información fidedigna sobre las interacciones complejas entre las células cancerosas y el entorno fisicoquímico que existe dentro del entorno tumoral (174). Dichas limitaciones pueden generar datos menos confiables, lo que conduce a restricciones para la traslación clínica. La generación de nuevos modelos *in vitro* basados en cultivos celulares 3D se encuentra entre la convergencia de la patología y la ingeniería de tejidos al proporcionar una alternativa importante a las limitaciones del cultivo 2D (175). Desde que surgieron los avances en las técnicas de cultivo en la ingeniería de tejidos, se han propuesto varios métodos de cultivo celular 3D (176, 177) con el empleo de varios biomateriales que se destinaron en un principio

para la medicina regenerativa de cartílago y/o hueso (178-180) también se han utilizado para cultivar células cancerosas (181, 182).

Actualmente, se le ha otorgado un mayor énfasis a los andamios celulares en base a hidrogeles, estos andamios son redes poliméricas hidrófilos que imitan de cerca las propiedades de los tejidos en sus propiedades viscoelásticas. Pueden estar hechos de polímeros naturales (como ácido hialurónico, colágeno, seda, alginato o quitosano), polímeros sintéticos o una combinación de ambos (183). También pueden reforzarse con otros materiales, tales como micropartículas para mejorar su resistencia (184). Los hidrogeles se han utilizado ampliamente para investigar la formación de tumores debido a sus propiedades biofísicas y mecánicas fácilmente ajustables, facilidad de síntesis y reproducibilidad. Por ejemplo, Jeon et al. (185) desarrollaron un modelo que permite el estudio de la extravasación de células de cáncer de mama metastásico humano utilizando andamios en base a solución de fibrinógeno para crear un gel de fibrina. Houshmand y col (186) cultivaron células leucémicas en un dispositivo microfluídico 3D en base a hueso desmineralizado en geles de colágeno demostrando una tasa de proliferación significativamente mayor en condiciones de cultivo 3D en comparación con el cultivo 2D. Ahn et al. (173) cultivaron células tumorales en un compuesto óseo mimético tridimensional de hidroxiapatita y fibrina. Otros grupos también han utilizado plataformas de hidrogeles como Matrigel (187, 188) para evaluar características de la metástasis óseas del cáncer de mama.

En 2014, Bersini et al. (187) realizaron un enfoque temprano para estudiar la metástasis del cáncer, uno de los primeros modelos OOC utilizando una matriz ósea compuesta de Matrigel más ECM depositada por BM-MSC diferenciadas osteogénicas (es decir, demostrado por tinción con rojo de alizarina de la deposición de calcio en Matrigel®). Analizaron la migración/extravasación transendotelial de células de cáncer de mama altamente metastásicas (línea celular triple negativa) desde los canales endoteliales hacia la matriz ósea. Esta extravasación se vio potenciada por la presencia de osteoblastos en comparación con

los controles solo con andamiaje, lo que demostró los principales roles del receptor de células de cáncer de mama CXCR2 y la quimiocina secretada por el hueso CXCL5 y dilucidó una interacción específica entre células cancerosas y células óseas. Aunque el modelo carecía de perfusión, fue un punto de partida para el modelado de metástasis en ECM similar al hueso. A continuación, para evaluar las células cancerosas en un modelo óseo perfundido, se observó que la estimulación mecánica puede disminuir la osteólisis inducida por metástasis de las células de cáncer de mama en un modelo *in vitro* desarrollado por Marturano-Kruit et al. en el año 2018 (189). Este grupo informó una disminución de 4 veces en la tasa de crecimiento de células de cáncer de mama en cultivos 3D bajo perfusión. Además, también encontraron que el flujo intersticial fisiológico causó una disminución en la colonización del nicho del cáncer después de una optimización de las velocidades del flujo intersticial y las fuerzas de corte con la ayuda de la dinámica de fluidos computacional. Se han encontrado asociaciones entre un mayor estímulo mecánico y su efecto en el pronóstico del cáncer, tanto a nivel animal en los experimentos *in vivo* y también clínicos con algunos subtipos moleculares de cáncer de mama (190). Este resultado es de alguna manera contrario al de Verbruggen et al. (172), donde los autores evaluaron la influencia de la carga mecánica en la forma de imitar el ejercicio físico de carga y sus efectos sobre los osteocitos. Demostraron que el medio condicionado derivado de la señalización paracrina de los osteocitos generalmente inhibe el crecimiento de tumores de cáncer de mama metastásico, la misma línea celular triple negativa que en el estudio anterior, aunque después de la carga mecánica (i.e. flujo de fluido oscilatorio) provocó una mayor invasión de células de cáncer de mama y próstata. Estos dos ejemplos abren el camino para que los estudios OOC exploren factores *in vivo* críticos, como el impacto de los estímulos mecánicos en la metástasis ósea del cáncer de mama.

En la perspectiva de asemejar el hueso con el andamio de la MEC y cómo afecta el comportamiento de las células cancerosas, Ahn et al. destacaron la importancia de la rigidez de la matriz en la respuesta celular del cáncer cuando se emplean células OOC (173).

Evaluaron dos líneas de células cancerosas (SW620 y MKN72) que pueden hacer metástasis en el hueso, y las cultivaron en una serie de compuestos de HA/fibrina. El mayor porcentaje de HA resultó en un aumento en la rigidez del andamio, que posteriormente ha causado una respuesta inhibitoria en la migración de células cancerosas. Esta asociación también se observó con esferoides de células tumorales-estromales vascularizadas, lo que destaca la relevancia del diseño del andamio en los efectos de los modelos de células de cáncer óseo. Housemand et al. apuntaron a imitar el nicho de la médula ósea para estudiar la leucemia mieloide aguda mediante la aplicación de un compuesto hecho de aloinjerto esponjoso de matriz ósea desmineralizada recubierto con colágeno tipo I (186). Esta plataforma permitió la detección *in vitro* de fármacos relevantes como la citarabina y la azacitidina en líneas celulares derivadas de la médula ósea eritroleucémica (TF-1), lo que estableció un sistema sólido para comparar los efectos de diferentes fármacos y estudiar el comportamiento de las células cancerosas. También demostró que el uso de un nicho 3D puede influir significativamente en la capacidad de resistencia a fármacos de las células cancerosas eritroleucémicas.

En general, varios de los estudios para la generación de modelos óseos se basan en hidrogeles compuestos con alguna adición del componente óseo, ya sea con hueso desmineralizado o con sustitutos óseos como la hidroxiapatita y/o fosfato tricálcico. Sin embargo, estos no poseen las mismas características del hueso humano, por lo que aún es deseable el desarrollo de un nuevo enfoque de hidrogel en base a conceptos biomiméticos que puedan generar las mismas interacciones fisiológicas célula-MEC del *in vivo*.

V. METOLOGÍA

5.1 Procesamiento de hueso humano

5.1.1 Descelularización ósea

Este estudio fue aprobado por el Comité Científico Ético del Servicio Salud Concepción. Los huesos fueron donados por pacientes del Hospital de Traumatología de Concepción de Chile bajo consentimiento informado y almacenados en refrigeración a -80°C hasta su uso. Para el procesamiento se aplicó el protocolo descrito por Smith et al. (118). Brevemente, las cabezas femorales se descongelaron gradualmente hasta que alcanzaron 25°C y posteriormente se cortaron a la mitad y posteriormente en trozos más pequeños y se separó la cortical del hueso medular para establecer dos tipos de andamiajes óseos. Los trozos de hueso se sumergieron en agua destilada (estéril) precalentada a 60°C y se sonicaron durante 15 min. Posteriormente, se lavaron en 300 ml de agua destilada precalentada a 60°C y se mantuvieron en un agitador orbital a 200 rpm durante 5 min. Las muestras se lavaron en 3 etapas, cada una seguida de una centrifugación a 1850 g/15 min a 25°C. Para la esterilización, las muestras se sonicaron durante 10 min a 60 °C en 300 ml con la solución esterilizante que contenía peróxido de hidrógeno al 3% v/v y ácido peroxiacético al 0,02%. Posteriormente, el hueso se transfirió a 300 ml de etanol al 70% v/v en agua destilada y se sonicó durante 10 min a 21°C. Se realizó un lavado final dos veces en 300 ml de agua destilada y agitación a 200 rpm durante 10 min a 60 °C para una centrifugación final a 1850 g/15 min a 25°C.

5.1.2 Procesamiento del hueso

Una vez descelularizado el hueso se procesó mecánicamente para obtener micropartículas descelularizadas óseas (DBMP). Para ello, los trozos de hueso fresados con Titanium Bone Crincher (Salvin), ya sea medular o cortical, se depositaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en la solución esterilizante y se molieron con el homogeneizador OV5 (VELP Scientifica) hasta obtener una solución homogénea de color blanco. Posteriormente, la

solución se centrifugó a 1850g/15 min a 25°C, se retiró la solución y se realizaron dos lavados en 300 ml de agua destilada a 25°C y agitación a 200 rpm durante 10 min. y se realizó una centrifugación a 1850g/15 min a 25°C para la eliminación bruta de agua. Finalmente, el hueso se liofilizó durante 48 h, se pasó por un tamiz de 200 µm, se pesó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

5.1.3 Análisis de descelularización

Se evaluaron muestras en busca de contaminantes medulares inmunogénicos, para esto se realizaron análisis cuantitativos de contenido de proteínas y ARN. Para cuantificar el ARN presente en las etapas de centrifugación del protocolo, primero se depositó 300ul de reactivo Trizol por muestra en tubos eppendorf, después se combinó con cloroformo 60 ul, se agito 10 veces y se esperó 5 min. Las muestras fueron trasladadas a centrifugación a 12.000 g por 15 min. a 4°C. Esto generó la separación en dos fases (acuosa superior y orgánica inferior), se tomaron muestras de 60 ul y se depositaron en un tubo eppendorf. A continuación, las muestras se combinaron con 150 ul de isopropanol y se dejaron 10 min a 4°C en hielo para después centrifugar 12.000 g por 10 min, se removió el líquido y se agregó etanol 75% para realizar una nueva centrifugación a 7.500 g por 5 min a 4°C. Posteriormente, se removió el etanol y se dejan los tubos secando de manera invertida por 8 min en ambiente. Finalmente, se resuspendió el pellet en 20 µl de agua de grado molecular y se dejaron las muestras en hielo hasta su medición y cuantificación de ácidos nucleicos por el espectofotómetro (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader). Además, se realizó una corrida de ARN en gel de agarosa para confirmar integridad y calidad del ARN y su disminución en las etapas de descelularización.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de Bradford, realizado de acuerdo con el protocolo del fabricante. Primero, se preparó una solución madre de BSA (albúmina de suero bovino) (2000 mg/ml) disolviendo 2000 mg de BSA (A9418; Sigma-Aldrich)

en 1 ml de dH₂O, y se utilizó una dilución en serie para crear una curva estándar de alta concentración de ocho puntos con valores de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 7,81 mg/ml (concentración correcta después de la adición del reactivo de Bradford). Las muestras se diluyeron según fuera necesario utilizando dH₂O. Se cargó una alícuota de 50 µl de cada muestra por triplicado en una placa de incubación transparente de 96 pocillos (3860-096 (Iwaki); Thermo Scientific, Hemel Hempstead, Reino Unido) antes de añadir 50 µl de reactivo de Bradford a todos los pocillos. A continuación, las placas se incubaron durante cinco min a 21 °C antes de leerlas a 595 nm (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader). Se elaboró una curva estándar y se utilizó la ecuación de su línea de tendencia para convertir los datos brutos en valores de proteína en mg/ml.

5.2 Preparación de hidrogel compuesto

Para obtener lotes de 10 p/v% de GelMA, los hidrogeles se prepararon disolviendo 1 g de GelMA liofilizado (60 grados de sustitución, Sigma-Aldrich) en 9,5 ml de agua desionizada a 50°C bajo agitación magnética. Posteriormente, las soluciones se enfriaron a 37°C y se agregó 0,5% de fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP, sigma-Aldrich). Las soluciones se mantuvieron a 37°C hasta que se filtraron de manera estéril con un filtro de membrana de 0,22 CA. Para producir geles óseos (BG), se agregó DBMP al hidrogel para alcanzar 1% p/v. En primer lugar, las micropartículas se descongelaron en la cabina de seguridad y se añadió una solución de alcohol polivinílico al 15% (Sigma-Aldrich, código P8136-250G) a la cantidad de hueso para hacer un 1%, se agitó en vórtex durante 20 s y posteriormente se centrifugó a 500 g x 5 min para eliminar el exceso de polímero dejando el hueso cubierto y posteriormente se combinó con la solución GelMA.

5.3 Caracterización fisicoquímica

5.3.1 Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras, hueso descelularizado donado por humanos, GelMA y BG, se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) utilizando un espectrofotómetro Nicolet Nexus. Para la preparación de los pellets, la muestra se mezcló con bromuro de potasio (KBr) en una proporción aproximada de 1-2% en peso. La mezcla resultante se prensó a 8-10 toneladas para formar discos transparentes y homogéneos. Durante el proceso de preparación y medición, se controló la exposición a la humedad para evitar la absorción de agua por parte del KBr, que podría interferir con los resultados espectrales. Los espectros se registraron en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , y cada muestra se escaneó 64 veces para mejorar la relación señal-ruido.

5.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micropartículas óseas descelularizadas y los hidrogeles se depositaron en placas de 96 pocillos y posteriormente se liofilizaron para obtener imágenes de la superficie y del interior mediante SEM (VEGA3 EASYPROBE SBU, TESCAN) y microscopía SEM/EDS (ZEISS GeminiSEM 360). Los hidrogeles se cortaron en trozos pequeños (aproximadamente 6 mm de diámetro) y se depositó una fina capa conductora de oro (10 nm) sobre los hidrogeles secos utilizando un pulverizador catódico. Además, se realizó una fractura en los hidrogeles sumergiendo las esponjas en nitrógeno líquido y posteriormente se trituraron para evaluar su interior. Se tomaron fotografías de las vistas de la superficie y las vistas transversales de los hidrogeles mediante el software SmartSEM

5.3.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se dejaron los hidrogeles en medio MEMA 5x el peso del hidrogel en tubos Falcon de 50 ml, se dejaron bajo agitación orbital por 72 h a 200 rpm a 37°C. Posteriormente, se recogió

el medio y se pasó por un filtro 0,22 μm y se depositó la muestra en tubos de centrifugación con con etanol absoluto en una relación 1:10 resp. Las muestras fueron analizadas por TEM utilizando un microscopio JEM1200 E (JEOL, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 200 kV. Se prepararon las muestras colocando una gota de cada muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono de 200 mallas.

5.3.4 Test de hinchamiento

Las muestras de hidrogel (100 μL) se fotopolimerizaron en placas de 12 pocillos y se añadió 1 ml de medio estándar. Las muestras se incubaron a 37 °C durante diferentes días y se retiró el medio y se pesó el peso hinchado (W_{wet}) de la muestra de hidrogel. Posteriormente, las muestras se congelaron a -80 °C, se liofilizaron y se registró el peso seco (W_{dry}). La relación de hinchamiento se calculó como $W_{\text{wet}}/W_{\text{dry}}$.

5.3.5 Caracterización reológica

Las propiedades reológicas de los hidrogeles compuestos se probaron incubando muestras de hidrogel en intervalos de diferentes días utilizando un reómetro (TA Instrument, DHR-3, EE. UU.). Los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') se determinaron realizando barridos de deformación oscilatoria utilizando placas paralelas con una geometría de 8 mm y un rango de deformación de 0,01% a 500% a 37 °C.

5.4 Test de impresión 3D de microextrusión

Para evaluar el potencial de sistematización de ensayos con el hidrogel y para validar su reproductibilidad, se realizó una prueba de impresión 3D con bioimpresora (GENESYS™, 3D Biotechnology Solutions) acoplada con luz UV 365 nm utilizando el hidrogel GelMA y compuesto BG en jeringas de 3 ml con punta roma para jeringa lock 23G 1,5''. El primero paso es la calibración de la cama de impresión donde va insertada la placa, se puso un nivel para

asegurar que se encuentre nivelada y se deja el posicionador de placa de cultivo. Posteriormente, se conecta el PC con la impresora 3D y se inicia el open-source software Pronterface (GNU General Public License, v.3), para asegurar una impresión precisa, se debe llevar el extrusor a la posición "Home". Se prepararon 2 jeringas con hidrogel GelMA y compuesto BG calentando los hidrogeles termoregulado a 37°C y después esperando su enfriamiento a 25°C. Después, se ingresaron las jeringas en la extrusora de calor (izquierda) con su respectivo soporte, ajuste girando la jeringa en la ranura del soporte y posicionamiento mediante el cierre del extrusor y apriete del calentador. Se ajusta la jeringa en sentido inferior a la posición de impresión mediante la rosca del soporte llegando al borde de la cama. Una vez firme la aguja y con una leve separación (1/2 mm), se ajusta el extrusor con ayuda de los controles "Extrude" y "Reverse" donde posteriormente se realizó una prueba de extrusión para comprobar el flujo del material. Confirmado el ajuste de la jeringa y salida de hidrogel, se debe cargar el archivo ".gcode" del diseño de 4 discos en la pantalla de simulación del software y se ingresó la placa de cultivo 24 pocillos en el soporte para placas de la cama. Se visualizaron las impresiones en microscopía óptica directa (OLYMPUS BX43F, Tokyo, Japan)

5.5 Cultivo celular

5.5.1. Células MCF7 y Saos2

Las células de cáncer de mama humano triple positivo (MCF7) y las células de osteosarcoma humano (Saos2) se cultivaron en medio estándar; compuesto por MEM α (DMEM, LZBE12-604Q, Gibco™) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, 10270106, Gibco), solución antibiótica/antimicótica al 1 % (15070-063, Gibco) y ácido ascórbico (H0887, Sigma Aldrich). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C con 5 % de CO₂. Al 70-90 % de confluencia, se recolectaron las células hasta el pase y se combinaron en hidrogel para experimentos posteriores. El Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad aprobó los protocolos de bioseguridad del estudio.

5.5.2. Cultivo Primario de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Para la obtención de MSCs derivados de tejido adiposo, se trasladará con un tubo Falcon 50ml con HBSS, combinación antibiótica/antimicótica. Posteriormente se debe picar la grasa y remover todo tejido fibroso manualmente con bisturí y trasladar a tubo Falcon de 50 ml con 15 ml de solución de colagenasa (2mg/ml de colagenasa tipo I y 2mM de cloruro de calcio pasado por filtrado estéril) e incubar en agitación a 37°C por 2 h. Después se debe pasar la solución por filtro de 70µm y neutralizar con 15ml de medio estándar para después centrifugar a 500g por 5 min. Posteriormente se debe aspirar el sobrenadante dejando 5ml y se añade 7ml de medio estándar para ser cultivados en frasco de cultivo celular y se cambiará el medio a los 5 días, finalmente se dejarán expandirse hasta llegar a confluencia entre 70-90% en frascos de cultivo celular de 75cm² a 37°C al 5% CO₂. La proliferación celular fue analizada diariamente en microscopio óptico invertido (Motic, AE2000TRI). Se realizó la confirmación del potencial multipotente (madre) de las MSC derivadas del tejido adiposo de acuerdo con las recomendaciones realizadas por la “International Society for Cellular Therapy (ISCT)”⁸⁹. Se realizó un ensayo de citometría de flujo (BD LSRFortessa™ X-20) después de que las células alcanzaron el 70-80% de confluencia en el tercer pase para el perfil de marcadores de antígenos específicos de las MSC con el “BD Stemflow™ hMSC Analysis Kit” (BD Biosciences) para cócteles de anticuerpos conjugados con fluorescencia positivos (CD90-FITC, CD44-PE, CD105-PerCP-Cy5.5 y CD73-APC) y negativos (CD45/CD34/CD11b/CD19/HLA-DR-PE). El perfil de CD se analizó con el software FlowJo V.10.

5.6 Evaluación de biocompatibilidad

5.6.1. Evaluación de toxicidad *in vitro* mediante tinción de Calceína AM etidio homodimero-1.

Se evaluó la viabilidad de las células en la superficie del andamio, se cultivaron los andamios en diferentes intervalos de días. Para la tinción de las células, se lavaron en PBS y posteriormente se incubaron durante 30 min en la oscuridad con solución LIVE/DEAD (Cat N° L3224, ThermoFisher Scientific) en PBS que consiste en 0,2% de homodímero de etidio-2 (EthD-1) y 0,05% de acetoximetil calceína (calceína AM). El análisis se realizó mediante un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX43 Fluorescence Light Source Olympus U-LH100HG) donde las células vivas se marcan en verde con calceína AM, fluorescencia verde de excitación/emisión ~495 nm/~515 nm, y las células muertas permiten que el homodímero de etidio-1 EthD-1 tenga una fluorescencia roja brillante en las células muertas (excitación/emisión ~495 nm/~635 nm) para unirse al ADN en los núcleos marcados en rojo. Además, la fluorescencia de calceína AM se midió en el espectrofotómetro Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader y el porcentaje de reducción se calculó según la siguiente fórmula: $((\text{valor del experimento} - \text{control negativo}) / (\text{control positivo} - \text{control negativo})) * 100$. Las imágenes planares se procesaron con el software ImageJ (Fiji).

5.6.2 Evaluación de viabilidad *in vitro* mediante ensayo con medio condicionado

Se realizó un ensayo de biocompatibilidad de tres líneas celulares con el medio condicionado obtenido según descripción del punto 2.3.3, se fabricaron dos hidrogeles con DBMP según hueso cortical y otro con medular para realizar el ensayo según el *ISO 10993-5: "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Se cultivaron líneas celulares en placas de 96 pocillos por 48 h, para posteriormente hacer un recambio del medio por el medio condicionado obtenido previamente, dejando los hidrogeles en incubación por 48 h en agitación constante, filtrado 0,2 µm del medio condicionado y precalentado a 37°C.

Una vez cumplido el tiempo de incubación, se tomaron muestras y se analizó la viabilidad celular versus control (sin recambio de medio) de los medios condicionados de GelMA y BG en el cultivo celular a las 24 y 48 h.

El análisis cuantitativo de viabilidad celular se obtuvo con solución alamarBlue™ (Cat N° DAL1025, Invitrogen) al 5% en condiciones de oscuridad para incubar durante 2,5 h a 37 °C, 5% CO₂. Posteriormente, se pasaron muestras de 100 µL del medio de cada muestra y solución de trabajo (control) a una placa de 96 pocillos por triplicado para la detección de fluorescencia de la actividad celular (excitación 360/40nm, emisión 460/40nm) con el lector de microplacas multimodo Synergy™ HTX.

5.6.3 Morfología de los constructos por histología

Después del intervalo de los diferentes días, las muestras se fijaron con formalina al 4% durante un mínimo de 3 h. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en un casete y etiquetadas entre dos esponjas de biopsia para posteriormente descalcificarlas utilizando el KOS Microwave HistoStation (Biosystems Switzerland AG) durante 16 h a 37°C con agitación constante. El casete fue transferido al procesador de tejidos LEICA ASP300 y se dejó en formalina en stand-by hasta que comenzaron los siguientes pasos consecutivos de vacío: primero los pasos de alcohol (6 fases) durante 1 hora cada fase, 3 fases en solución HistoClear (National diagnostics), 3 fases en parafina durante 1 hora a 60°C. Posteriormente, las muestras fueron incluidas en cera al equipo ThermoFisher HistoStar para agregar, que posteriormente fue enfriada para generar los cortes en el micrótopo Thermo HM325 de 3 µm de espesor. Las secciones se dejaron en baño maría a 45°C y se montaron en portaobjetos que se llevaron al equipo de tinción DAKO CoverStainer (Agilent Technologies) para los siguientes pasos consecutivos: secado a 65°C durante 15 min, desparafinación con HistoClair, deshidratación con etanol, hidratación con agua, tinción con hematoxilina, lavado con agua, azulado, lavado, tinción con eosina, deshidratación con etanol, enjuague con HistoClair y finalmente montaje y

visualización al microscopio óptico (OLYMPUS BX43F, Tokio, Japón). Las imágenes planares se procesaron con el software ImageJ (Fiji).

5.6.4. Tinción con rojo de alizarina

La tinción con rojo de alizarina se utilizó para determinar visualmente el estado de mineralización de los constructos después del cultivo en medio estándar. Los constructos de tejido se fijaron en formalina tamponada neutra al 4% durante un mínimo de una hora, posteriormente se lavaron tres veces en PBS y se enjuagaron en agua para eliminar todos los restos de fijador. Los constructos fijados se incubaron en la solución de rojo de alizarina (código 2003999, Merck EMD Millipore Corp. EE. UU.) durante un minuto. La solución se retiró y se enjuagó bien con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, posteriormente se secó al aire. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio óptico (OLYMPUS BX43F, Tokio, Japón). Las imágenes planares se procesaron con el software ImageJ (Fiji).

5.6.5 Microscopía confocal

La microscopía de fluorescencia se realizó en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA-BioBio) de la Universidad de Concepción. Las muestras de cultivo 3D se fijaron con paraformaldehído al 4% y se dejaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, las muestras se lavaron en solución salina tamponada con Triton X-100 1x (TERGITOL15-s-9) al 0,1% (Tris 20 mM, pH aprox. 7,4 y NaCl 0,9%), se lavaron en Tris 1x y se hidrataron con albúmina al 1% en Tris durante 30 min a 25°C para bloquear los sitios antigénicos no específicos. A continuación, las muestras se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfatasa alcalina IgG2A (código sc-271431, Santa Cruz Biotechnology) durante 4 h a 25°C y 2 h con anticuerpo secundario (AffiniPure™ Donkey Anti-Mouse IgG, H+L, código: 715-165-150, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.). A continuación, las muestras se incubaron con Alexa

Fluor 488-phalloidin en 1% BSA durante 30 min a 25°C. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces en Tris, se aplicó DAPI y un paso final de lavado con Tris.

Para adquirir fluorescencia multicanal, se empleó un microscopio confocal LSM780 NLO (Axio Observer.Z1; CarlZeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con el software ZEN 2011 v8.0 (Carl Zeiss). Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron con láseres de excitación de 405 nm (Hoechst), 561 nm (rojo de alizarina) y con objetivos EC Plan-Neofluar 20x NA 0.5, WD 2.0mm o Plan-Apochromat 63x oil DIC, NA 1.4, WD 0.19mm. Para obtener las reconstrucciones tridimensionales y los videos que se muestran en la Información complementaria, utilizamos la herramienta de animación del software Imaris (Bitplane, Zurich, Suiza). Las imágenes planares se procesaron con el software ImageJ (Fiji).

5.7.- Inmunofluorescencia

Es conocido que algunos tipos celulares tienen la capacidad de síntesis de MEC calcificada, tales como las líneas derivadas de células madre mesenquimales diferenciadas a osteoblastos y osteosarcoma. Por lo que se emplearon ambas para un ensayo de osteodiferenciación y cultivo a 30 días con medio osteogénico (OST) (Tabla 2) en monocapa en placas de 6 pocillos dejando el primer pocillo de ambos tipos celulares cultivados con medio estándar. El medio se cambió cada 2-3 días. Posteriormente cumplido los días de cultivo, se realizó una tinción con Alizarin red.

Tabla 2. Medio osteogénico

Reactivo	Cantidad añadida	Concentración final	Concentración de stock	Notas
Suero bovino fetal	50ml	10% v/v	-	Sin inactivación o filtrado
Antibióticos (Sigma A5955-100ml)	5ml	100 u/ml pen, 100µg/ml strep, 0.25µg/ml amfotericina	10,000 u/ml penicilina, 10,000 µg/ml streptomycin 25µg.ml amfotericina	Se suministra como stock 100X en botellas de 100 ml. Se almacena en el congelador en el cajón de existencias de la sala de cultivo celular.
Asc-2-phos (Sigma A8960)	5ml	100µM	10mM	Preparar 10 mM de hidrato de sal de sesquimagnesium, ácido L-ascórbico 2-fosfato, esterilizar por filtración, dividir en alícuotas de 5 ml y almacenar a -20 °C. Sigma A8960
Dexametasona (Sigma D8893)	1ml	1 x 10 ⁻⁷ M	5 x 10 ⁻⁵ M	Se suministra como polvo de 1 mg. Disolver en 1 ml de etanol ABS, añadir 49 ml de α MEM para una solución madre de 5 x 10 ⁻⁵ M. Almacenar a 4° – 8°C
β glycerol-2-phosphate (necesario para mineralización) (Sigma G9891)	5ml	10mM	1M	Preparar una solución 1M, filtrar, esterilizar y alícuotar en cantidades de 5 ml, posteriormente congelar.
Glutamax (Life Technologies 35050038)	5ml	1X	100X	Almacenado a 25°C en el laboratorio de carga.

5.8 Inmunohistoquímica

Para evaluar la expresión de proteínas de las células cancerosas en los constructos, las muestras se procesaron histológicamente como se menciona en 2.5.4. y se recogieron del paso de baño de agua a 45°C y se montaron en portaobjetos cargados y se incubaron a 60°C durante 2 h. Posteriormente, las muestras se llevaron a DAKO PTLINK para desparafinación y recuperación de antígeno con EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (Agilent) a 65°C, un ciclo de 96°C durante 20 min y posteriormente se enfriaron a 65°C. Las muestras se llevan posteriormente al DAKO Autostainer Link 48 (Agilent) para la tinción mediante los siguientes pasos consecutivos: lavado en tampón DAKO durante 2 min., bloqueo de antígenos no específicos con el reactivo bloqueador de peroxidasa SM801 durante 5 min, lavado, adición de anticuerpos primarios x 30 min con anticuerpo monoclonal de ratón GATA3 (L50-823, Bio SB) dilución 1:300, monoclonal de ratón anti-CD34 humano dilución 1:800, Clon QBEnd-10 y con monoclonal de ratón anti-citoqueratina humana Clones AE1/AE3 (DAKO) dilución 1:600, dos lavados, aplicación del LINKER EnVision FLEX+ Mouse (SM804, Agilent) durante 15 min, dos lavados, aplicación del reactivo de detección de polímeros Dako EnVision FLEX /HRP (SM802, Agilent), dos lavados, aplicación del Kit de cromógeno EnVision FLEX DAB+ (DM827), solución concentrada de 100 ml de agua, solución de diaminobencidina (DAB) y tampón de sustrato EnVision FLEX (SM803) que contiene peróxido de hidrógeno durante 5 min, lavado con agua destilada, teñido con hematoxilina durante 2 min, lavado en agua durante 5 min, deshidratado, enjuagado y finalmente montado.

5.9 Cuantificación de la rigidez de la matriz

Se realizó un cultivo celular 3D con células MCF7 durante 7, 14 y 21 días para evaluar la rigidez de la MEC y las variaciones en tiempo real. Las propiedades reológicas de los hidrogeles compuestos se probaron incubando muestras de hidrogel en intervalos de diferentes días utilizando un reómetro (TA Instrument, DHR-3, EE. UU.). Los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') se determinaron realizando barridos de deformación oscilatoria utilizando placas paralelas con una geometría de 8 mm y un rango de deformación de 0,01% a 500% a 37°C.

5.10 Ensayo de citotoxicidad de quimioterapéutico

Para evaluar las diferencias en la supervivencia, se cultivaron 1000 células/pocillo de ambas líneas celulares en placas de 12 pocillos. Después de 48 h, se retiró el medio de cultivo y se complementó con diferentes concentraciones de docetaxel (0, 0,001, 0,01, 0,1, 10 y 100 μ M). Después de 24 h, hasta 78 h, se cuantificó la viabilidad de las construcciones de tejido mediante cultivo con medio con solución de azul de alamarBlue™ al 5% durante 3 h y se cuantificó como se mencionó y se midió la fluorescencia a 560/590 nm. Como complemento, se tomaron imágenes utilizando microscopía de inmunofluorescencia (OLYMPUS BX43 Fluorescence Light Source Olympus U-LH100HG) y las imágenes de las muestras teñidas con DAPI asociadas se procesaron con el software ImageJ (Fiji).

VI. RESULTADOS

6.1 Descelularización

Se recibieron 3 cabezas femorales bajo firma de consentimiento informado, estas fueron trasladadas al laboratorio y congeladas a -80°C hasta su uso. Posteriormente, a una de las cabezas femorales se les realizó el proceso de descelularización y microparticulado. Las micropartículas óseas descelularizadas se analizaron para una cuantificación de eliminación de contenido biológico (Fig. 2), el cual, en ambos ensayos, fue disminuyendo gradualmente en cada paso del proceso. Después de cada paso de descelularización, el último contenido de proteína se redujo hasta un 78% y el último contenido de ARN se midió en $55\text{ ng}/\mu\text{l}$.

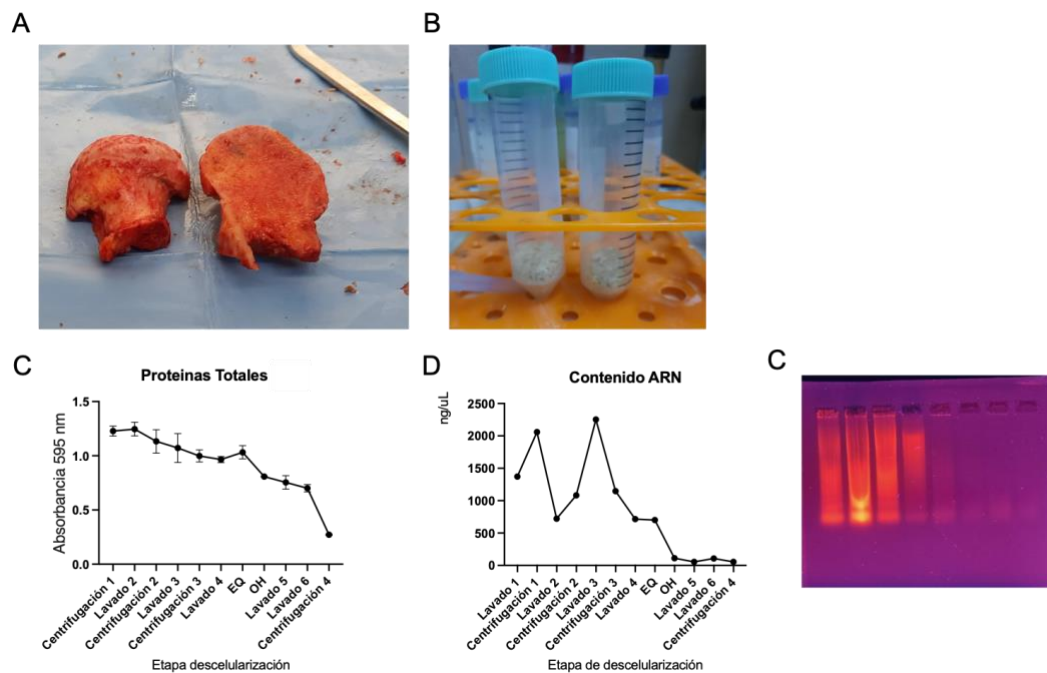


Figura 2. Imágenes en relación a procesamiento de cabeza femoral humana donada por estudio CEC 19-06-42. A. Cabeza femoral seccionada sagitalmente para la obtención de segmentos óseos para el proceso de descelularización y acorde al tamaño de tubos centrifuga Sorval (ThermoFisher). B. Tejido óseo descelularizado post proceso de molienda. C. Cuantificación de proteínas mediante ensayo de Bradford. C. Cuantificación de ARN obtenido de las muestras en las etapas de descelularización. D. Corrida de ARN en gel de agarosa.

6.2 Caracterización fisicoquímica

Una vez descelularizado y micropulverizado el tejido óseo (DBMP), el tamaño y las formas de las micropartículas se visualizaron mediante SEM (Fig. 3 y 4), lo que evidenció un polimorfismo con segmentos muy pequeños 1 μm hasta unos 200-300 μm y demuestra una morfología geométrica de tipo cerámico con formas geométricas tipo rectángulos con bordes en general definidos. Dependiendo del tamiz utilizado (90 y/o 200 μm) la diferencia en el rango de tamaño promedio (Fig.3 y 4) varió siendo 111 μm para el proceso pasado por tamiz de 90 μm y un tamaño aproximado de 138 μm para el tamiz de 200 (Fig. 5) al medir los bloques más representativos de la muestra siendo la diferencia en su tamaño estadísticamente significativo ($P= 0,0287$). En las micropartículas molidas y pasadas por el tamiz de 90 μm simula formas o restos de laminillas intersticiales a modo de segmentos de estas en capas paralelas.

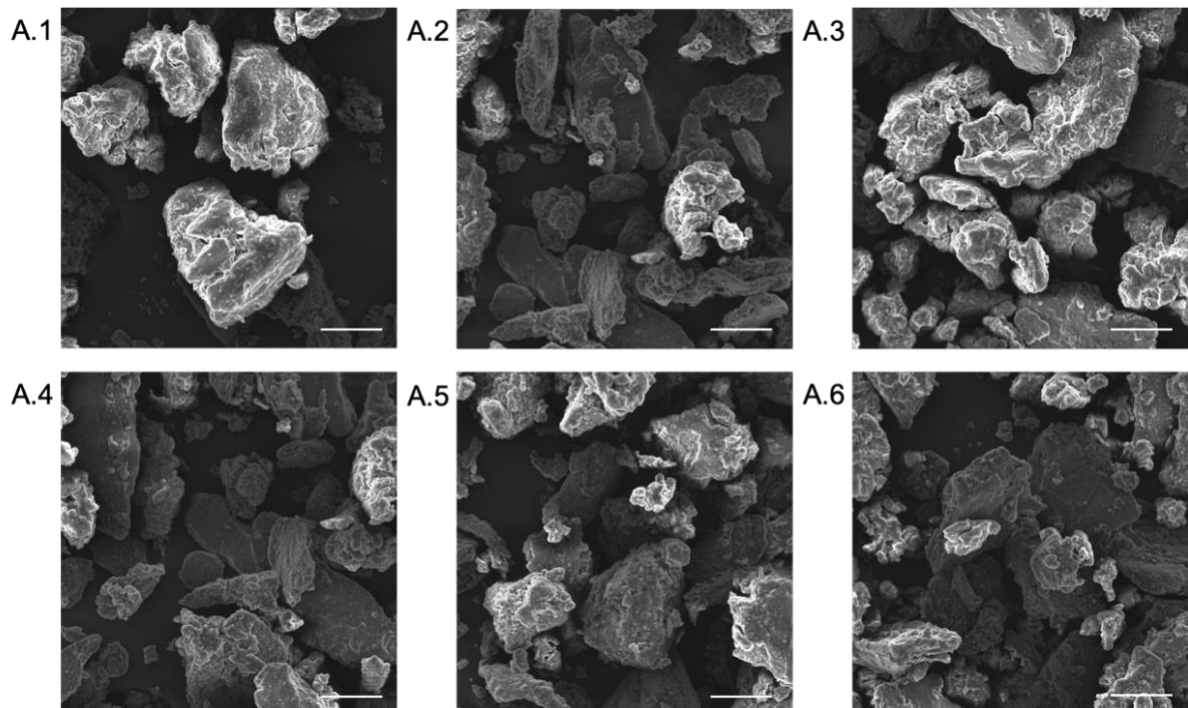


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de DBMP por tamiz de 200 μm . Imágenes A.1- A.6. Escala 100 μm .

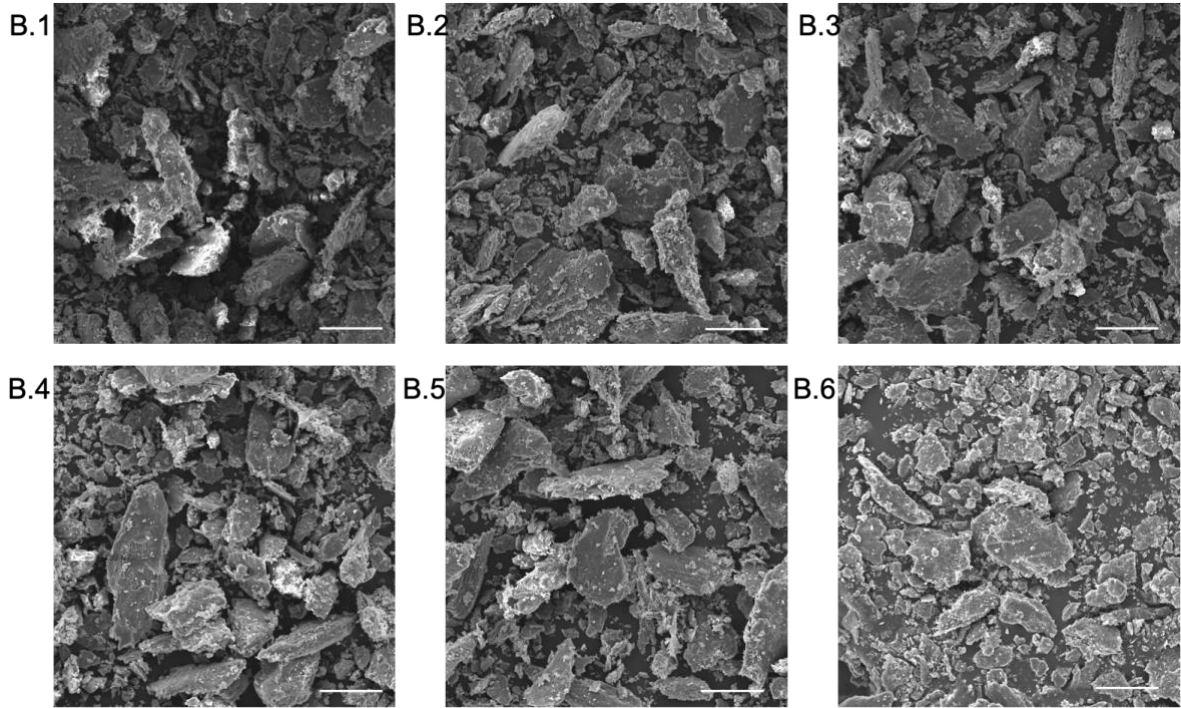


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de DBMP por tamiz de 90 µm. Imágenes B.1-B6.
Escala 100 µm.

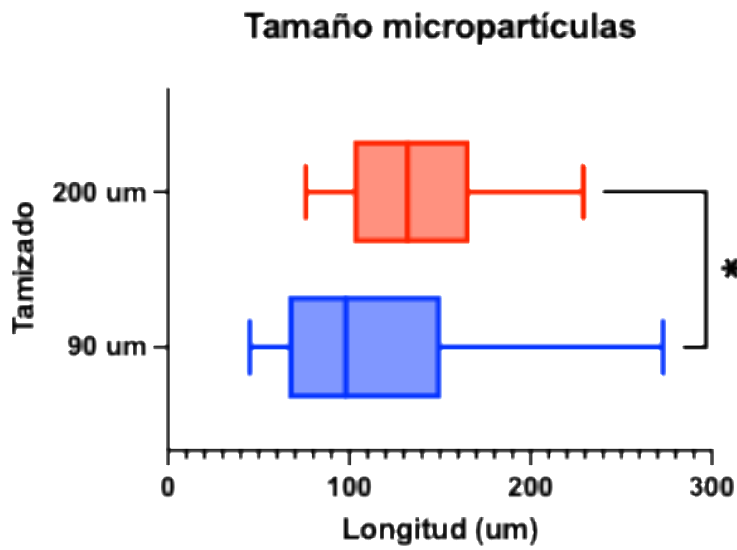


Figura 5. Gráfico de medición de micropartículas descelularizadas de hueso de mayor tamaño. Rojo: mediciones del proceso tamizado a 200 µm. Azul. mediciones del proceso tamizado a 90 µm. Se encontró una diferencia significativa en el promedio de las mediciones.

Una vez sintetizado, el hidrogel compuesto, basado en GelMA en combinación con micropartículas óseas descelularizadas y el fotoiniciador 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone, se analizó mediante FTIR, SEM y reometría. En los análisis de espectroscopía FTIR se confirmó su composición química final, para chequeo del proceso de entrecruzamiento y para analizar las características estructurales de los hidrogeles modificados con hueso.

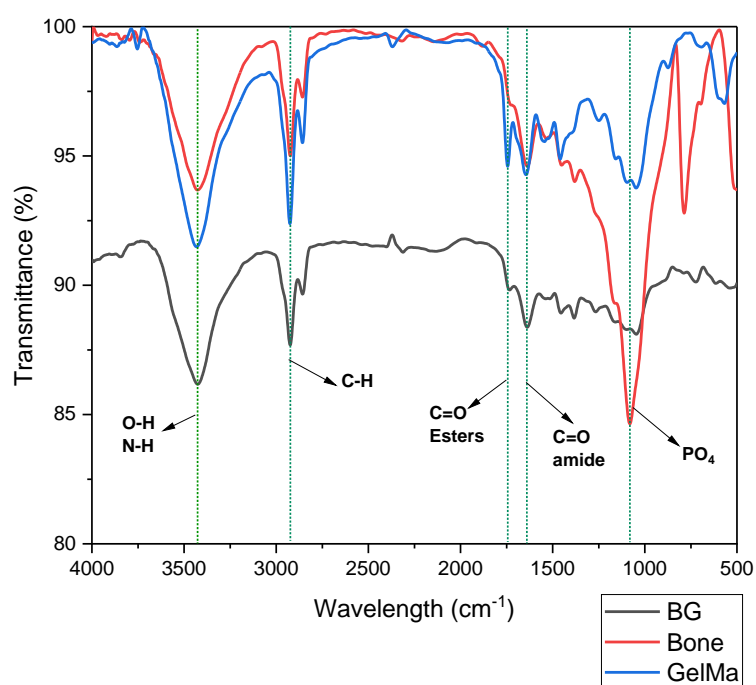


Figura 6. Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR). Hidrogel compuesto (BG), GelMA y DBMP.

En la evaluación mediante FTIR (Fig. 6), el espectro azul (GelMA) presenta los picos característicos del polímero de gelatina, con una banda de absorción prominente alrededor de 3342 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento O-H y N-H. Los picos en el rango de $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ indican vibraciones de estiramiento C-H. La estructura principal de la gelatina se caracteriza por bandas de absorción a 1738 y 1641 cm^{-1} (estiramiento C=O,

ésteres y amida I), 1548 cm^{-1} (flexión N-H acoplada con estiramiento C-H, amida II), y 1250 cm^{-1} (estiramiento C-N y flexión N-H, amida III) el pico alrededor de 1640 cm^{-1} en el espectro GelMA (GM), asociado con el estiramiento C=C de los grupos metacrilato, está muy cerca del pico de estiramiento C=O de la amida I. Esta proximidad hace que sea difícil detectar y confirmar su desaparición después de la reticulación, indicada por su ausencia en el espectro BG. El espectro rojo, que representa el hueso, revela señales características del tejido óseo, que comprende aproximadamente un 30% de fracciones orgánicas y un 70% de minerales inorgánicos en peso. La matriz orgánica se compone predominantemente de colágeno, proteínas no colágenas y lípidos, mientras que la fase inorgánica es principalmente hidroxiapatita carbonatada mineralizada. El principal componente orgánico incluye amida I (alrededor de 1641 cm^{-1}) y amida II (alrededor de 1536 cm^{-1}). Para la porción inorgánica, aparecen señales clave para fosfato y carbonato. El componente de fosfato, principalmente debido a la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), está representado en dos regiones espectrales: $1200\text{--}900$ y $650\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. La amplia banda de absorción a $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ surge principalmente de los modos vibracionales de los iones de fosfato (PO_4^{3-}). Además, las bandas entre 650 y 500 cm^{-1} están vinculadas al modo de flexión de PO_4^{3-} . Debido a la sustitución de algunos aniones de hidroxiapatita por carbonato, también se observaron iones de carbonato (CO_3^{2-}) entre 1600 y 1300 cm^{-1} , superponiéndose parcialmente con la región amida II. El espectro negro de GelMA-BG confirma firmemente la reacción de entrecruzamiento. Esto se evidencia por la mayor aparición de picos en la región de $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, que se atribuyen al estiramiento C-H de los grupos terciarios $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}$ formados durante la reticulación.

Después fue analizada la capacidad de hinchamiento del hidrogel al cultivar muestras del hidrogel compuesto con medio de cultivo para evaluar su capacidad de retención de agua donde se pudo comprobar que puede absorber agua del medio hasta 15 veces su peso seco y que la adición de DBMP disminuyen esa capacidad (Fig. 7). Los hidrogeles tendieron a

mantener la capacidad de hinchamiento después de 96 h y hubo una correlación inversa entre la incorporación de DBMP que disminuyó la relación por debajo del 10%.

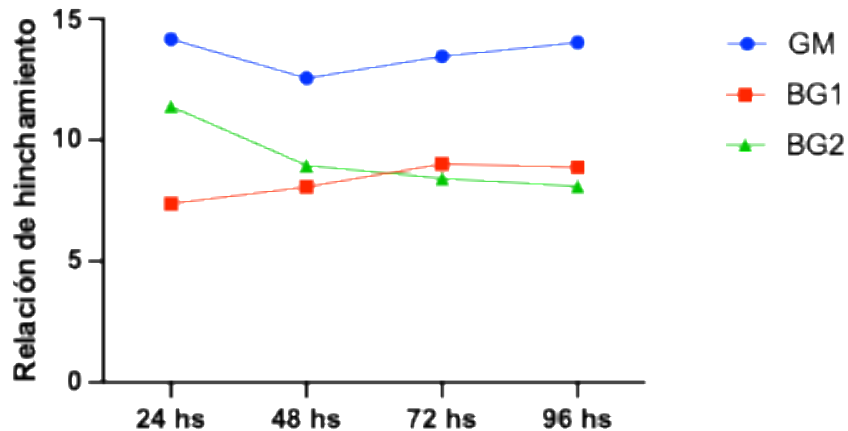


Figura 7. Test de hinchamiento del hidrogel GelMA (GM) y compuesto BG (BG1 y BG2). Se aprecia una constancia en los 3 hidrogeles por sobre las 5 veces su tamaño en retención de medio hubo diferencias significativas de los dos geles BG (BG1, $P= 0,0017$ y BG2, $P=0,0045$) versus el gel solo GM. (ANOVA. $P= 0,05$).

Las imágenes SEM de los hidrogeles revelaron una microestructura de hidrogel porosa, y el análisis del tamaño de poro mostró un tamaño de poro entre 188 y 265 μm (Fig.8). Posteriormente, en base al *ISO 10993-5: "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity"*, por lo que se evaluaron los hidrogeles en una incubación por 48h en agitación constante, se tomaron muestras y se analizaron los medios condicionados de GelMA y BG bajo TEM para evaluar la presencia de nanopartículas, las cuales se pudieron identificar como estructuras geométricas características tipo cuadrados y rectangulares con diversos tamaños menores a 1 μm hasta 50 nm. Algunas mediciones llegaron al tamaño de los 5 nm (Fig. 9).

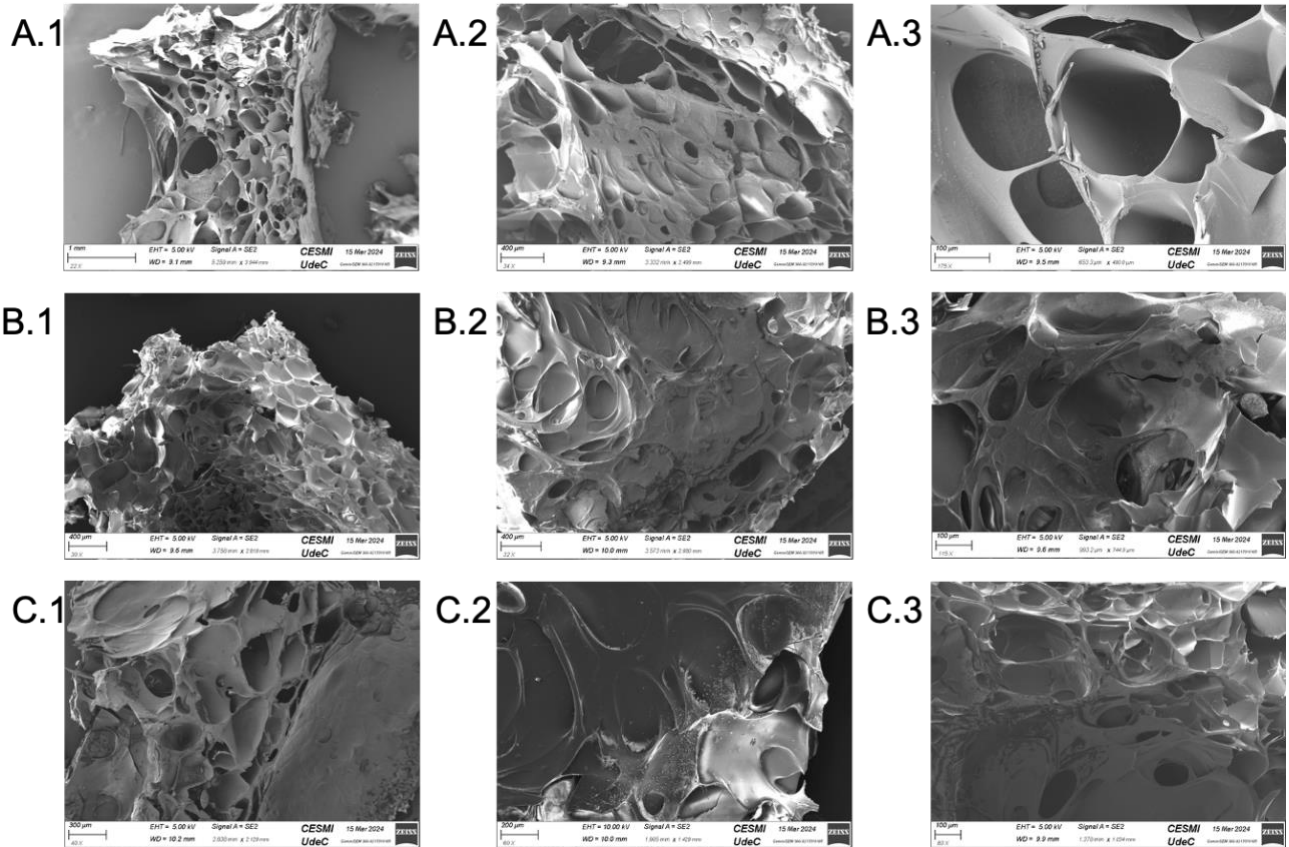


Figura 8. SEM de hidrogeles por criofractura. Se pueden observar las estructuras del hidrogel funcionando como una estructura tipo matriz posterior a la liofilización con presencia de porosidad. Escalas en la esquina inferior izquierda (1mm – 100 μ m).

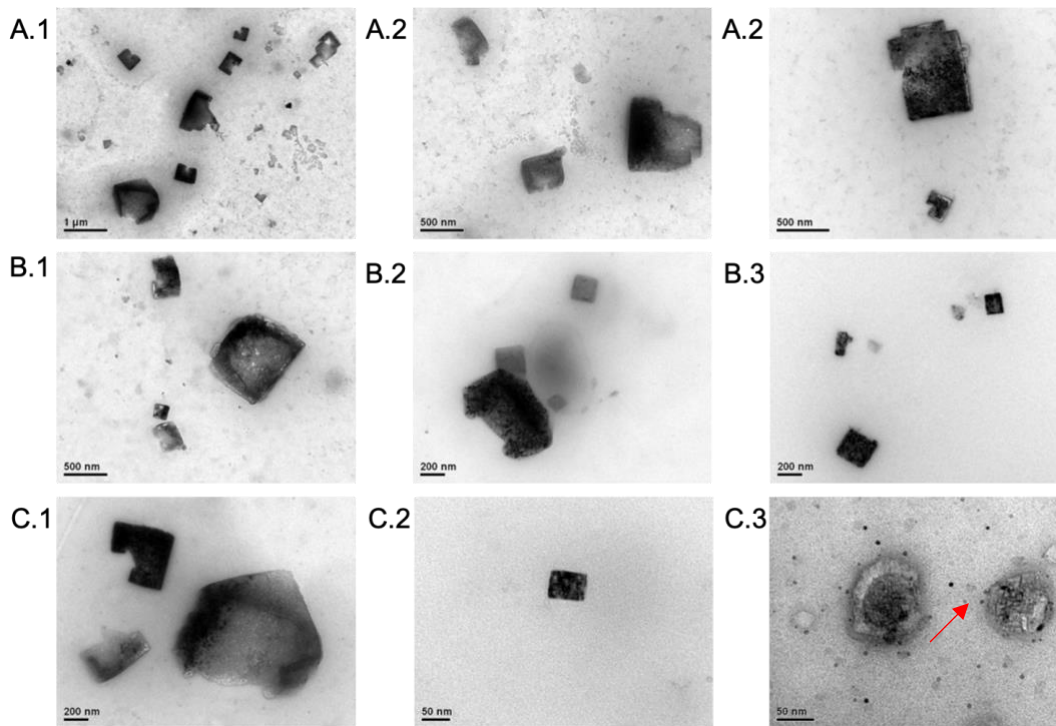


Figura 9. TEM de nanopartículas obtenidas desde el ensayo de medio condicionado. Se pueden observar estructuras geométricas en concordancia con los minerales de hidroxiapatita en todas las imágenes, los tamaños varían desde los 1000 hasta los 5 nm. A.1-A.2 Escala 1 μm , B.1-B.2 escala 200 nm y C.1-C.3 escala a 50 nm. En C.3 se pueden apreciar nanopartículas de 5 nm aproximadamente (Flecha roja).

Con la caracterización química de una muestra una vez fracturado el hidrogel, fue posible observar la presencia de poros y con presencia de zonas de calcio dentro de los poros del hidrogel con microscopía SEM-EDS (Fig. 10). En las DBMP se apreciaron dos grandes picos en el análisis de calcio, fósforo y carbono, ya que estos son componentes químicos y estructurales del ordenamiento del colágeno, alto en carbono, con los cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). El calcio también se apreció en menor cantidad en la superficie del hidrogel y dentro de su interior en relación con algunos poros (Fig 10. D.1 y D.2).

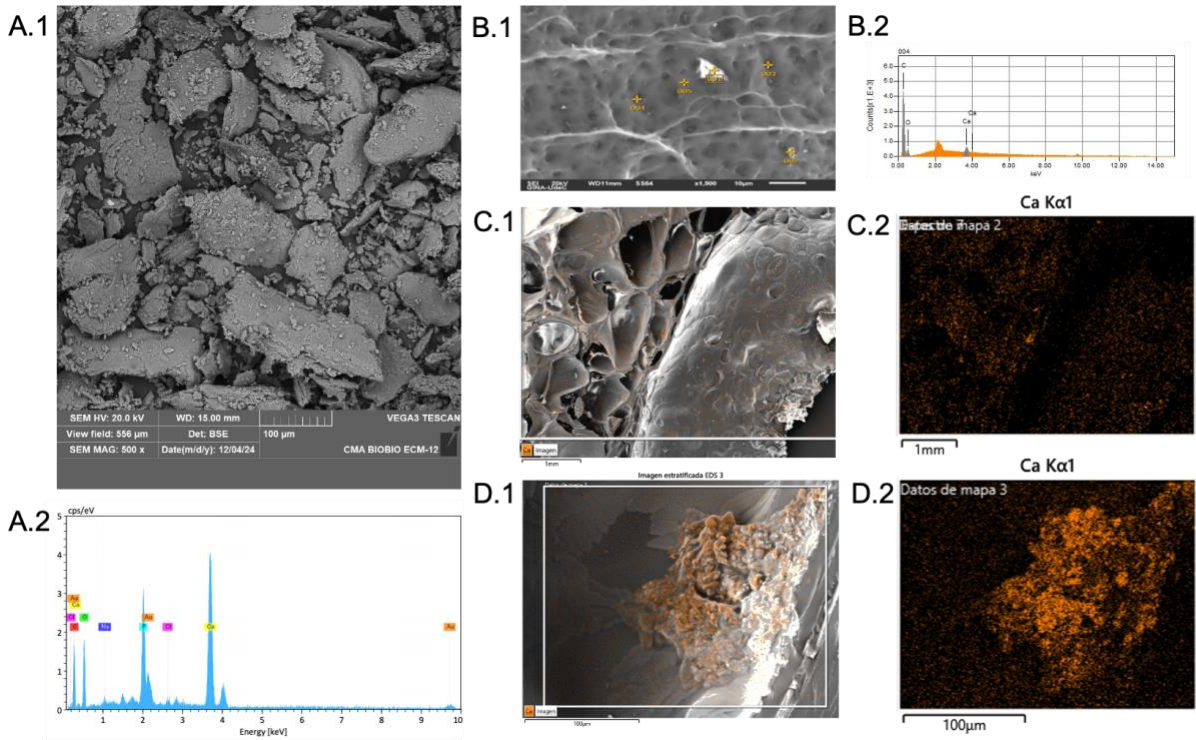


Figura 10. SEM-EDS del hidrogel compuesto con DBMP. A1) Imagen de microscopía SEM para análisis de composición química, donde se puede apreciar (A.2) un pick intenso de calcio (Ca) y fosforo (P). B.1 Superficie liofilizada del hidrogel compuesto BG y (B.2) su análisis por EDS. C.1 Imagen del interior del hidrogel compuesto BG con la presencia de calcio (naranja) en su espesor y paredes de los poros. D.1 Imagen magnificada (x10) de uno de los poros del hidrogel compuesto BG con presencia de DBMP y (C.2-D.2) análisis EDS con el calcio en naranja.

La prueba para evaluar el comportamiento mecánico del hidrogel compuesto BG demostró un comportamiento pseudoplástico del hidrogel y que tiene la capacidad de fluir a una deformación de aproximadamente el 42% con un módulo de almacenamiento G' entre 1500-2000 Pa. Pruebas mecánicas posteriores en una rampa de temperatura revelaron una

disminución de la rigidez del hidrogel entre 20 y 25°C o su mejor capacidad de fluir.

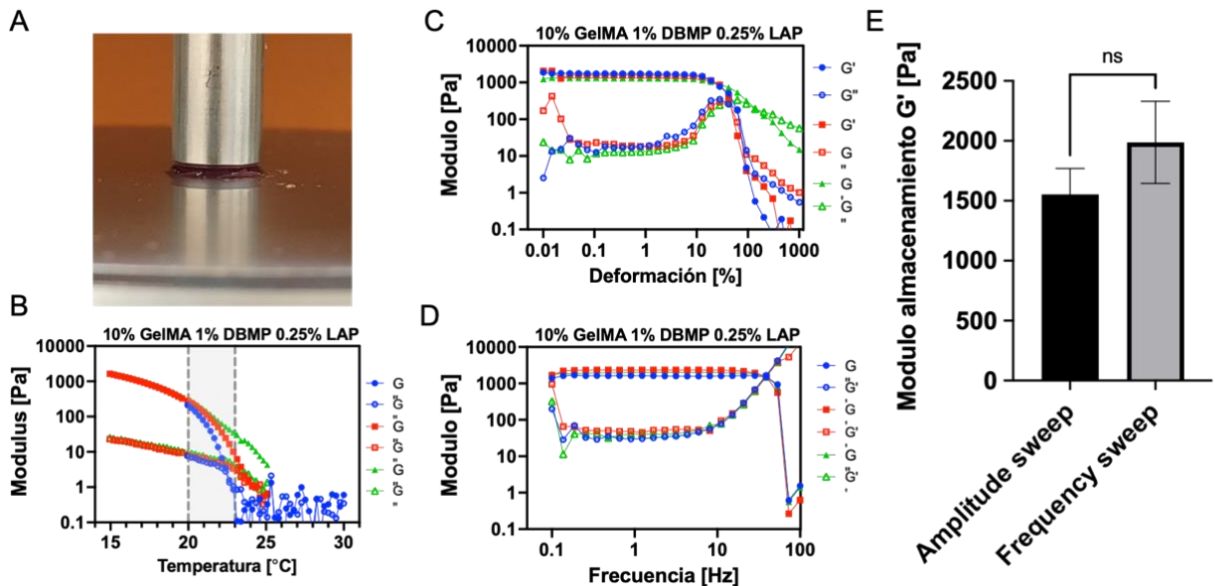


Figura 11. Ensayo reológico para evaluación de las propiedades del hidrogel compuesto BG. A. Imagen del hidrogel para los ensayos en contacto con el hidrogel posterior a su hinchamiento en medio de cultivo. B. Ensayo de medición de rigidez en rampa de temperatura donde se determina que la temperatura ideal para ser inyectado es entre los 20° a los 24°C. C. Ensayo de amplitud y D. Ensayo de frecuencia para cálculo de rigidez. E. Módulo de almacenamiento entre los 1500 a los 2000 PA.

6.3 Test de impresión 3D

Conocidas ya las características pseudoplásticas y de su capacidad de fluir a través de presión, como es el caso de una inyección, se realizó una prueba de impresión de microextrusión con el hidrogel compuesto y GelMA de un diseño de disco con 4 capas (Fig. 12). Una vez cargado los hidrogeles en jeringas de 3 ml se procedió a imprimir en placa de 24 pocillos donde se apreció una correcta impresión reproduciendo el diseño asistido por computador (CAD). Una vez fotopolimerizado, se procedió al análisis microscópico donde se pudo observar la presencia de las DBMP a través de las líneas y dentro del espesor de los hidrogeles.

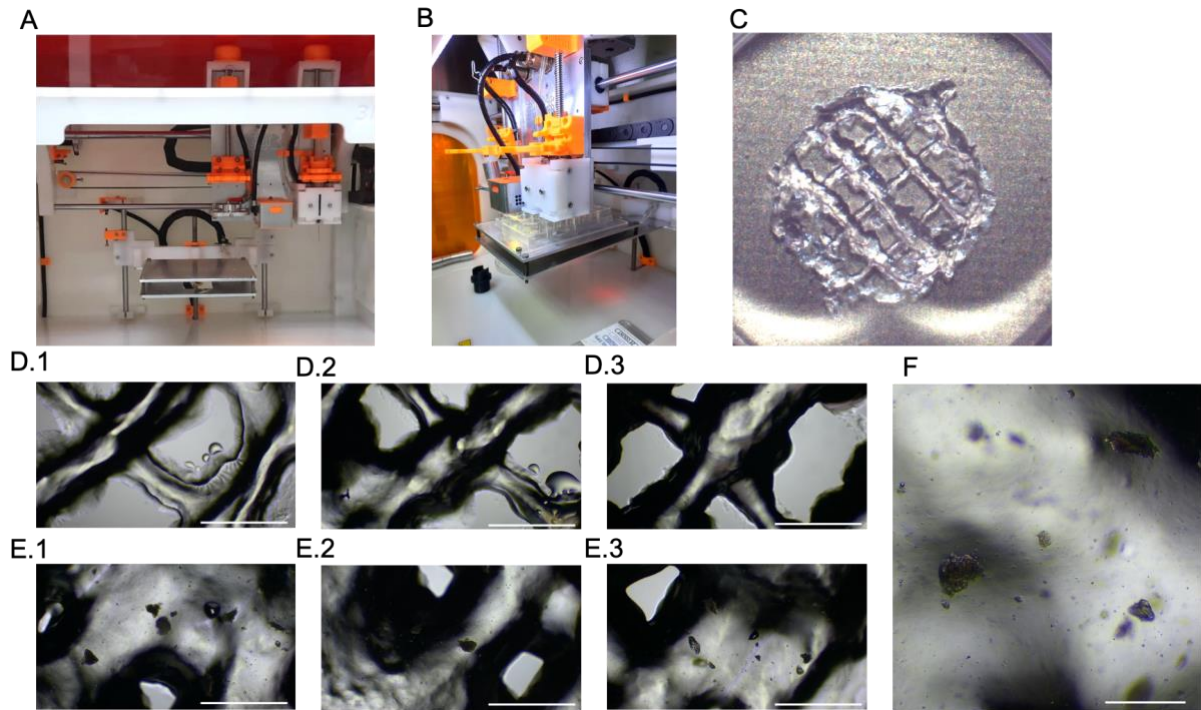


Figura 12. Impresión 3D con el hidrogel compuesto. A. Bioimpresora GENESIS (3DBS), donde se aprecia la cama y los dos extrusores. B. Proceso de fotopolimerización con luz UV 365 nm durante 1 min por pocillo para generar el entrecruzamiento del hidrogel C. Impresión de GelMA e hidrogel compuesto BG en placa de 24 pocillos. D1-D3. Imágenes microscopía óptica directa aumento 5x de las impresiones del GelMA. E.1-E.3. Imágenes microscopía óptica directa aumento 5x de las impresiones con hidrogel compuesto BG. Escalas 1 mm. F. Imagen aumentada de un disco donde se aprecian las DBMP con escala 200 µm.

6.4 Análisis de biocompatibilidad

El primer conjunto de análisis examinados para evaluar la biocompatibilidad del hidrogel óseo mediante la prueba de medio condicionado con tres líneas celulares (MCF7, Saos2, HDF) donde se cultivaron durante 48 h para la evaluación de la toxicidad mediante el reactivo de alamarBlue™ (Fig. 13). Se descartó alguna reacción de citotoxicidad aguda en las células a las 24 h con la mayoría de las muestras con presencia de viabilidad sin diferencias significativas ambos ensayos. A las 48 h de cultivo celular en el medio condicionado se

evidenció un aumento en la viabilidad de todas las líneas en comparación con el control, sin diferencias significativas entre los grupos.

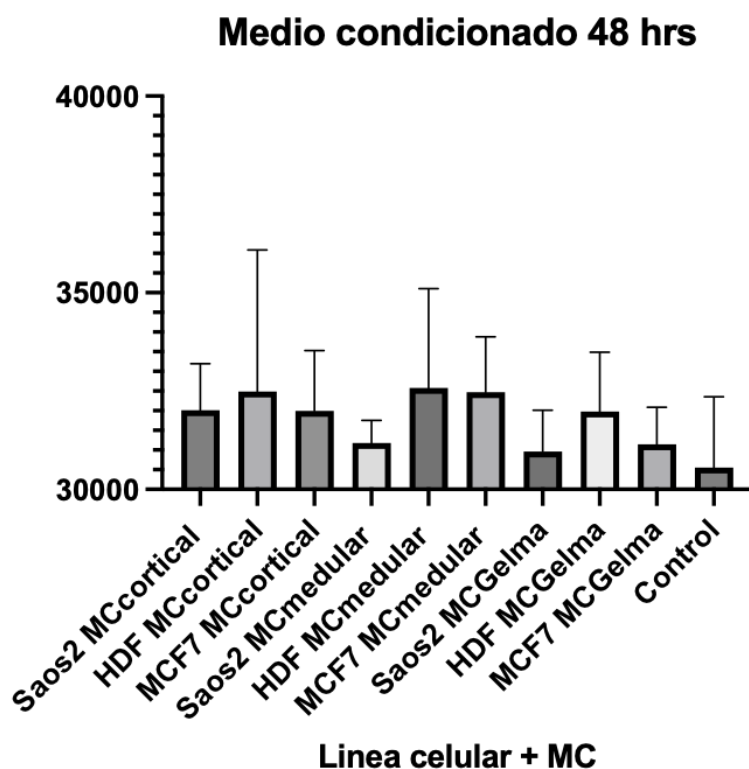


Figura 13. Gráfico del ensayo de viabilidad celular según ISO 10993-5. A. 24 y B. 48 h de cultivo con el medio condicionado y análisis por medio del reactivo alamarBlue™. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Cada grupo/barra son 3 experimentos independientes (n=9) (Test ANOVA. P=0,05)

Posteriormente, se realizaron ensayos de citotoxicidad por contacto y en cultivo celular 3D con líneas celulares acordes a validar un modelo óseo 3D biocompatible y con la capacidad de ser un andamio celular 3D generando el atache y división celular necesario para células con una correlación clínica con el tejido óseo, en este caso se emplearon células de osteosarcoma (Saos2), cáncer de mama triple (+) (MCF7) y pre-osteoblastos (MC3T3-E1). En los diferentes intervalos de tiempo analizados, entre el 1 – 21 días, se evidenció una correlación positiva entre los días y la viabilidad medida por los ensayos LIVE/DEAD y

alamarBlue™, junto con diferencias en la forma dependiendo de la línea celular, donde MCF7 presentó una organización más conglomerada con forma de organoide en comparación con la disposición más unitaria de las células Saos2. En relación a la exploración de las muestras una vez montadas inmediatamente posterior a la tinción con LIVE/DEAD, existe un espesor que al enfocar las células genera un desenfoque en las continuas por diferencia en profundidad y que además es posible enfocar las DBMP para diferenciar de las morfologías celulares (Fig. 14).

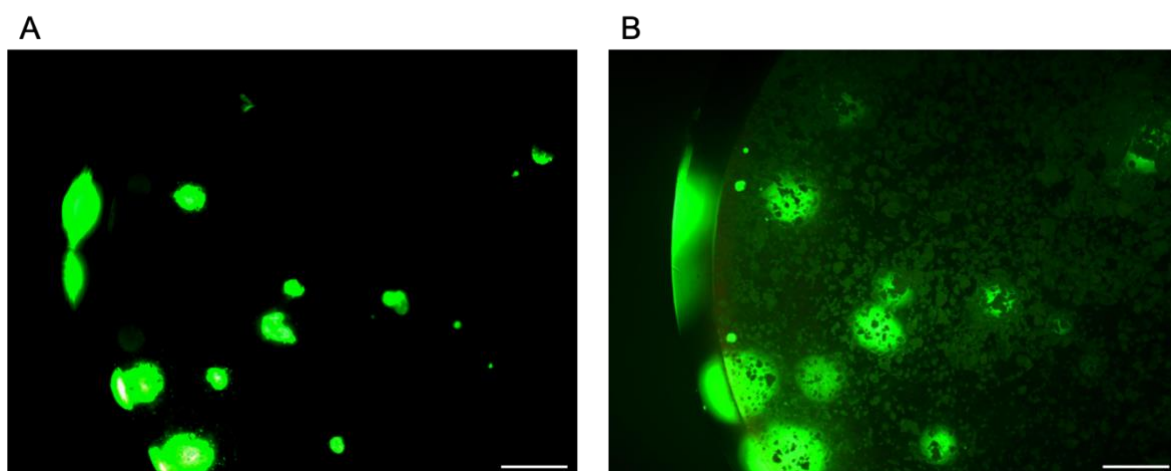


Figura 14. Imagen de microscopía de inmunofluorescencia con células MCF7 con tinción de Calceina AM. A. Imagen enfocada en uno de los organoides a través del espesor del hidrogel cercano a borde externo de la muestra. B. Imagen enfocada en las DBMP lo que generó un desenfoque de las estructuras celulares. Escalas en 200 μm .

Hubo una correlación positiva significativa entre el tiempo y la fluorescencia verde de las células vivas que fueron visibles en todas las muestras del intervalo de tiempo con una menor proporción de fluorescencia roja que indica una baja muerte celular (Fig. 15). La diferencia entre los grupos de hidrogel óseo y GelMA en Saos2 fue significativa en las primeras 24 h, siendo mejor para las construcciones GelMA, sin embargo, con el tiempo esta diferencia disminuyó y no fue significativa con un aumento en la viabilidad a partir de las 48 h.

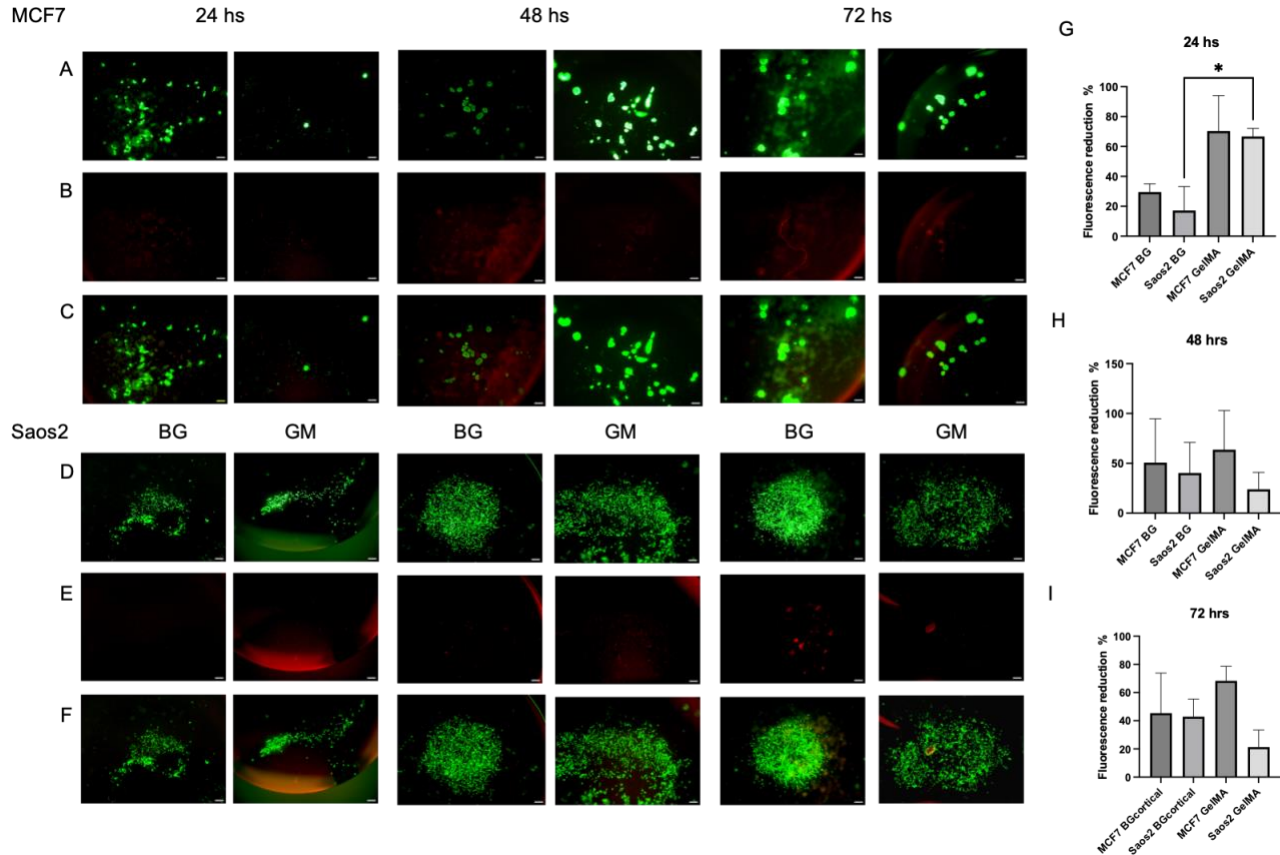


Figura 15. Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia con ensayo LIVE/DEAD. Líneas celulares MCF7 (A, B y C) y Saos2 (D, E y F) contra su control + (GM) para evaluación de biocompatibilidad. Cada intervalo de tiempo (24-72 h) se presenta con dos imágenes experimentales del hidrogel compuesto BG (BG) y control GeIMA (GM). A y D. imágenes de células vivas con calceína AM. B y E. imágenes de canal para visualizar el etidio o células muertas. C y F. Imágenes combinadas (merge). Extremo derecho. Se muestran los gráfico de cuantificación de viabilidad celular (porcentaje de reducción) a las 24 h (G), 48 h (H) y 72 h (I). Cada grupo/barra son 3 experimentos independientes (n=9). Escalas en 100 μ m.

Para evaluar la capacidad de ser un modelo óseo combinando las DBMP y células del tejido óseo, tales como pre-osteoblastos, se realizó un cultivo celular 3D con GeLMA e hidrogel compuesto BG (GeIMA 6% LAP 0.25% DBMP 3%) y se evaluó la biocompatibilidad por medición de LIVE/DEAD y cuantificación por medio de reactivo alamarBlue™ (Fig. 16).

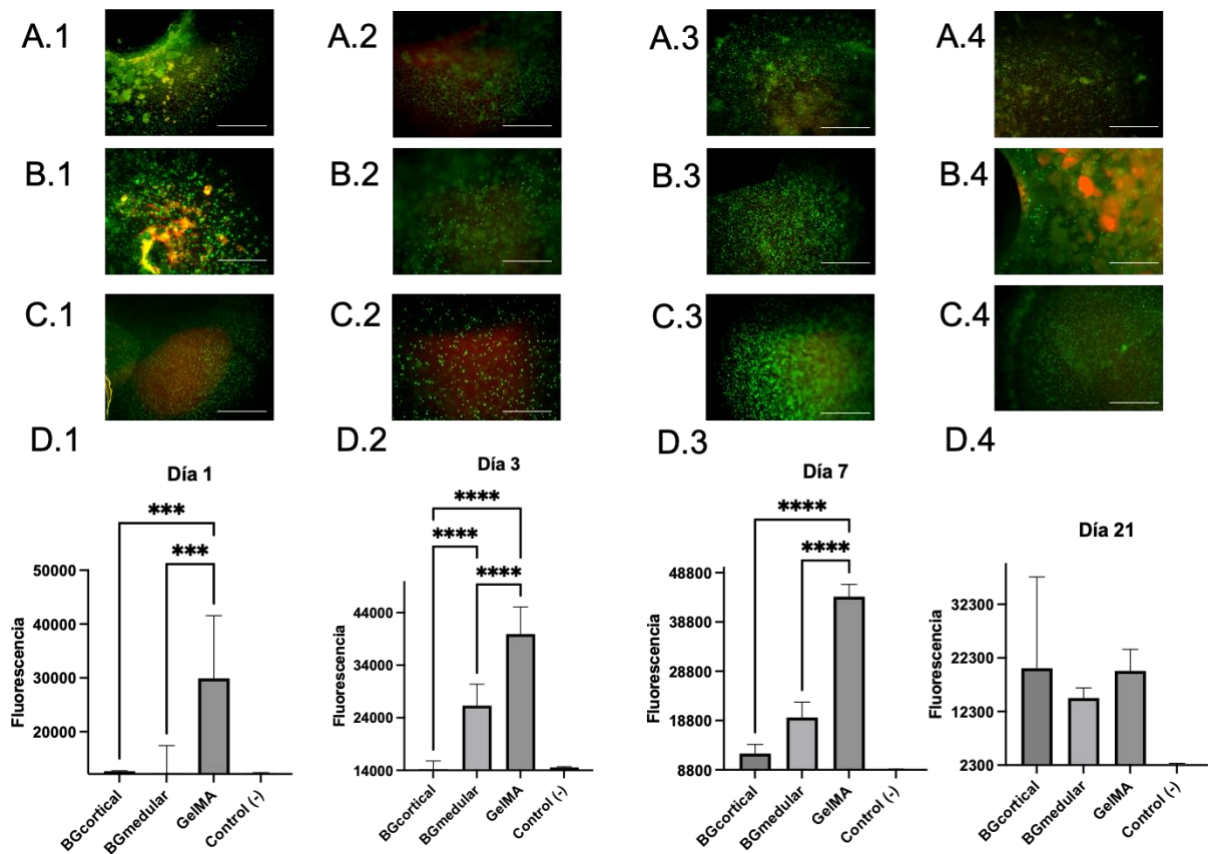


Figura 16. Imágenes y gráficos del cultivo celular 3D para biofabricación de un modelo *in vitro* óseo 3D. Se combinaron pre-osteoblastos (MC3T3-E1) en el hidrogel compuesto BG y GelMA desde el día 1 hasta el día 21. Verde: células vivas (calceína AM), rojo: muerte celular (bromuro de etidio). A.1-A.4. Cultivo celular con hidrogel compuesto cortical y medular B.1-4. D1-4. Gráficos de medición de la viabilidad celular en los diferentes intervalos de tiempo (1-21 días), cada grupo/barra 3 son experimentos independientes (n=9). En asterisco las diferencias significativas entre los grupos. P=0,05. Cultivo celular con GelMA. Todas las imágenes son unión de ambos canales. Escala en 1mm. D1-4. Gráficos de medición de viabilidad celular.

Se evidenció una buena biocompatibilidad desde el primer día con un aumento paulatino de la actividad/metabolismo celular, comenzando con una mejor actividad del grupo con GelMA que alcanzó su más alta medición el día 7, a diferencia de los grupos con DBMP que fueron aumentando su actividad desde el día 3 el compuesto con hueso medular y el

cortical desde el día 7 que más tarde alcanzó valores similares al grupo con GelMA a los 21. Los tres compuestos tuvieron resultados similares a los 21 días de cultivo versus su control positivo (ISO 10993-5, 21 días; BGcortical: 102% Bgmedular: 75%), demostrando una biocompatibilidad del hidrogel compuesto BG con la línea preosteoblástica.

Para evaluar las construcciones como un tejido tumoral artificial, se fijaron y analizaron muestras de hidrogel con y sin (- control) células Saos2 y MCF7, de manera similar a un procedimiento de biopsia con un flujo de trabajo de patología anatómica (Fig. 17). En todas las muestras negativas no se identificaron células y confirmamos la capacidad de las construcciones de tejido tumoral artificial para fijarse y teñirse para una inspección microscópica detallada. Se observó una clara diferenciación de DBMP de las organizaciones celulares, vale la pena señalar que también hubo diferencias en la organización según la línea celular, donde MCF7 tuvo una tendencia a presentar disposiciones tipo organoides versus Saos2 con menor agrupación celular en todos los intervalos analizados. La eosina produjo una tinción rosada-violeta del hidrogel, observándose rosa anaranjado o rosado estructuras celulares como el citoplasma, el colágeno, el tejido conjuntivo y otras estructuras que rodean y sostienen la célula, siendo más oscura la tinción en la presencia de material genético y/o núcleo. En las muestras con hidrogel compuesto BG se pudo observar segmentos laminillares de tejido óseo en relación con las células.

De las imágenes desde el día 14, se puede observar un organoide con un tamaño de diámetro de más de 100 μm con varias células que conforman estructuras redondeadas y con una clara polarización (Fig 17). Curiosamente, también se observó una interacción significativa de células y DBMP, donde se observaron varias células entre el tejido óseo. Los resultados de viabilidad celular en correlación con las imágenes, como se muestra en las Fig. 18 y 19, indican

que varias muestras tenían una correlación positiva significativa de baja citotoxicidad en comparación con control.

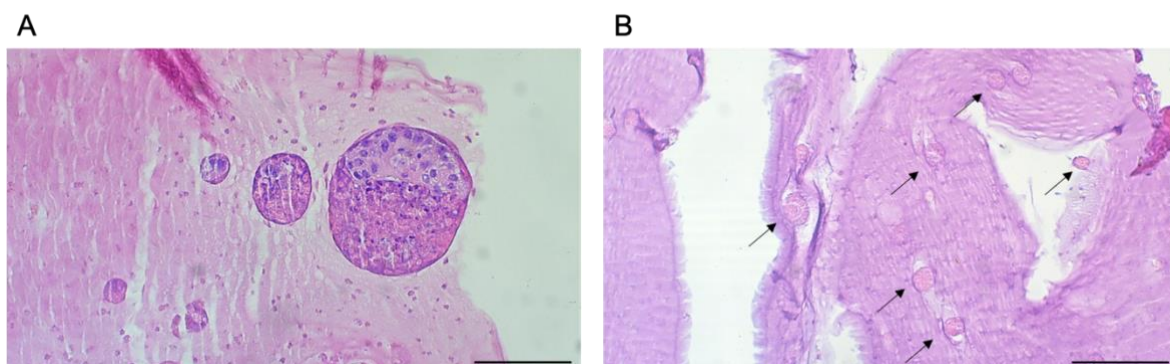


Figura 17. Imágenes de microscopía óptica directa para contrastar la diferencia morfológica entre las líneas celulares. A. MCF7 con organización tipo organoide y B. Saos2 organizaciones de menor tamaño, ambas imágenes a los 14 días de cultivo. Escala 100 μm .

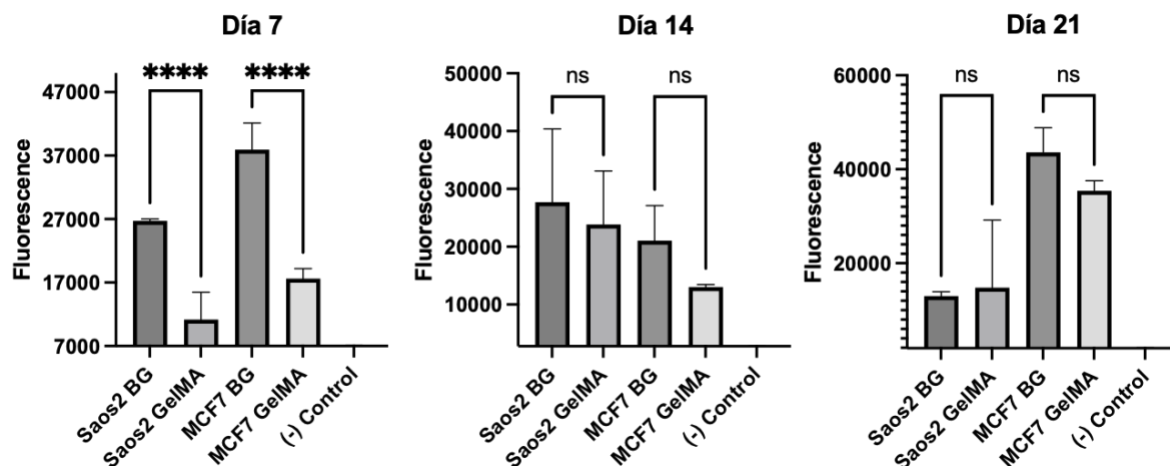


Figura 18. Gráficos de cuantificación de viabilidad celular a los días 7, 14 y 21 de cultivo 3D con líneas celulares de cáncer. Medición con reactivo alamarBlue™ con hidrogel compuesto BG y GelMA. Se presentan los valores como la media de cada grupo con 3 experimentos independientes ($n=9$), analizados mediante test ANOVA, las diferencias significativas se muestran en cada gráfico con asteriscos (Test ANOVA. $p=0,05$).

Un análisis de viabilidad adicional demostró una variación no significativa entre las muestras a los días 14 y 21; sin embargo, las células MCF7 en hidrogeles óseos presentaron más viabilidad que las construcciones en GelMA en el día 21, este es un resultado interesante en contraposición a los resultados del ensayo de superficie mencionados anteriormente. Estos resultados de biocompatibilidad (ISO 10993-5: BG MCF7: 117%, BG Saos2: 88%) indican que los hidrogeles óseos pueden generar adhesión y viabilidad celular con grados de variabilidad dependiendo de la célula cultivada.

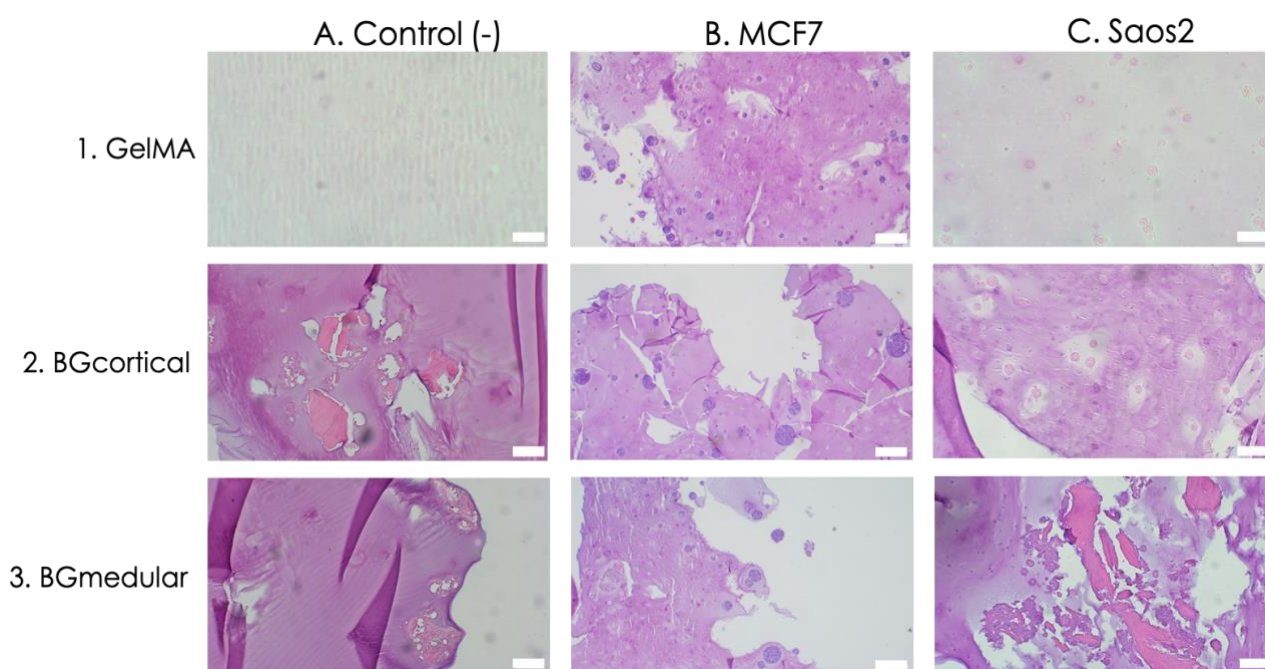


Figura 19. Imágenes de microscopía óptica directa de los montajes histológicos del cultivo celular 3D hasta los 21 días. Cultivos celulares 3D con línea celular MCF7 (B), línea celular Saos2 (C) y controles (-). (1) Grupo (GelMA), (2) grupo BG con hidrogel compuesto cortical y (3) el hidrogel compuesto con hueso medular. El hueso se puede observar cómo estructuras laminillares con diversos fragmentos eosinófilos (rosado) más aclarados que el rosado violeta del GelMA. Se registraron 3 imágenes en cada grupo con 3 experimentos independientes (n=9). Escalas en 100 μ m.

6.5 Análisis con microscopia combinada

La siguiente sección de la caracterización biológica se centró en el objetivo de diferenciar las estructuras celulares de las micropartículas óseas que pueden generar sesgos en los análisis microscópicos. Para ello, se empleó una solución de rojo de alizarina para la visualización del calcio en el tejido mineralizado presentando imágenes en color naranja a rojo que se combinó con 4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-diamidinofenil-indol (DAPI) para la visualización del núcleo celular.

En las imágenes de la (Fig. 20) fue posible distinguir entre el hueso y las células, mientras que la tinción roja oscura o intensa era visible alrededor de las micropartículas óseas. La combinación con DAPI fue útil para distinguir y localizar las estructuras celulares entre el hueso en el hidrogel óseo en todas las muestras analizadas.

Un análisis posterior de la microscopía con rojo de alizarina únicamente mediante microscopía óptica reveló que los hidrogeles óseos fueron mucho más intensos en la tinción roja que las construcciones de GelMA únicamente, ya sea con MCF7 y Saos2 (Fig. 20). La correlación entre los valores de color rojo del histograma y la combinación con hidrogeles óseos es interesante porque hubo una correlación significativa con las células Saos2 cultivadas en hidrogeles óseos que causaron un color rojo más intenso en la microscopía óptica o intensificación de la calcificación. Lo que surge de los resultados informados aquí es una validación de la biocompatibilidad del compuesto que presentó varios contenidos de calcio y que las estructuras celulares se pueden identificar claramente entre los depósitos óseos.

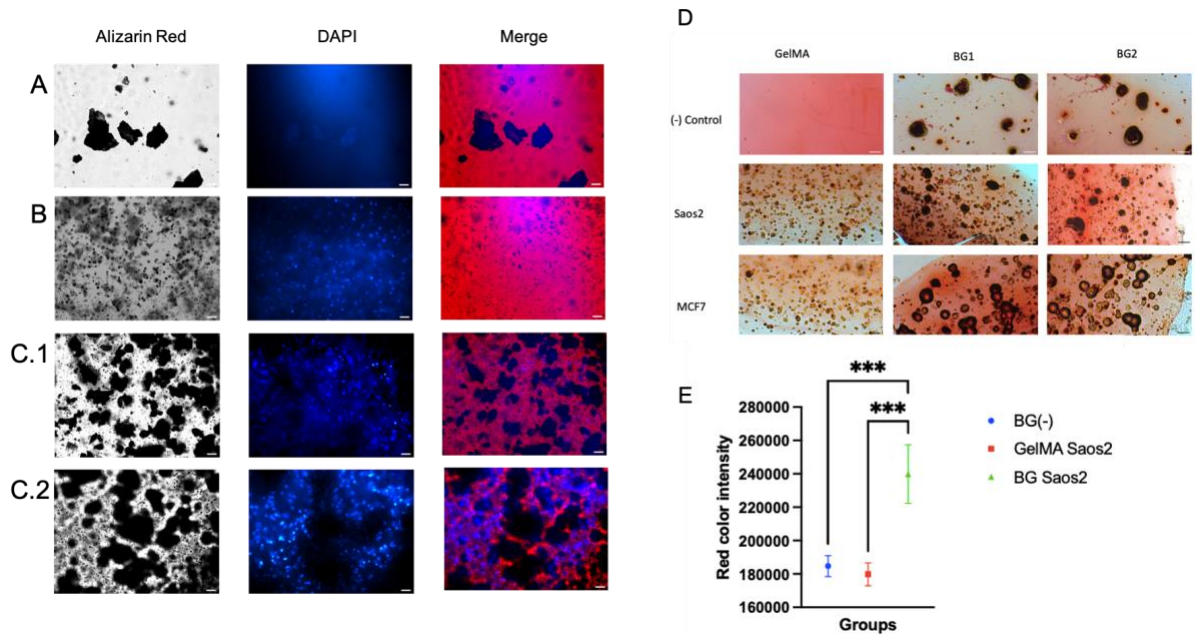


Figura 20. Análisis de microscopía óptica asociada a inmunofluorescencia de las estructuras celulares de Saos2 mediante tinción con rojo de alizarina y DAPI. A. Inmunofluorescencia con DAPI y tinción con rojo de alizarina de los hidrogeles sin células o control (-). B. Imágenes de las estructuras celulares cultivadas en 3D en GelMA. Compuesto BG (C.1 y C.2). D. Microscopía óptica directa con tinción de alizarin red, DBMP en color negro. Todas . Escala en 100 μ m. G. Gráfico histograma de medición de intensidad de color rojo que muestra diferencia significativa de mayor intensidad en cultivo DBMP y Saos2. Se registraron 3 imágenes en cada grupo con 3 experimentos independientes (n=9). Escalas a 100 μ m.

6.6 Caracterización de mineralización

Para comparar la diferencia entre la capacidad de mineralización de las células Saos2 y AD-MSCs, se validaron sus capacidades de mineralización en cultivo monocapa estándar en placa de cultivo y se mantuvieron en cultivo con medio osteogénico por 30 días (Fig. 21). A cada cultivo primario se les realizó citometría de flujo resultando en que las muestras biológicas fueron altamente positivas para la expresión fenotípica de CD73, CD90, CD44 y CD105, y altamente negativas para el antígeno de superficie específico del cóctel negativo (CD45,

CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR PE). La unión no específica, anticuerpo unido pero sin existir un epítipo específico, se descartó en un 100%, tanto en el cóctel de control de isotipo positivo como negativo.

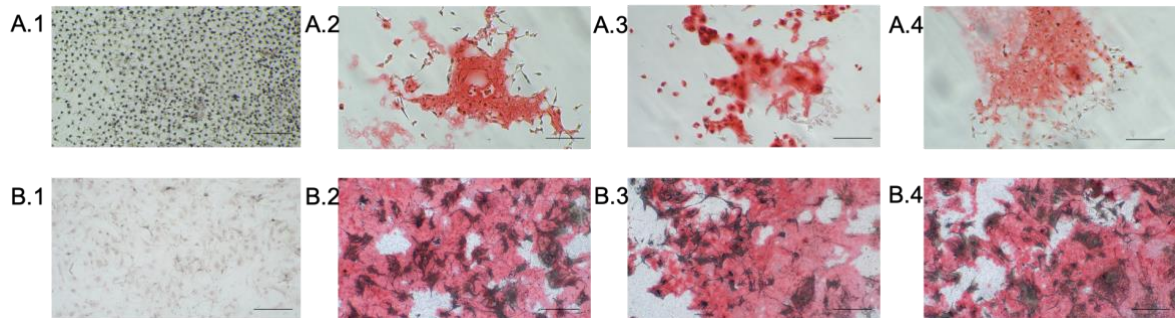


Figura 21. Imágenes de microscopía óptica directa 10x de ensayo de osteodiferenciación con medio osteogénico en cultivo por 30 días. A.1-A.4. Saos2. B.1-B.4. AD-MSCs. A.1 y B.1 Control de las células cultivadas con medio estándar. A2-4 y B.2-4. Cultivo con medio OST donde se aprecian los depósitos calcificados en rojo. Escalas a 200 μ m.

Se analizaron células AD-MSCs cultivadas en el hidrogel BG a 30 días para su observación mediante microscopía confocal con tinciones de inmunofluorescencia con DAPI y alizarin red para evaluar a nivel unicelular la relación de cercanía celular con las partículas DBMP (Fig. 23). En el ensayo se pudo encontrar células viables muy cercanas a los segmentos óseos de las DBMP. Posteriormente, se realizó un escaneo de un espesor del hidrogel para tener una visión de la presencia celular a nivel tridimensional.

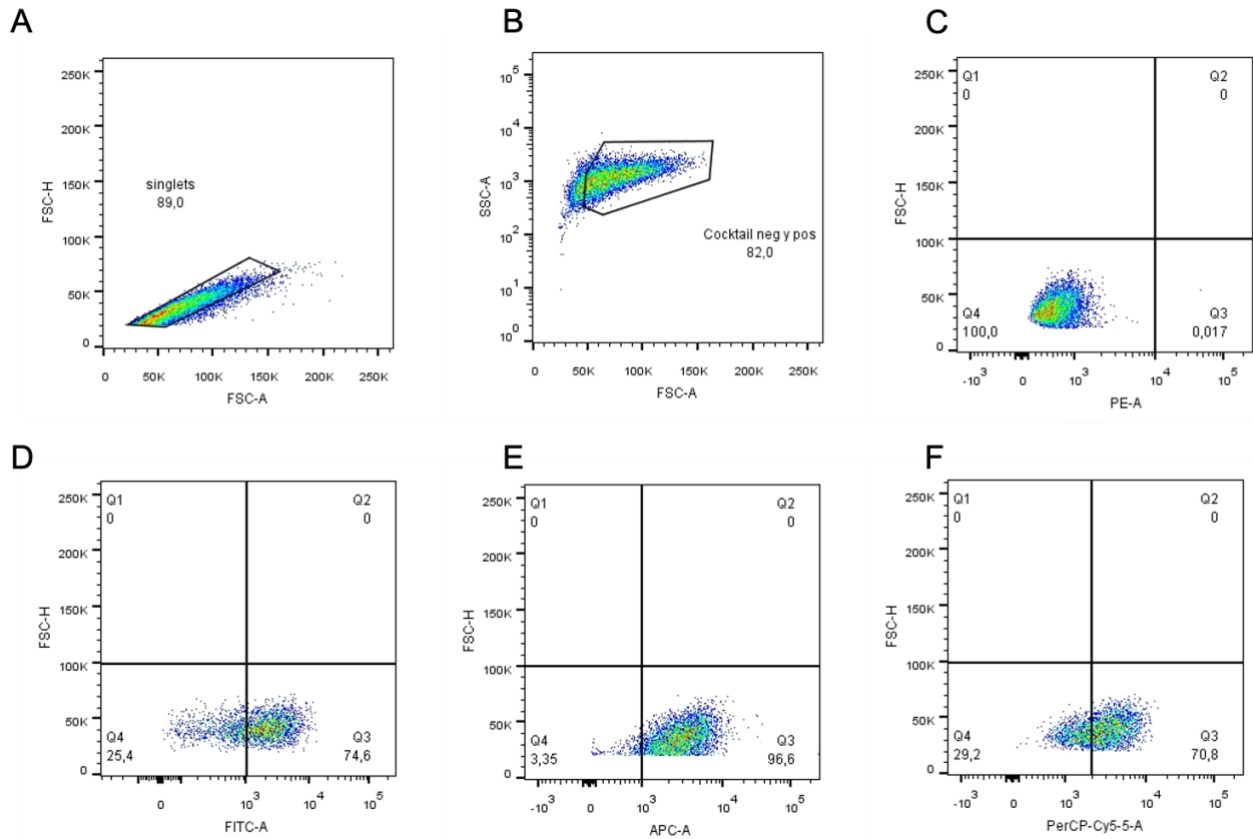


Figura 22. Imágenes de citometría de flujo para evaluación de marcadores de células madre mesenquimales. Se analizó un alto porcentaje, 89% (A), de la población de la muestra. Se observó una alta presencia de marcadores positivos (CD90, CD105, CD73) con el pico en el lado derecho del histograma (D, E y F). Se encontró lo contrario para el cóctel negativo (CD45, CD34, CD11b, CD19, CD45 y HLA-DR) como lo demuestra un pico en el lado izquierdo del gráfico (C). n=2.

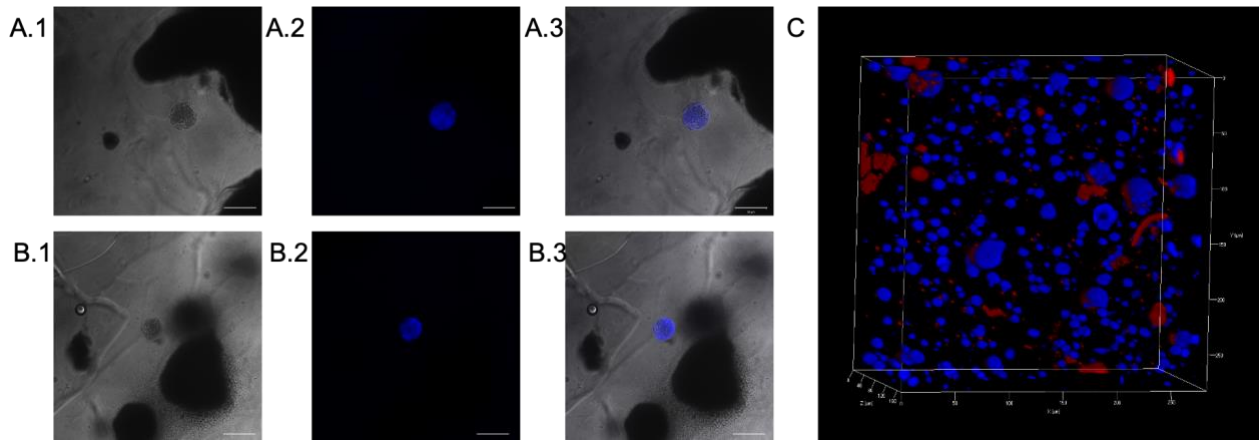


Figura 23. Microscopía de inmunofluorescencia para evaluar presencia celular en relación a las DBMP en hidrogeles compuestos BG a los 14 días. A y B muestra el análisis a nivel unicelular de una AD-MSC en cercanía con bloques de DBMP. C. Imagen de una reconstrucción 3D de varios planos escaneados por el microscopio en un área de 160 x 250 μm del constructo, rojo: DBMP, azul: Núcleo. Escalas en 50 μm .

6.7 Inmunofluorescencia

Posteriormente, se realizó una microscopía confocal de inmunofluorescencia añadiendo un anticuerpo para visualizar la presencia de fosfatasa alcalina después de 30 días de cultivo celular (Fig. 24). Se pudieron confirmar varias zonas con presencia de células en las muestras y fue común encontrarlas entre las micropartículas óseas.

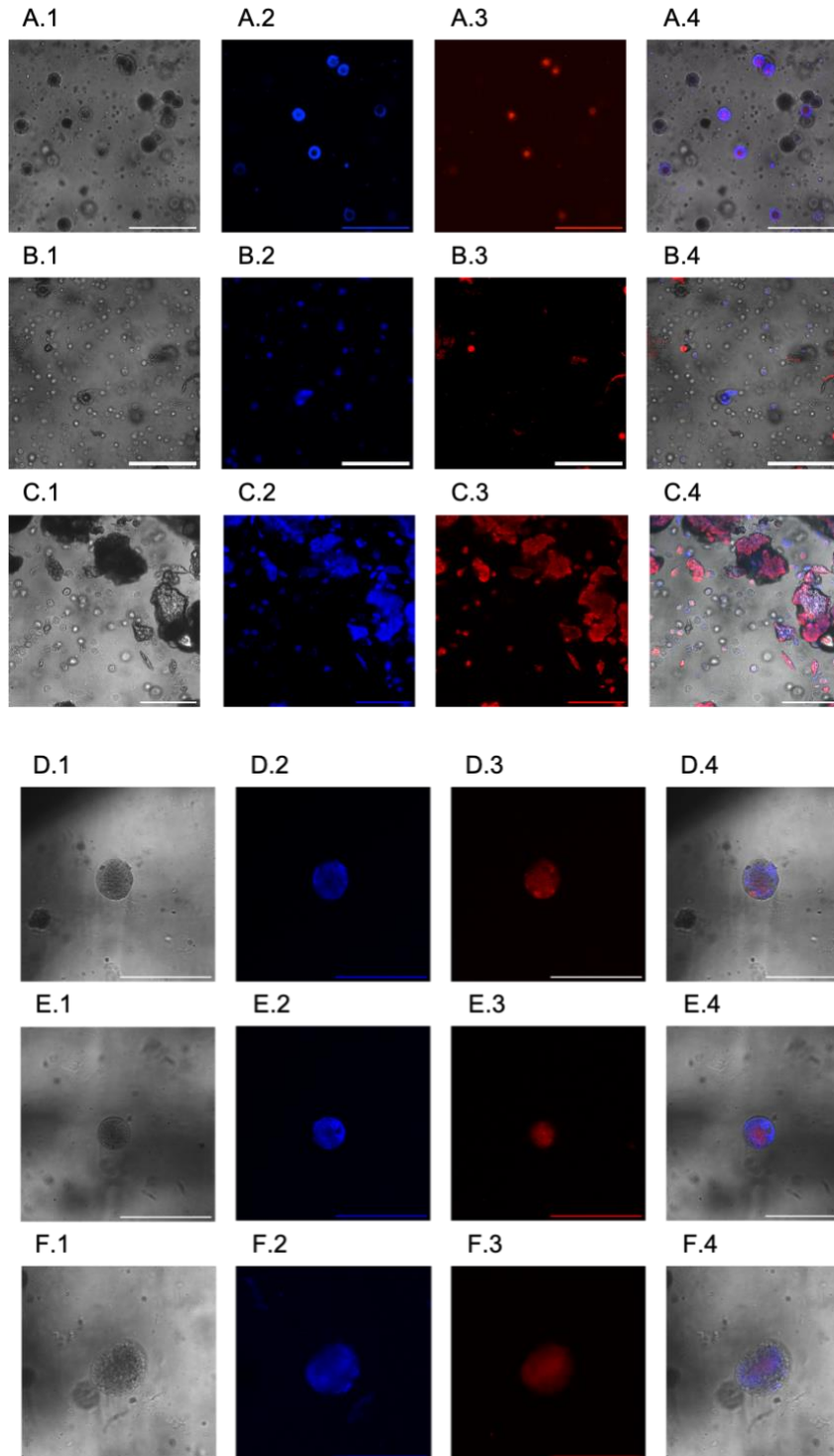


Figura 24. Microscopía de inmunofluorescencia confocal de células Saos2 (A-C) y ADMSCs (D-F) a los 30 días de cultivo celular 3D. A y D. Muestras de ensayos con GelMA, B, E, C y F con hidrogel compuesto BG. 1. Escala de grises, 2. Azul: DAPI, 3. Rojo: fosfatasa alcalina y 4. Merge. Escalas en 50 μm .

En general, las micropartículas óseas estaban muy teñidas con DAPI y parece que el hueso retiene diferentes compuestos fluorescentes, lo que dificulta la realización de algunas mediciones. Esto también estaba presente con la fosfatasa alcalina, que era muy intensa en las micropartículas óseas y en las células Saos2. Sin embargo, cuando examinamos un área de la muestra sin presencia cercana de micropartículas óseas, cultivos en GelMA, las células estaban muy marcadas con DAPI en una disposición de cultivo 3D común con mucha más presencia de color que la fosfatasa alcalina, lo que indica una presencia moderada de esta enzima en las muestras no óseas.

6.8 Análisis Reológico

Es crucial el disponer de una plataforma para estudiar los cambios en la MEC y las interacciones célula-MEC a lo largo del tiempo, a modo de poder tener bases estructurales medibles que se puedan correlacionar con otros indicadores moleculares y celulares. Para disponer de una base para realizar ensayos biomecánicos de un cultivo tipo tumor artificial, se compararon las diferencias biomecánicas entre las construcciones según hidrogel empleado a lo largo del tiempo, se sembraron MCF7 en grupos de hidrogeles de control (-), GelMA y compuesto BG para evaluar la rigidez después de 1, 14 y 28 días de cultivo celular mediante geometría con ensayos de frecuencia y amplitud (Fig. 25).

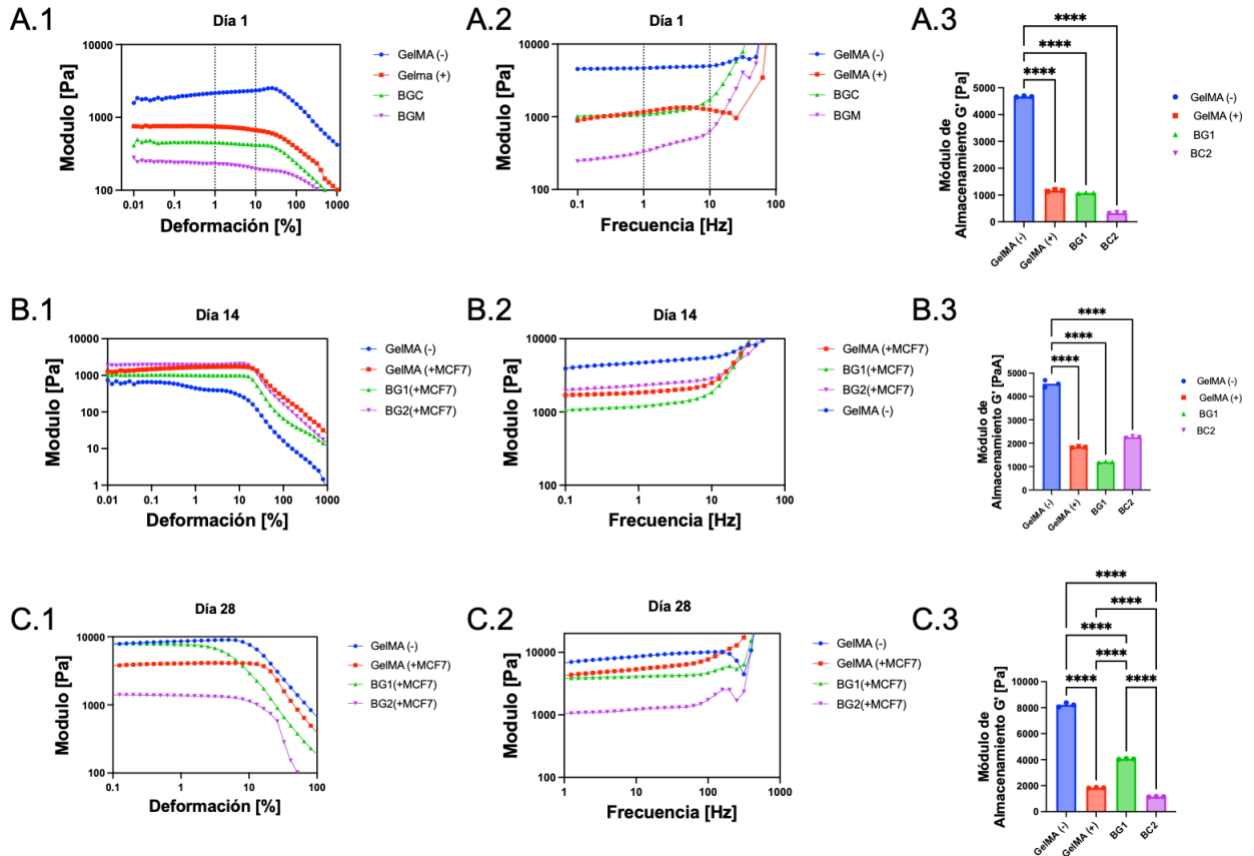


Figura 25. Gráficos de ensayos reológicos de los hidrogeles con línea celular MCF7. Cultivos a los días 1 (A.1-3), 14 (B.1-3) y 28 (C.1-3). Se estimó el módulo de almacenamiento o rigidez del hidrogel en los diferentes grupos, siendo el del control (-) con valores más altos de rigidez, pero con un aumento paulatina hasta llegar a los 2000 Pa aprox. Al día 28. Asteriscos muestran la diferencia estadística positiva. (Test ANOVA. $p=0,05$, ****: $<0,0001$).

En el gráfico anterior (Fig. 25) se puede ver que los hidrogeles GelMA sin células siguen siendo significativamente más rígidos que los hidrogeles con células, siendo el módulo de almacenamiento de 4000 Pa el (-) que aumenta con el tiempo alrededor de 8000. Hubo evidencia de que los hidrogeles con células tienen una influencia significativa en la rigidez general, lo que provoca una disminución en todas las muestras. Sin embargo, el tiempo produce un aumento sucesivo en la rigidez del módulo de almacenamiento, que es superior a 100 Pa el día 14 y aumenta hasta 2000 Pa el día 28. En conjunto, estos resultados proporcionan

información medible sobre la elasticidad de la matriz a lo largo del tiempo cuando las construcciones de células 3D se combinan con células de cáncer de mama y que, en general, la rigidez tiende a aumentar con el tiempo, especialmente en la formulación con hueso cortical.

6.9 Inmunohistoquímica

Para evaluar el comportamiento de la célula-MEC en los hidrogeles se realizó un cultivo 3D con las células MCF7 a 7 días, posterior a esto fueron fijadas y trasladadas a la unidad de histología para evaluar mediante inmunohistoquímica con 3 proteínas diferentes asociadas con el cáncer de mama (Fig. 26).

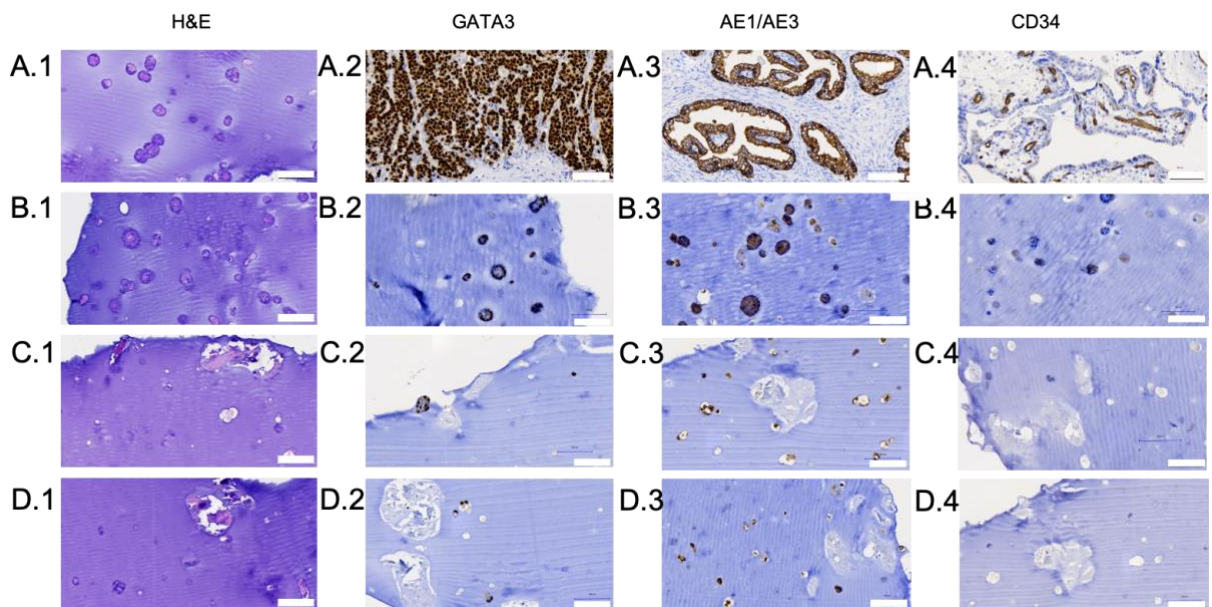


Figura 26. Microscopía óptica directa de ensayo de inmunohistoquímica de cultivo celular 3D con línea celular MCF7. A. controles positivos para H&E (A.1), tejido glándula mamaria (A.2), piel (AE1/AE3) y (A.4) células indiferenciadas (CD34). B. Cultivos en GelMA, C y D cultivos en compuesto BG. En color café: presencia de proteína marcada (A.2-D.2) tejido de origen mamario, (A.3-D.3) presencia de citoqueratinas y (A.4-D.4). Escalas en 100 μ m.

A partir de las imágenes ópticas, se puede ver que, con diferencia, la mayor formación de tipo organoides fue para las construcciones GelMA, se contó mucha más organización

celular en ausencia de componentes óseos y siendo altamente positivo para el factor de transcripción GATA3, gen asociado con células epiteliales mamarias. Esto también fue positivo para la presencia del anticuerpo AE1/AE3 que identifica dos epítomos presentes en la mayoría de las citoqueratinas epiteliales y que fue visible en varios sitios de las muestras. En general, los hidrogeles óseos no presentaron la misma intensidad que los hidrogeles GelMA en el punto final del ensayo y el anticuerpo fue positivo para las mismas proteínas y el cóctel resp. pero con menor intensidad, ya que la formación de organoides también disminuyó. La combinación de células MCF7 con micropartículas óseas no produjo un aumento en la expresión de proteínas, pero estas también fueron visibles en todas las muestras correlacionadas con el número de organoides presentes en las muestras de H&E. Como construcciones basadas en GelMA, la combinación GATA3 y AE1/AE3 estaba presente en los hidrogeles óseos, aunque la presencia del marcador CD34 era ligeramente visible en algunas pocas muestras en construcciones GelMA. En conjunto, estos resultados sugieren que es adecuado identificar características similares de biopsias de cáncer con organoides.

6.10 Toxicología “drug screening”

Para verificar la capacidad del hidrogel para comparar una respuesta toxicológica entre un cultivo celular en monocapa y en 3D, se realizó un ensayo de toxicidad IC50 con ambas líneas celulares bajo diferentes concentraciones de un quimioterapéutico común (docetaxel) que demostró resultados muy diferentes (Fig. 27). Se realizaron dos ensayos por línea celular para verificar la viabilidad después de 72 h de cultivo que mostraron una respuesta variable con concentraciones más altas.

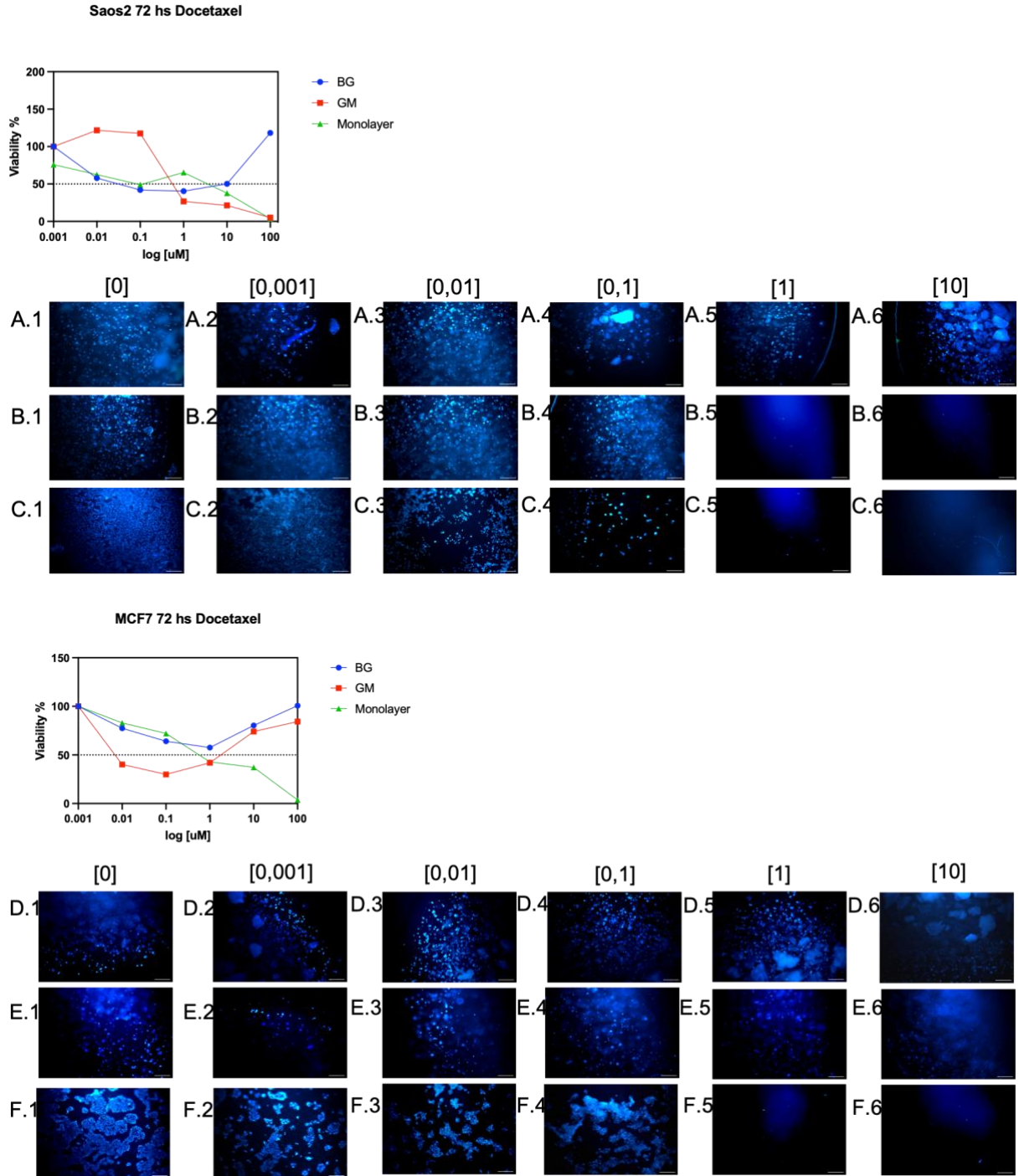


Figura 27. Ensayo de IC_{50} con dos líneas celulares (A) Saos2 y (B) MCF7 con el quimioterapéutico docetaxel a diferentes concentraciones por 72 h. A.1 y A.2 Gráficos de IC_{50} en células Saos2. B.1 y B.2 Gráficos de IC_{50} en células MCF7. Se presentan los valores como la media de cada grupo con 6 experimentos independientes (n=18). Más abajo se muestran

imágenes de inmunofluorescencia con DAPI de Saos2 (A.1-C6) a diferentes concentraciones y los mismo en lado derecho (D.1-F6) con MCF7. Escalas en 100 μm .

Las construcciones celulares 3D demuestran una variabilidad en los resultados de viabilidad celular con el uso del quimioterapéutico, siendo mayor la capacidad de supervivencia en las células de cáncer de mama que evidenciaron un aumento en su viabilidad desde la concentración de 1 μM en ambos grupos de cultivo celular 3D, tanto en la formulación con tejido óseo como en su control positivo con GelMA. Esto no coincidió con los resultados del cultivo con Saos2, donde se evidenció un aumento en la viabilidad en la concentración 10-100 μM , a diferencia del grupo cultivado en GelMA y monocapa. Finalmente, se pudo observar que la presencia de hueso descelularizado tuvo un efecto protector en las líneas celulares contra el fármaco empleado. Este efecto protector también fue evidenciado en la línea de MCF7 con GelMA, no así para las células Saos2.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se diseñó y fabricó un nuevo hidrogel compuesto con aplicaciones como andamiaje celular para biofabricar modelos de investigación *in vitro* de cáncer óseo en un entorno tridimensional. Este se desarrolló a través de un método innovador para fabricar andamios porosos 3D con hueso descelularizado y microparticulado de origen humano, con potencial de ser usado como plataforma de alto rendimiento y/o como biotinta de bioimpresión. El componente biológico de micropartículas óseas se obtuvo a partir de cabezas femorales donadas voluntariamente por pacientes del Hospital Regional de la Ciudad de Concepción para garantizar la representatividad de la MEC del hueso humano. Se trabajó con diferentes zonas anatómicas óseas, cortical y medular, con el fin de evaluar su biocompatibilidad. Los andamios fabricados mostraron excelente biocompatibilidad, y su forma y estructura favorecieron la adhesión y proliferación celular. La evaluación de la viabilidad de distintos tipos celulares en los andamios tipo hidrogel, realizada en distintos intervalos de tiempo, demostró que los compuestos basados en DBMP y GelMA mantienen una buena compatibilidad celular hasta las 4 semanas de cultivo.

El tratamiento exitoso del cáncer de hueso y su metástasis sigue siendo un desafío importante para la atención médica nacional y mundial debido a la complejidad de la biología tumoral, especialmente una vez que se ha extendido por metástasis al tejido óseo. Una vez en el hueso, las células tumorales presentan alteraciones genéticas que mejoran la adaptabilidad, la invasividad y la supervivencia en el entorno óseo; y también cambios proteómicos que facilitan la degradación ósea, la evasión inmunológica y la interacción con las células residentes en el hueso. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar y caracterizar un nuevo andamiaje celular que imite a la MEC ósea y que tenga la capacidad de ser imprimible en 3D, compuesta de GelMA mezclado con DBMP derivadas de hueso humano y diseñada

para crear una plataforma para cultivar células tumorales óseas que repliquen la mayor parte de las características morfológicas y funcionales del entorno *in vivo*.

El hueso humano descelularizado, como un tipo de injerto óseo, es un material biológico que todavía se considera como la alternativa más efectiva y ampliamente utilizada para simular la matriz MEC ósea (120). Para obtener este tipo de matriz con las cualidades innatas del hueso, se pueden utilizar tecnologías de descelularización para eliminar todas las células y componentes inmunogénicos, obteniendo una matriz MEC con las propiedades microambientales del tejido nativo (135). Ya se ha reportado previamente que el injerto óseo descelularizado cultivado con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, tiene el potencial para generar osteodiferenciación (191), confirmando la capacidad de osteogénica del andamio descelularizado para estrategias de bioingeniería ósea (118). En este estudio, se realizó la combinación de hueso descelularizado con GelMA para desarrollar un andamio que pueda ser imprimible y adecuado para ensayos sistematizados, como bioimpresión, lo cual se logró mediante micropulverizado del hueso procesado y, posteriormente, las micropartículas se emulsionaron con alcohol polivinílico como agente estabilizador para mejorar la dispersión de las micropartículas en el hidrogel.

Múltiples enfoques similares de biotintas han sido empleados en distintos estudios recientemente. Özenler et al. (189) utilizaron una mezcla de gelatina y hueso descelularizado obtenido del fémur de conejo. Por su parte, Marturano-Kruik et al. (186) diseñaron un andamio tridimensional de poliestireno que incorporaba hueso descelularizado proveniente de los cóndilos metacarpianos de pantorrilla. Además, Parthiban et al. (190) desarrollaron un nuevo enfoque basado en hueso humano descelularizado y desmineralizado, logrando posteriormente un metacrilato de la matriz ósea. En este contexto, esta es la primera vez que se propone una biotinta basada en micropartículas de hueso humano descelularizado. Sin embargo, existen antecedentes en los que se ha empleado hueso descelularizado de distintas especies, como vaca (191), cerdo (192) y ratón (193).

El procesamiento del tejido óseo hasta la obtención de micropartículas genera, a su vez, componentes en el rango nanométrico (de 1000 nm a 5 nm). En la estructura molecular del tejido óseo, los cristales de hidroxiapatita se encuentran tanto dentro como entre las fibrillas de colágeno. Estas fibrillas mineralizadas presentan un diámetro característico de entre 50 y 200 nm y una longitud aproximada de 1000 nm. La integración de placas minerales de hidroxiapatita en la estructura de las fibrillas de colágeno mineralizadas contribuye significativamente a las propiedades mecánicas del hueso (194). Hasta la fecha, solo se ha identificado un estudio previo relacionado con la obtención de nanopartículas a partir de tejido óseo. Sin embargo, dicho estudio empleó material biológico obtenido de ceniza ósea, lo que difiere del enfoque utilizado en el presente trabajo, ya que la materia prima fue sometida a un proceso térmico a 1100 °C antes de su molienda (195). Según la revisión de la literatura, este estudio representa el primer reporte de nanopartículas aisladas mediante un procesamiento mecánico de la MEC. Además, estas nanopartículas presentan una morfología congruente con los cristales de hidroxiapatita, lo que refleja el ordenamiento jerárquico característico del tejido óseo humano.

La combinación de DBMP con PVA permite que el compuesto mejore la dispersión homogénea asegurando una cantidad similar de hueso en cada muestra y el empleo de GelMA brinda la capacidad de ser impreso sistemáticamente en cualquier placa de cultivo celular de muestreo estándar. La formulación final del hidrogel presentó una composición química estable después de ser mezclado y capacidades óptimas de impresión. Además, se confirmó la reacción de reticulación (picos en la región de 2800–3100 cm^{-1}) por estiramiento C-H de los grupos terciarios $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}$. Estos datos son relevantes para la formación de enlaces que tienen influencia en las propiedades mecánicas del hidrogel, incluyendo su rigidez, elasticidad y estabilidad. Con los datos reológicos obtenidos se pudo determinar la temperatura ideal para que este andamio sea inyectado o impreso entre 20 a 23°C, una 25°C común. En este estudio, se encontró que la adición de DBMP causa una disminución en la capacidad de hinchamiento

del hidrogel. Además, y contrariamente a las expectativas, se identificó una diferencia significativa en la rigidez entre GelMA y compuestos BG. Se puede inferir que la adición de DBMP en GelMa disminuye el proceso de reticulación, disminuyendo a su vez su capacidad de formar cadenas poliméricas para retener agua y provoca una menor rigidez reduciendo su comportamiento pseudoplástico de adelgazamiento por cizallamiento. Aunque se encontró una disminución en la viscosidad una vez que se agregó las DBMP en el hidrogel, los resultados generales demuestran que disponemos de un andamio más rígido que el reportado recientemente por Özenler et al. (192). Este grupo reportó un enfoque similar de andamios que reportaron viscosidades entre 91.70 y 170.67 Pa.s y los resultados presentados aquí varían de 390.75 a 1635,06 Pa.s con una rigidez entre 1500 a 2000 Pa, aproximadamente. Previamente, Engler et al. (81) obtuvieron un ECM “osteóide” (hueso pre-mineralizado) de osteoblastos con una rigidez $\sim 27 \pm 10$ kPa. Por lo tanto, es probable que la rigidez del hidrogel óseo sirva para generar un modelos de enfermedad ósea, como la osteoporosis y las lesiones osteolíticas (193, 194). Un hallazgo interesante en la caracterización fisicoquímica se realizó mediante microscopía SEM/EDS para la confirmación de la porosidad del hidrogel que identificó calcio dentro del espesor del hidrogel y con presencia en acúmulos adentro de las estructuras porosas. Estos resultados concuerdan con estudios recientes que indican que en un andamio óseo funcional es necesario producir un tamaño de poro de 120 a 325 μm de diámetro (110), lo que es consistente con nuestros hallazgos que mostraron un tamaño de poro entre 100 a 300 μm .

La biocompatibilidad se validó mediante diferentes ensayos para la cuantificación de la viabilidad celular, ya sea por imágenes ópticas, de inmunofluorescencia o por mediciones moleculares, en estas mediciones no se registraron resultados tóxicos, lo que confirma la capacidad del hidrogel para facilitar que las células puedan unirse y proliferar en el andamio durante varios días (hasta 30 días). Como los hidrogeles óseos son completamente transparentes y con un espesor de 400 μm , no fue factible visualizar células entre las DBMP

mediante microscopía óptica, ya que la opacidad de estas micropartículas óseas pueden enmascarar a las células si están adheridas. Se sabe que la GelMA deriva de la gelatina y que conserva motivos naturales de unión a las células, tales como RGD. La matriz ósea también contiene péptidos RGD, esenciales para la adhesión, diferenciación y función de las células óseas, y están presentes en una familia de pequeños ligandos de unión a integrinas, glicoproteínas ligadas a N (SIBLING). Este grupo de glicoproteínas se han identificado por un grupo de genes que incluyen osteopontina, sialoproteína ósea, proteína 1 de la matriz dentinaria y sialofosfoproteína dentinaria (195, 196). Por lo que se hipotetizaba que al emplear DBMP en el polímero de GelMA presentarían estos péptidos de unión generando un soporte para el cultivo celular 3D. Para estas evaluaciones se realizaron análisis con inmunofluorescencia e histología con células propias o asociadas al tejido óseo como pre-osteoblastos, cáncer de mama (MCF7), osteosarcoma y células madre mesenquimales. La línea celular MCF7 corresponde a una línea triple (+) y se decidió utilizar esta línea para la validación, ya que hay evidencia que indican que los cánceres de mama con receptores hormonales positivos (HR+), que incluyen los triples positivos (ER+, PR+, HER2+), tienen una mayor tendencia a la metástasis ósea en comparación con otros subtipos. Por ejemplo, un estudio señaló que el 87,2% de los pacientes con metástasis ósea eran receptores hormonales positivos (197).

Los ensayos de biocompatibilidad y análisis por microscopía permitieron enfocar varias estructuras celulares en diferentes ubicaciones de cada muestra. Las células de cáncer de mama se identificaron por la presencia de estructuras más parecidas a organoides, más dispersas y menos agrupadas en células de osteosarcoma (198-200). Fue posible identificar claramente los organoides celulares cerca y alrededor de DBMP hasta 35 días de cultivo, lo que demuestra la biocompatibilidad de los fragmentos óseos en la muestra. No se registró una degradación completa del hidrogel óseo en los intervalos de tiempo evaluados, pero pudimos observar la migración celular fuera del hidrogel. En el ensayo de citotoxicidad, se encontró que

el tiempo causaba un aumento en la viabilidad celular, siendo mayor a los 14 días con una disminución leve después. Un factor que podría explicar esta observación es que después de 14 días, los hidrogeles comenzaron a perder peso en el medio de cultivo celular, como se informó previamente (201), lo que puede tener efectos en la viabilidad celular posterior. Además, hubo variabilidades de la muestra en la viabilidad, se empleó una concentración de 1000 células/ μ l y las células pueden carecer de una distribución homogénea antes del muestreo, lo que podría haber influido en las medidas finales. Posiblemente, el hallazgo clínicamente más relevante fue la implementación exitosa del flujo de trabajo de histopatología con las muestras, se procesaron efectivamente como tejido de biopsia que se puede transferir para utilizar células derivadas del paciente en el futuro como se informó anteriormente (202).

Un objetivo inicial del proyecto fue identificar estructuras celulares entre el hueso descelularizado y no descalcificado, ya que esto puede obstaculizar las células debido a su opacidad bajo el análisis del microscopio. Una combinación de tinción de rojo de alizarina con DAPI se empleó para este propósito, demostrando una presencia celular bien definida alrededor de DBMP, ambas son técnicas comunes que se emplean habitualmente en estudios de ingeniería de tejidos óseos (203-209) y ambas se han empleado con células de osteosarcoma (210). Aunque, este es el primer informe con ambas técnicas fusionadas para diferenciar células de osteosarcoma humano. Otro hallazgo de la tinción de construcciones con rojo de alizarina fue la diferencia de colores, las células tienden a un color más rojo-naranja que el hueso que se visualizó más rojo-negro oscuro y que los compuestos BG demostraron un color significativamente más rojo que GelMA y BG sin células. De acuerdo con el presente resultado, estudios previos han descrito un aumento significativo en la actividad de mineralización cuando las células de osteosarcoma (MG63) se cultivan en nanofibras de gelatina/policaprolactona/hidroxiapatita (65).

Se evaluó el potencial del hidrogel de generar una osteodiferenciación y actividad mineralizante en células de osteosarcoma y MSCs de tejido adiposo. En primer lugar se

evaluaron diferentes tipos celulares, comparando su reacción frente al medio osteogénico versus medio estándar, demostrando su capacidad de depositar matriz mineralizada con la estimulación desde el medio de cultivo. Se observó que ambas células tuvieron un comportamiento mineralizante con la presencia de actividad de la fosfatasa alcalina en los hidrogeles compuestos BG. En relación al medio OST, se conoce que los glucocorticoides aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y los niveles de ARNm en células osteoblásticas humanas (211) y con células de osteosarcoma Saos2 (212). En las imágenes realizadas por microscopía confocal se pudo apreciar la presencia del marcador de fosfatasa alcalina en células madre y de osteosarcoma en ausencia de medio osteogénico. Posiblemente, la presencia de DBMP en el hidrogel potenciaron la respuesta mineralizante de ambos tipos celulares. La presencia de la fosfatasa alcalina en diferentes etapas de la maduración osteoblástica fue demostrada (213), durante la fase temprana de la diferenciación osteoblástica, específicamente en la fase de maduración y mineralización de la matriz ósea. Esta enzima presenta una amplia gama de funciones que van desde el control de la proliferación celular, las interacciones célula-matriz y la mediación de la deposición de hidroxiapatita. La expresión de la fosfatasa alcalina es un marcador establecido desde hace mucho tiempo del fenotipo de osteoblastos (214, 215). La fosfatasa alcalina se expresa temprano en el curso de la maduración de los osteoblastos, pero la actividad se mantiene hasta que las células maduran finalmente en osteocitos (216).

El cáncer óseo tiene un efecto alterado en las diferentes vías de señalización del crecimiento, la proliferación y el metabolismo (217-219). Estas alteraciones tienen una estrecha relación con el microambiente de la MEC que las rodea, generando cambios biomecánicos que influyen en la fisiopatología del cáncer y la metástasis (220). En este estudio, se analizó la rigidez del tejido artificial tumoral de cáncer de mama cultivado a diferentes intervalos de tiempo demostrando una disminución en la rigidez del constructo con la presencia de células usando la matriz 3D. Esto puede deberse en parte a que varios estudios

han demostrado que las células tumorales tienden a ser más blandas que sus contrapartes benignas (221-223) y diferentes estudios han demostrado que la agresividad y el potencial metastásico de las células de cáncer de mama se asocian a una disminución de su rigidez, debido a cambios en su citoesqueleto y estructuras internas. En general, las células pueden modificar su respuesta en función de la rigidez del sustrato, en este caso del andamiaje celular, modificando su propia rigidez, organización del citoesqueleto, adhesión y motilidad (224-227). Entre estas moléculas de adhesión celular a la MEC, las integrinas desempeñan un papel importante, detectando y traduciendo los cambios en la MEC en cambios en la actividad de la célula, un proceso conocido como mecanotransducción (228, 229). Se pudo observar que a pesar de tener una disminución de la rigidez el día 1 muy inferior al grupo control (-), se evidenció una constancia o leve incremento en la rigidez en el tiempo, lo que podría tratarse de cambios en MEC con un aumento de la expresión de varias proteínas de la MEC del tejido estromal mamario, como el colágeno y la fibronectina (230-232). El aumento de la deposición y la reticulación del colágeno conduce a un aumento de la rigidez de la MEC que, a su vez, promueve las adherencias focales, mejora la señalización de integrinas y favorece la incidencia tumoral (232). De hecho, la palpación clásica de los tumores mamarios ha demostrado una correlación entre la rigidez del tejido y la progresión del cáncer de mama, que se ha demostrado además con otras técnicas (233, 234). Por lo tanto, la forma en que las células cancerosas perciben la rigidez de la matriz extracelular podría estar asociada a su invasividad.

Es fundamental que una plataforma de investigación biomédica tenga correlación clínica y que pueda generar datos de manera integrada con los procesos de salud rutinarios, con el objetivo de desarrollar una tecnología focalizada a una traslación clínica. Por esto, se evaluó la factibilidad de tratar los constructos de tumor artificial al proceso histológico, donde se observó la síntesis de varios marcadores de inmunohistoquímica utilizados clínicamente para la detección y características del origen del tumor primario, tales como el kit de detección de citoqueratinas (235) y de tejido mamario (236-238). Estos fueron reproducidos por la línea

celular en el cultivo 3D permitiendo obtener datos relevantes del cáncer de mama, tales como la expresión de GATA3 (239). Este es un factor de transcripción que participa en la diferenciación celular y la respuesta a las citocinas. Además, en las neoplasias malignas, GATA3 promueve la diferenciación de las células tumorales y revierte la transición epitelial-mesenquimal. Su expresión elevada retarda la metástasis en modelos de cáncer de mama (239), mientras que los niveles reducidos de GATA3 están asociados con la aparición de resistencia a los medicamentos en el cáncer de mama (240). Por lo que es beneficioso si el hidrogel reproduce la interacción célula – matriz, validando así su utilidad al imitar los comportamientos del escenario *in vivo*.

Entre las innovaciones en plataformas de diagnóstico e investigación con mayor potencial de impacto traslacional en la biotecnología médica se encuentran la ingeniería de tejidos basada en biomateriales y los sistemas microfisiológicos conocidos como órgano-en-chip. Estas plataformas ofrecen una reproducción más precisa del entorno *in vivo* en comparación con los modelos convencionales de cultivos en monocapa y los modelos animales murinos. Además, para el desarrollo de estudios diagnósticos personalizados, es fundamental contar con una plataforma capaz de recibir tejido tumoral y permitir su cultivo en laboratorio, con el objetivo de optimizar estrategias de medicina personalizada. En este estudio se evaluó la capacidad del hidrogel compuesto a modo de estudio toxicológico similar a un IC₅₀. En este se encontró una gran diferencia versus el modelo en monocapa que presentó una mayor respuesta al quimioterapéutico. Se ha estudiado previamente que las interacciones de las células de leucemia mieloide aguda con la MEC pueden generar respuestas para sortear el tratamiento de quimioterapia (241). Por lo tanto en investigación oncológica, es necesario no solo el estudio de los mecanismos intrínsecos de las células, sino que también es necesario el evaluar la respuesta de la resistencia a la quimioterapia en su microambiente tumoral (148).

Uno de los objetivos de este proyecto fue el desarrollar un andamiaje celular 3D que imite el tejido óseo con fines de sistematización por bioimpresión y de inyección en sistemas

de microfluidos como los *organ-on-chip*. Estas capacidades se generaron y validaron con el hidrogel compuesto BG para la realización de estudios sistemáticos automatizados de evaluación de quimioterapéuticos en tejido artificial tumoral. En base a los resultados obtenidos de las validaciones del hidrogel compuesto BG, podemos afirmar que se confirma la hipótesis de que es posible desarrollar un andamiaje celular 3D a partir de un hidrogel compuesto de matriz ósea biológica que proporcione un microambiente biomimético, permitiendo la biofabricación de modelos *in vitro* más precisos de tejido óseo y su aplicación en estudios de cáncer óseo.

En base las validaciones del hidrogel, se pueden concluir algunas recomendaciones para continuar desarrollando y agregando valor a la tecnología. En cuanto al diseño industrial, se recomienda mejorar la polidispersión de las DBMP disminuyendo el tamaño de las micropartículas, a modo de homogenizar el compuesto evitando que decanten. Para esto se puede reducir el tamaño de las DBMP hasta los 50 μm y también se podría testear el uso de agentes tensioactivos, tales como el Tween 20, Pluronic F127 y lecitina, ya que al mejorar la homogenización se asegura que en cada muestra se mantengan las mismas concentraciones de DBMP y una mayor sistematización de los resultados.

Para generar un modelo de cáncer óseo que pueda entregar información fidedigna del entorno *in vivo*, es necesario la utilización de células primarias obtenidas desde biopsias o muestras de pacientes para su integración con el hidrogel compuesto en constructos de tejido artificial tumoral. Estas muestras también ofrecen un modelo clínicamente más relevante para probar nuevas terapias. La mayoría de los estudio celulares *in vitro* se realizan tradicionalmente utilizando líneas celulares transformadas o inmortalizadas. Estas se han cultivado durante muchas generaciones, lo que ha dado lugar a una importante variación de sus características genéticas, epigenéticas y fisiológicas, lo que significa que no son un buen modelo celular para imitar el *in vivo* humano (18). La adaptación de muestras de células primarias derivadas de pacientes, así como muestras de tejido humano fresco, para

aplicaciones de investigación traslacional *in vitro* tiene como objetivo superar muchas de las desventajas del uso de líneas celulares transformadas para el descubrimiento de fármacos.

En base a los resultados de inmunofluorescencia con células de osteosarcoma y células madre, donde se apreció un marcaje de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, se abren nuevas oportunidades de estudio de osteodiferenciación y promoción de la actividad mineralizante en base al cultivo 3D con el hidrogel compuesto BG. Previamente, ya se han caracterizado diversas respuestas osteogénicas en diversos andamiajes celulares con la identificación de expresión génica, tales como osteopontina, osteocalcina, sialoproteína ósea, colágeno tipo I y RUNX2, entre otras. Además, también existen otras proteínas relevantes como los proteoglicanos, tales como versican, decorin y biglican y glicoproteínas, tales como osteonectina, osteopontina y sialoproteína ósea. Los análisis *in vitro* indican claramente que el momento y la ubicación de la expresión de las proteínas de la matriz ósea están controlados por las células del linaje osteoblástico a medida que progresan hacia la maduración. Estudiar estas expresiones y síntesis proteicas es de gran relevancia, ya que estas exhiben una amplia gama de funciones que van desde el control de la proliferación celular, las interacciones célula-matriz y la mediación de la deposición de hidroxapatita. La expresión ectópica de las proteínas de la matriz ósea también puede desempeñar un papel importante en estados patológicos como la metástasis ósea en ciertas formas de cáncer y aterosclerosis (37).

Este proyecto ha logrado aportes al campo o disciplina de la ingeniería de tejidos y biomateriales con el desarrollo de un nuevo hidrogel compuesto con un principio activo biológico de hueso humano descelularizado micropulverizado para ser utilizado en plataformas sistematizadas como la bioimpresión. Hasta la fecha, no se han encontrado otros reportes de una estrategia similar utilizando hueso humano y GelMA, tampoco de la presencia de nanopartículas obtenidas desde un procesamiento, por lo que existe un grado de invención de la tecnología que debe evaluarse para su desarrollo comercial y de propiedad intelectual. El uso del hidrogel compuesto BG como andamio celular 3D con micropartículas óseas permite

desarrollar modelos de enfermedades más precisos de cáncer óseo *in vitro*, ya que permiten estudiar la proliferación y migración celular, así como el efecto de tratamientos (quimioterapia, biomateriales regenerativos). Además, permite la generación de modelos de regeneración ósea que se utilizan para evaluar la capacidad de nuevos materiales y andamios para promover osteogénesis y formación de tejido mineralizado. El hidrogel también fue validado para estudios de toxicidad y farmacología, lo que se pueda ampliar a otras enfermedades de alta prevalencia, tales como la osteoporosis, para evaluar el impacto de fármacos en el tejido óseo.

El desarrollo de un andamiaje celular con enfoque en las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), específicamente en reemplazo de investigación animal, tiene una relevancia significativa en el ámbito científico, ético y tecnológico, particularmente en la investigación biomédica y en la ingeniería de tejidos. El principio de reemplazo tiene como objetivo sustituir el uso de animales en experimentación mediante métodos alternativos que sean igualmente efectivos para la investigación. El desarrollo de andamios celulares 3D es clave porque permiten replicar entornos fisiológicos *in vitro* de manera más precisa que los modelos animales, lo que los convierte en una excelente alternativa para estudiar procesos biológicos y patologías. El prescindir de modelos animales contribuye a mejorar la predicción de las respuestas biológicas humanas, lo que reduce errores y fracasos en estudios que suelen ocurrir debido a diferencias entre modelos animales y humanos. Por otro lado, el desarrollo de andamios celulares con enfoque en reemplazo reduce la dependencia del uso de animales vivos en estudios preclínicos, lo que responde a las preocupaciones éticas sobre el sufrimiento y la explotación animal en la investigación. Los modelos de andamios celulares 3D reducen los costos asociados al mantenimiento de animales en laboratorios. Y ofrecen un tiempo de estudio más corto con mayor control de variables experimentales en comparación con estudios *in vivo*.

VIII. CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis de trabajo planteada. Se desarrolló un hidrogel compuesto tipo biotinta para impresión 3D, formulado a partir de gelatina metacrilada y micropartículas óseas descelularizadas. Su diseño biomimético, inspirado en la composición del hueso humano, integra biominerales y biopolímeros que replican la estructura y funcionalidad del tejido osteoide, demostrando que este biomaterial puede ser utilizado como una plataforma *in vitro* versátil, con propiedades viscoelásticas y perfiles de biodegradación ajustables.

La reducción del tamaño de las micropartículas óseas favorece una distribución homogénea dentro de la matriz del hidrogel, potenciando así su desempeño como andamiaje tridimensional para el cultivo celular. Los ensayos de biocompatibilidad revelan una alta viabilidad celular, confirmando la idoneidad del hidrogel para aplicaciones en estudios celulares y moleculares.

En conjunto, con los resultados obtenidos podemos proponer al nuevo biomaterial como una herramienta prometedora en el campo de la ingeniería de tejidos músculo-esqueléticos, en particular para la biofabricación de tejido óseo. Además, su uso como modelo *in vitro* ofrece una alternativa válida que podría contribuir a la reducción del empleo de modelos animales en investigaciones de regeneración ósea y evaluación de biomateriales.

IX. REFERENCIAS

1. Cieza A, Causey K, Kamenov K, Hanson SW, Chatterji S, Vos T. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2021;396(10267):2006-17.
2. Williams A, Kamper SJ, Wiggers JH, O'Brien KM, Lee H, Wolfenden L, et al. Musculoskeletal conditions may increase the risk of chronic disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *BMC Med*. 2018;16(1):167.
3. El-Tallawy SN, Nalamasu R, Salem GI, LeQuang JAK, Pergolizzi JV, Christo PJ. Management of Musculoskeletal Pain: An Update with Emphasis on Chronic Musculoskeletal Pain. *Pain Ther*. 2021;10(1):181-209.
4. Makitie O, Zillikens MC. Early-Onset Osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 2022;110(5):546-61.
5. Peng X, Guo W, Ren T, Lou Z, Lu X, Zhang S, et al. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e58361.
6. Runoldsdottir HL, Sigurdsson G, Franzson L, Indridason OS. Gender comparison of factors associated with age-related differences in bone mineral density. *Arch Osteoporos*. 2015;10:214.
7. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
8. Wang C, Zheng H, He JW, Zhang H, Yue H, Hu WW, et al. Genetic polymorphisms in the mevalonate pathway affect the therapeutic response to alendronate treatment in postmenopausal Chinese women with low bone mineral density. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(2):158-64.
9. Day RS. What Tumor Dynamics Modeling Can Teach us About Exploiting the Stem-Cell View for Better Cancer Treatment. *Cancer Inform*. 2015;14(Suppl 2):25-36.
10. Schlander M, Hernandez-Villafuerte K, Cheng CY, Mestre-Ferrandiz J, Baumann M. How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment. *Pharmacoeconomics*. 2021;39(11):1243-69.
11. Guinn D, Wilhelm EE, Shoulson I. Reasons for Premature Conclusion of Late Phase Clinical Trials: An Analysis of ClinicalTrials.gov Registered Phase III Trials. *Ther Innov Regul Sci*. 2020;54(1):232-9.
12. Arrowsmith J, Miller P. Trial watch: phase II and phase III attrition rates 2011-2012. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(8):569.
13. Nam KH, Smith AS, Lone S, Kwon S, Kim DH. Biomimetic 3D Tissue Models for Advanced High-Throughput Drug Screening. *J Lab Autom*. 2015;20(3):201-15.
14. Patterson EA, Whelan MP, Worth AP. The role of validation in establishing the scientific credibility of predictive toxicology approaches intended for regulatory application. *Comput Toxicol*. 2021;17:100144.
15. Knight A. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor human clinical and toxicological utility. *Altern Lab Anim*. 2007;35(6):641-59.
16. Doncheva NT, Palasca O, Yarani R, Litman T, Anthon C, Groenen MAM, et al. Human pathways in animal models: possibilities and limitations. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(4):1859-71.
17. Hatt LP, Armiento AR, Mys K, Thompson K, Hildebrand M, Nehrbass D, et al. Standard in vitro evaluations of engineered bone substitutes are not sufficient to predict in vivo preclinical model outcomes. *Acta Biomater*. 2023;156:177-89.
18. Horvath P, Aulner N, Bickle M, Davies AM, Nery ED, Ebner D, et al. Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(11):751-69.
19. Li S, Peng Y, Weinhandl ED, Blaes AH, Cetin K, Chia VM, et al. Estimated number of prevalent cases of metastatic bone disease in the US adult population. *Clin Epidemiol*. 2012;4:87-93.
20. Khan MI. Management of bone loss due to endocrine therapy during cancer treatment. *Osteoporos Int*. 2023;34(4):671-80.
21. Coleman RE, Lipton A, Roodman GD, Guise TA, Boyce BF, Brufsky AM, et al. Metastasis and bone loss: advancing treatment and prevention. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(8):615-20.
22. Coleman RE. Bisphosphonates: clinical experience. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 4:14-27.

23. Research AaFC. AACR Cancer Progress Report [2024]. 2024 Accessed on: December 2024.
24. Lingerih T, Yeshiwas S, Mohamedsaid A, Arega G. Patterns and treatment outcomes of primary bone tumors in children treated at tertiary referral hospital, Ethiopia. *BMC Cancer*. 2024;24(1):394.
25. Ryan C, Stoltzfus KC, Horn S, Chen H, Louie AV, Lehrer EJ, et al. Epidemiology of bone metastases. *Bone*. 2022;158:115783.
26. Huang JF, Shen J, Li X, Rengan R, Silvestris N, Wang M, et al. Incidence of patients with bone metastases at diagnosis of solid tumors in adults: a large population-based study. *Ann Transl Med*. 2020;8(7):482.
27. Zhang J, Cai D, Hong S. Prevalence and prognosis of bone metastases in common solid cancers at initial diagnosis: a population-based study. *BMJ Open*. 2023;13(10):e069908.
28. Lobos A OV, Ortiz E, Opazo C. Sobrevida de pacientes con cáncer de mama y metástasis ósea. *Revista chilena de cirugía*. 2013;65(6):489-94.
29. Aveic S, Seidelmann M, Davtalab R, Corallo D, Vogt M, Rutten S, et al. Three-dimensional in vitro model of bone metastases of neuroblastoma as a tool for pharmacological evaluations. *Nanotheranostics*. 2024;8(1):1-11.
30. Sitarski AM, Fairfield H, Falank C, Reagan MR. 3d Tissue Engineered In Vitro Models Of Cancer In Bone. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(2):324-36.
31. Salamanna F, Borsari V, Brogini S, Giavaresi G, Parrilli A, Cepollaro S, et al. An in vitro 3D bone metastasis model by using a human bone tissue culture and human sex-related cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(47):76966-83.
32. Salamanna F, Contartese D, Maglio M, Fini M. A systematic review on in vitro 3D bone metastases models: A new horizon to recapitulate the native clinical scenario? *Oncotarget*. 2016;7(28):44803-20.
33. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4:12.
34. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.
35. Currey JD. The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions. *J Exp Biol*. 1999;202(Pt 23):3285-94.
36. Launey WE BM, Ritchie RO. On the mechanistic origins of toughness in bone. *Annu Rev Mater Res*. 2010;40:25–53.
37. Cullinane DM ET. Biomechanics of bone. In: Bilezikian JP RL, Rodan GA, , editor. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 17–32.
38. Linde F, Hvid I. The effect of constraint on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens. *J Biomech*. 1989;22(5):485-90.
39. Rohlmann A, Zilch H, Bergmann G, Kolbel R. Material properties of femoral cancellous bone in axial loading. Part I: Time independent properties. *Arch Orthop Trauma Surg (1978)*. 1980;97(2):95-102.
40. Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;275(2):1081-101.
41. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015;125(17):2621-9.
42. Pfeiffer S. Variability in osteon size in recent human populations. *Am J Phys Anthropol*. 1998;106(2):219-27.
43. Cvetkovic VJ NS, Rajkovic JS, Zabar ALj, Vasiljevic PJ, Djordjevic LjB, et al. . A comparison of the microarchitecture of lower limb long bones between some animal models and humans: A review. *Veterinarni Medicina*. 2013;58(7):339–51.
44. Landis WJ, Hodgens KJ, Arena J, Song MJ, McEwen BF. Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microsc Res Tech*. 1996;33(2):192-202.
45. Landis WJ, Hodgens KJ, Song MJ, Arena J, Kiyonaga S, Marko M, et al. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *J Struct Biol*. 1996;117(1):24-35.

46. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998;20(2):92-102.
47. Pacureanu A, Langer M, Boller E, Tafforeau P, Peyrin F. Nanoscale imaging of the bone cell network with synchrotron X-ray tomography: optimization of acquisition setup. *Med Phys.* 2012;39(4):2229-38.
48. Fratzl P GH, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem.* 2004(14):2115–23.
49. D T. Failure Processes in Hard and Soft Tissues. In: Aliabadi F SW, editor. *Comprehensive Structural Integrity.* 9. 1 ed. Oxford, UK: Elsevier 2003. p. 35-95.
50. Taylor D, Hazenberg JG, Lee TC. Living with cracks: damage and repair in human bone. *Nat Mater.* 2007;6(4):263-8.
51. Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner.* 1991;12(2):101-12.
52. Ross MH PW. *Histology: A Text and Atlas.* . Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
53. Rao RR, Stegemann JP. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytherapy.* 2013;15(11):1309-22.
54. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(6):457-75.
55. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris).* 2005;53(10):576-80.
56. Ackbarow T, Sen D, Thaulow C, Buehler MJ. Alpha-helical protein networks are self-protective and flaw-tolerant. *PLoS One.* 2009;4(6):e6015.
57. Qin Z, Kreplak L, Buehler MJ. Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. *PLoS One.* 2009;4(10):e7294.
58. Fratzl P. Biomimetic materials research: what can we really learn from nature's structural materials? *J R Soc Interface.* 2007;4(15):637-42.
59. Sun X, Jiao X, Yang X, Ma J, Wang T, Jin W, et al. 3D bioprinting of osteon-mimetic scaffolds with hierarchical microchannels for vascularized bone tissue regeneration. *Biofabrication.* 2022;14(3).
60. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
61. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):201-9.
62. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology.* 1988;123(5):2600-2.
63. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science.* 1983;220(4598):680-6.
64. Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, Madri JA, Quesenberry PJ, Becker PS. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem.* 1998;46(3):371-7.
65. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int.* 1994;18(6):617-28.
66. Hidalgo-Bastida LA, Cartmell SH. Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):405-12.
67. Frith JE, Thomson B, Genever PG. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(4):735-49.
68. Thibault MM, Hoemann CD, Buschmann MD. Fibronectin, vitronectin, and collagen I induce chemotaxis and haptotaxis of human and rabbit mesenchymal stem cells in a standardized transmembrane assay. *Stem Cells Dev.* 2007;16(3):489-502.

69. Poundarik AA, Diab T, Sroga GE, Ural A, Boskey AL, Gundberg CM, et al. Dilatational band formation in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(47):19178-83.
70. Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73(6):832-47.
71. Gordon JA, Hunter GK, Goldberg HA. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by bone sialoprotein regulates osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):138-43.
72. Au A, Boehm CA, Mayes AM, Muschler GF, Griffith LG. Formation of osteogenic colonies on well-defined adhesion peptides by freshly isolated human marrow cells. *Biomaterials*. 2007;28(10):1847-61.
73. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9645-52.
74. McKee MD, Buss DJ, Reznikov N. Mineral tessellation in bone and the stenciling principle for extracellular matrix mineralization. *J Struct Biol*. 2022;214(1):107823.
75. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*. 2010;77(1):4-12.
76. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9445-9.
77. Morris DC, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Anderson HC. Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner*. 1992;19(3):287-98.
78. MP W. Hypophosphorylation and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine Rev* 1994;15(4):439-61.
79. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):802-12.
80. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004;6(4):483-95.
81. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89.
82. Andrades JA, Santamaria JA, Nimni ME, Becerra J. Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. *Int J Dev Biol*. 2001;45(4):689-93.
83. Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, et al. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res*. 2003;18(9):1706-15.
84. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*. 1999;45(8 Pt 2):1353-8.
85. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
86. Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*. 2016;11(10):1775-81.
87. Castilho M, de Ruijter M, Beirne S, Villette CC, Ito K, Wallace GG, et al. Multitechnology Biofabrication: A New Approach for the Manufacturing of Functional Tissue Structures? *Trends Biotechnol*. 2020;38(12):1316-28.
88. Planell JA BS, Lacroix D, Merolli A. *Bone Repair Biomaterials*. Sawston, UK: Woodhead Publishing; 2009.
89. Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):12600-5.
90. Kovrlija I, Menshikh K, Abreu H, Cochis A, Rimondini L, Marsan O, et al. Challenging applicability of ISO 10993-5 for calcium phosphate biomaterials evaluation: Towards more accurate in vitro cytotoxicity assessment. *Biomater Adv*. 2024;160:213866.
91. Lutolf MP. Integration column: artificial ECM: expanding the cell biology toolbox in 3D. *Integr Biol (Camb)*. 2009;1(3):235-41.

92. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:697-715.
93. Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone.* 1996;18(5):451-7.
94. El-Amin SF, Kofron MD, Attawia MA, Lu HH, Tuan RS, Laurencin CT. Molecular regulation of osteoblasts for tissue engineered bone repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(427):220-5.
95. Wang YL, Lin SP, Nelli SR, Zhan FK, Cheng H, Lai TS, et al. Self-Assembled Peptide-Based Hydrogels as Scaffolds for Proliferation and Multi-Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Macromol Biosci.* 2017;17(4).
96. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2(Suppl 2):S96-101.
97. Mitra D, Whitehead J, Yasui OW, Leach JK. Bioreactor culture duration of engineered constructs influences bone formation by mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2017;146:29-39.
98. Wu SL LX, Yeung KWK, Liu CS, Yang XJ. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng R* 2014(80):1-36.
99. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PC, Pinter J, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science.* 2013;341(6149):1240104.
100. Ai C, Liu L, Goh JC. Pore size modulates in vitro osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in fibronectin/gelatin coated silk fibroin scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;124:112088.
101. Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials.* 2004;25(26):5735-42.
102. Stojceski F, Buetti-Dinh A, Stoddart MJ, Danani A, Della Bella E, Grasso G. Influence of dexamethasone on the interaction between glucocorticoid receptor and SOX9: A molecular dynamics study. *J Mol Graph Model.* 2023;125:108587.
103. Van der Heide D HL, Della Bella E, Hangartner A, Lackington WA, Yuan H, De Groot-Barrère F, Stoddart MJ, D'Este M. Characterization and biological evaluation of 3D printed composite ink consisting of collagen, hyaluronic acid and calcium phosphate for bone regeneration. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications.* 2024;7:100518.
104. Armiento AR HL, Sanchez Rosenberg G, Thompson K, Stoddart MJ. Functional Biomaterials for Bone Regeneration: A Lesson in Complex Biology. *Adv Funct Mater.* 2020(30):1909874.
105. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(3):461-6.
106. Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev Biomed Eng.* 2001;3:307-33.
107. Cooper DM, Kawalilak CE, Harrison K, Johnston BD, Johnston JD. Cortical Bone Porosity: What Is It, Why Is It Important, and How Can We Detect It? *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(5):187-98.
108. Cooper DM, Matyas JR, Katzenberg MA, Hallgrimsson B. Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif Tissue Int.* 2004;74(5):437-47.
109. Mirzaali MJ, Schwiedrzik JJ, Thaiwichai S, Best JP, Michler J, Zysset PK, et al. Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly. *Bone.* 2016;93:196-211.
110. Murphy CM, Duffy GP, Schindeler A, O'Brien F J. Effect of collagen-glycosaminoglycan scaffold pore size on matrix mineralization and cellular behavior in different cell types. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(1):291-304.
111. Jungst T, Smolan W, Schacht K, Scheibel T, Groll J. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. *Chem Rev.* 2016;116(3):1496-539.
112. Li Z, Gong Y, Sun S, Du Y, Lu D, Liu X, et al. Differential regulation of stiffness, topography, and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2013;34(31):7616-25.

113. de la Puente P, Muz B, Gilson RC, Azab F, Luderer M, King J, et al. 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. *Biomaterials*. 2015;73:70-84.
114. Huebsch N, Arany PR, Mao AS, Shvartsman D, Ali OA, Bencherif SA, et al. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater*. 2010;9(6):518-26.
115. Olivares-Navarrete R, Lee EM, Smith K, Hyzy SL, Doroudi M, Williams JK, et al. Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170312.
116. Zhang J, Wehrle E, Adamek P, Paul GR, Qin XH, Rubert M, et al. Optimization of mechanical stiffness and cell density of 3D bioprinted cell-laden scaffolds improves extracellular matrix mineralization and cellular organization for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2020;114:307-22.
117. Templeton ZS, Bachmann MH, Alluri RV, Maloney WJ, Contag CH, King BL. Methods for culturing human femur tissue explants to study breast cancer cell colonization of the metastatic niche. *J Vis Exp*. 2015(97).
118. Smith CA, Board TN, Rooney P, Eagle MJ, Richardson SM, Hoyland JA. Human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177416.
119. Reichert JC, Quent VM, Burke LJ, Stansfield SH, Clements JA, Hutmacher DW. Mineralized human primary osteoblast matrices as a model system to analyse interactions of prostate cancer cells with the bone microenvironment. *Biomaterials*. 2010;31(31):7928-36.
120. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S16-21.
121. Dutra TF, French SW. Marrow stromal fibroblastic cell cultivation in vitro on decellularized bone marrow extracellular matrix. *Exp Mol Pathol*. 2010;88(1):58-66.
122. Hashimoto Y, Funamoto S, Kimura T, Nam K, Fujisato T, Kishida A. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2011;32(29):7060-7.
123. Ma R, Li M, Luo J, Yu H, Sun Y, Cheng S, et al. Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. *Biomaterials*. 2013;34(7):1790-8.
124. Beebe KS, Benevenia J, Tuy BE, DePaula CA, Harten RD, Enneking WF. Effects of a new allograft processing procedure on graft healing in a canine model: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467(1):273-80.
125. Board TN, Brunskill S, Doree C, Hyde C, Kay PR, Meek RD, et al. Processed versus fresh frozen bone for impaction bone grafting in revision hip arthroplasty. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;2009(4):CD006351.
126. Mohr J, Germain M, Winters M, Fraser S, Duong A, Garibaldi A, et al. Disinfection of human musculoskeletal allografts in tissue banking: a systematic review. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(4):573-84.
127. Haimi S, Suuriniemi N, Haaparanta AM, Ella V, Lindroos B, Huhtala H, et al. Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1473-80.
128. Pruss A, Gobel UB, Pauli G, Kao M, Seibold M, Monig HJ, et al. Peracetic acid-ethanol treatment of allogeneic avital bone tissue transplants--a reliable sterilization method. *Ann Transplant*. 2003;8(2):34-42.
129. Mroz TE, Lin EL, Summit MC, Bianchi JR, Keesling JE, Jr., Roberts M, et al. Biomechanical analysis of allograft bone treated with a novel tissue sterilization process. *Spine J*. 2006;6(1):34-9.
130. Dufrane D, Cornu O, Verraes T, Schecroun N, Banse X, Schneider YJ, et al. In vitro evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. *Eur Cell Mater*. 2001;1:52-8; discussion 8.
131. Mikhael MM, Huddleston PM, Zobitz ME, Chen Q, Zhao KD, An KN. Mechanical strength of bone allografts subjected to chemical sterilization and other terminal processing methods. *J Biomech*. 2008;41(13):2816-20.

132. Schwiedrzik JJ, Kaudela KH, Burner U, Zysset PK. Fabric-mechanical property relationships of trabecular bone allografts are altered by supercritical CO₂ treatment and gamma sterilization. *Bone*. 2011;48(6):1370-7.
133. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
134. Lomas R, Drummond O, Kearney JN. Processing of whole femoral head allografts: a method for improving clinical efficacy and safety. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(3):193-200.
135. Eagle MJ, Man J, Rooney P, Hogg P, Kearney JN. Assessment of an improved bone washing protocol for deceased donor human bone. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(1):83-90.
136. Jann J, Gascon S, Roux S, Faucheux N. Influence of the TGF-beta Superfamily on Osteoclasts/Osteoblasts Balance in Physiological and Pathological Bone Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
137. Flobak A, Skanland SS, Hovig E, Tasken K, Russnes HG. Functional precision cancer medicine: drug sensitivity screening enabled by cell culture models. *Trends Pharmacol Sci*. 2022;43(11):973-85.
138. Guan X, Huang S. Advances in the application of 3D tumor models in precision oncology and drug screening. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:1021966.
139. Walker RL, Hornicek FJ, Duan Z. Advances in the development of chordoma models for drug discovery and precision medicine. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2022;1877(6):188812.
140. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):839-45.
141. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26.
142. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18.
143. Montanez-Sauri SI, Beebe DJ, Sung KE. Microscale screening systems for 3D cellular microenvironments: platforms, advances, and challenges. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(2):237-49.
144. Sittampalam S, Eglen R, Ferguson S, Maynes JT, Olden K, Schrader L, et al. Three-Dimensional Cell Culture Assays: Are They More Predictive of In Vivo Efficacy than 2D Monolayer Cell-Based Assays? *Assay Drug Dev Technol*. 2015;13(5):254-61.
145. Ryan SL, Baird AM, Vaz G, Urquhart AJ, Senge M, Richard DJ, et al. Drug Discovery Approaches Utilizing Three-Dimensional Cell Culture. *Assay Drug Dev Technol*. 2016;14(1):19-28.
146. Yuste I, Luciano FC, Gonzalez-Burgos E, Lalatsa A, Serrano DR. Mimicking bone microenvironment: 2D and 3D in vitro models of human osteoblasts. *Pharmacol Res*. 2021;169:105626.
147. Al-Kaabneh B, Frisch B, Aljitiwi OS. The Potential Role of 3D In Vitro Acute Myeloid Leukemia Culture Models in Understanding Drug Resistance in Leukemia Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2022;14(21).
148. Ceccato J, Piazza M, Pizzi M, Manni S, Piazza F, Caputo I, et al. A bone-based 3D scaffold as an in-vitro model of microenvironment-DLBCL lymphoma cell interaction. *Front Oncol*. 2022;12:947823.
149. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat*. 2015;227(6):746-56.
150. Liu G, Pastakia M, Fenn MB, Kishore V. Saos-2 cell-mediated mineralization on collagen gels: Effect of densification and bioglass incorporation. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(5):1121-34.
151. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 2001;81(2):685-96.
152. Metzger W, Schimmelpfennig L, Schwab B, Sossong D, Dorst N, Bubel M, et al. Expansion and differentiation of human primary osteoblasts in two- and three-dimensional culture. *Biotech Histochem*. 2013;88(2):86-102.

153. Sasaki J, Matsumoto T, Egusa H, Matsusaki M, Nishiguchi A, Nakano T, et al. In vitro reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct. *Integr Biol (Camb)*. 2012;4(10):1207-14.
154. Wang J, Ye Y, Tian H, Yang S, Jin X, Tong W, et al. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;412(1):143-9.
155. Laranjeira MS, Fernandes MH, Monteiro FJ. Reciprocal induction of human dermal microvascular endothelial cells and human mesenchymal stem cells: time-dependent profile in a co-culture system. *Cell Prolif*. 2012;45(4):320-34.
156. Steiner D, Lampert F, Stark GB, Finkenzeller G. Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. *J Orthop Res*. 2012;30(10):1682-9.
157. Xue Y, Xing Z, Hellem S, Arvidson K, Mustafa K. Endothelial cells influence the osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biomed Eng Online*. 2009;8:34.
158. Kozlowski MT, Crook CJ, Ku HT. Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol*. 2021;4(1):1387.
159. Krupa I, Treacy NJ, Clerkin S, Davis JL, Miller AF, Saiani A, et al. Protocol for the Growth and Maturation of hiPSC-Derived Kidney Organoids using Mechanically Defined Hydrogels. *Curr Protoc*. 2024;4(7):e1096.
160. Deng Z, Wang H, Liu J, Deng Y, Zhang N. Comprehensive understanding of anchorage-independent survival and its implication in cancer metastasis. *Cell Death Dis*. 2021;12(7):629.
161. Sieh S, Taubenberger AV, Rizzi SC, Sadowski M, Lehman ML, Rockstroh A, et al. Phenotypic characterization of prostate cancer LNCaP cells cultured within a bioengineered microenvironment. *PLoS One*. 2012;7(9):e40217.
162. Xu T, Binder KW, Albanna MZ, Dice D, Zhao W, Yoo JJ, et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication*. 2013;5(1):015001.
163. Jeon J, Lee MS, Yang HS. Differentiated osteoblasts derived decellularized extracellular matrix to promote osteogenic differentiation. *Biomater Res*. 2018;22:4.
164. Phothichailert S, Nowwarote N, Fournier BPJ, Trachoo V, Roytrakul S, Namangkalakul W, et al. Effects of decellularized extracellular matrix derived from Jagged1-treated human dental pulp stem cells on biological responses of stem cells isolated from apical papilla. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:948812.
165. Gao C, Fu L, Yu Y, Zhang X, Yang X, Cai Q. Strategy of a cell-derived extracellular matrix for the construction of an osteochondral interlayer. *Biomater Sci*. 2022;10(22):6472-85.
166. Lee S, Burner DN, Mendoza TR, Muldong MT, Arreola C, Wu CN, et al. Establishment and Analysis of Three-Dimensional (3D) Organoids Derived from Patient Prostate Cancer Bone Metastasis Specimens and their Xenografts. *J Vis Exp*. 2020(156).
167. Froeling FE, Marshall JF, Kocher HM. Pancreatic cancer organotypic cultures. *J Biotechnol*. 2010;148(1):16-23.
168. Timpson P, McGhee EJ, Erami Z, Nobis M, Quinn JA, Edward M, et al. Organotypic collagen I assay: a malleable platform to assess cell behaviour in a 3-dimensional context. *J Vis Exp*. 2011(56):e3089.
169. Havel J, Link H, Hofinger M, Franco-Lara E, Weuster-Botz D. Comparison of genetic algorithms for experimental multi-objective optimization on the example of medium design for cyanobacteria. *Biotechnol J*. 2006;1(5):549-55.
170. Shaw R, Fitzek M, Mouchet E, Walker G, Jarvis P. Overcoming obstacles in the implementation of factorial design for assay optimization. *Assay Drug Dev Technol*. 2015;13(2):88-93.
171. Pampaloni F, Berge U, Marmaras A, Horvath P, Kroschewski R, Stelzer EH. Tissue-culture light sheet fluorescence microscopy (TC-LSFM) allows long-term imaging of three-dimensional cell cultures under controlled conditions. *Integr Biol (Camb)*. 2014;6(10):988-98.
172. Verbruggen SW, Thompson CL, Duffy MP, Lunetto S, Nolan J, Pearce OMT, et al. Mechanical Stimulation Modulates Osteocyte Regulation of Cancer Cell Phenotype. *Cancers (Basel)*. 2021;13(12).

173. Ahn J, Lim J, Jusoh N, Lee J, Park TE, Kim Y, et al. 3D Microfluidic Bone Tumor Microenvironment Comprised of Hydroxyapatite/Fibrin Composite. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:168.
174. Salamanna F, Martini L, Pagani S, Parrilli A, Giavaresi G, Maltarello MC, et al. MRMT-1 rat breast carcinoma cells and models of bone metastases: improvement of an in vitro system to mimic the in vivo condition. *Acta Histochem.* 2013;115(1):76-85.
175. Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal.* 2011;5(3):239-48.
176. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002;295(5557):1009-14.
177. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5):365-77.
178. Mercier NR, Costantino HR, Tracy MA, Bonassar LJ. A novel injectable approach for cartilage formation in vivo using PLG microspheres. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):418-29.
179. Thein-Han WW, Misra RD. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009;5(4):1182-97.
180. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res.* 2001;80(11):2025-9.
181. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* 2008;89(5):338-44.
182. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge JS, Polverini PJ, et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods.* 2007;4(10):855-60.
183. Xu F, Burg KJ. Three-dimensional polymeric systems for cancer cell studies. *Cytotechnology.* 2007;54(3):135-43.
184. Shologu N, Szegezdi E, Lowery A, Kerin M, Pandit A, Zeugolis DI. Recreating complex pathophysiologies in vitro with extracellular matrix surrogates for anticancer therapeutics screening. *Drug Discov Today.* 2016;21(9):1521-31.
185. Jeon JS, Bersini S, Gilardi M, Dubini G, Charest JL, Moretti M, et al. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(1):214-9.
186. Houshmand M, Soleimani M, Atashi A, Saglio G, Abdollahi M, Nikougoftar Zarif M. Mimicking the Acute Myeloid Leukemia Niche for Molecular Study and Drug Screening. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(2):72-85.
187. Bersini S, Jeon JS, Dubini G, Arrigoni C, Chung S, Charest JL, et al. A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials.* 2014;35(8):2454-61.
188. Kong J, Luo Y, Jin D, An F, Zhang W, Liu L, et al. A novel microfluidic model can mimic organ-specific metastasis of circulating tumor cells. *Oncotarget.* 2016;7(48):78421-32.
189. Marturano-Kruik A, Nava MM, Yeager K, Chramiec A, Hao L, Robinson S, et al. Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(6):1256-61.
190. Ziegler P, Hartkopf AD, Wallwiener M, Haberle L, Kolberg HC, Hadji P, et al. The impact of physical activity on progression-free and overall survival in metastatic breast cancer based on molecular subtype. *BMC Cancer.* 2024;24(1):1284.
191. Smith CA, Richardson SM, Eagle MJ, Rooney P, Board T, Hoyland JA. The use of a novel bone allograft wash process to generate a biocompatible, mechanically stable and osteoinductive biological scaffold for use in bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(5):595-604.
192. Ozenler K DA, Akkineni T, Tihminlioglu F, Gelinsky M, A, Boccaccini. 3D bioprinting of mouse pre-osteoblasts and human MSCs using bioinks consisting of gelatin and decellularized bone particles. *Biofabrication.* 2024;16(2).
193. Misof BM, Gamsjaeger S, Cohen A, Hofstetter B, Roschger P, Stein E, et al. Bone material properties in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2012;27(12):2551-61.
194. Sekita A M, A, Nakano T. Disruption of collagen matrix alignment in osteolytic bone metastasis induced by breast cancer. *Materials Transactions.* 2016;57(12):2077-82.

195. Sun Y, Jiang Y, Liu Q, Gao T, Feng JQ, Dechow P, et al. Biomimetic engineering of nanofibrous gelatin scaffolds with noncollagenous proteins for enhanced bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(15-16):1754-63.
196. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1:33-40.
197. Nie HYY, Li J, Xu F, Wang T, Bian L, Jiang Z, Zhang S. Occurrence and distribution of bone metastases in 984 metastatic breast cancer patients. *Transl Breast Cancer Res* 2021;2:1-7.
198. Zieger V, Frejek D, Zimmermann S, Miotto GAA, Koltay P, Zengerle R, et al. Towards Automation in 3D Cell Culture: Selective and Gentle High-Throughput Handling of Spheroids and Organoids via Novel Pick-Flow-Drop Principle. *Adv Healthc Mater*. 2024;13(9):e2303350.
199. Karimifard SA, Salehzadeh-Yazdi A, Taghizadeh-Tabarsi R, Akbari-Birgani S. Mechanical effects modulate drug resistance in MCF-7-derived organoids: Insights into the wnt/beta-catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;695:149420.
200. Sawyer SW, Zhang K, Horton JA, Soman P. Perfusion-based co-culture model system for bone tissue engineering. *AIMS Bioeng*. 2020;7(2):91-105.
201. Kara A, Distler T, Polley C, Schneiderei D, Seitz H, Friedrich O, et al. 3D printed gelatin/decellularized bone composite scaffolds for bone tissue engineering: Fabrication, characterization and cytocompatibility study. *Mater Today Bio*. 2022;15:100309.
202. Khin ZP, Ribeiro ML, Jacobson T, Hazlehurst L, Perez L, Baz R, et al. A preclinical assay for chemosensitivity in multiple myeloma. *Cancer Res*. 2014;74(1):56-67.
203. Matinfar M, Mesgar AS, Mohammadi Z. Evaluation of physicochemical, mechanical and biological properties of chitosan/carboxymethyl cellulose reinforced with multiphasic calcium phosphate whisker-like fibers for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;100:341-53.
204. Shahin-Shamsabadi A, Hashemi A, Tahriri M, Bastami F, Salehi M, Mashhadi Abbas F. Mechanical, material, and biological study of a PCL/bioactive glass bone scaffold: Importance of viscoelasticity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;90:280-8.
205. Alipour M, Pouya B, Aghazadeh Z, SamadiKafil H, Ghorbani M, Alizadeh S, et al. The Antimicrobial, Antioxidative, and Anti-Inflammatory Effects of Polycaprolactone/Gelatin Scaffolds Containing Chrysin for Regenerative Endodontic Purposes. *Stem Cells Int*. 2021;2021:3828777.
206. Shen M, Wang L, Gao Y, Feng L, Xu C, Li S, et al. 3D bioprinting of in situ vascularized tissue engineered bone for repairing large segmental bone defects. *Mater Today Bio*. 2022;16:100382.
207. Mohammadalipour M, Karbasi S, Behzad T, Mohammadalipour Z, Zamani M. Effect of cellulose nanofibers on polyhydroxybutyrate electrospun scaffold for bone tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*. 2022;220:1402-14.
208. Ghorbani M, Vasheghani-Farahani E, Azarpira N, Hashemi-Najafabadi S, Ghasemi A. Dual-crosslinked in-situ forming alginate/silk fibroin hydrogel with potential for bone tissue engineering. *Biomater Adv*. 2023;153:213565.
209. Toloue EB, Mohammadalipour M, Mukherjee S, Karbasi S. Ultra-thin electrospun nanocomposite scaffold of poly (3-hydroxybutyrate)-chitosan/magnetic mesoporous bioactive glasses for bone tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*. 2024;254(Pt 2):127860.
210. Nair PR, Sreeja S, Sailaja GS. In vitro biomineralization and osteogenesis of *Cissus quadrangularis* stem extracts: An osteogenic regulator for bone tissue engineering. *J Biosci*. 2021;46.
211. Subramaniam M, Colvard D, Keeting PE, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase, osteocalcin, and proto-oncogenes in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Biochem*. 1992;50(4):411-24.
212. Murray E, Provvedini D, Curran D, Catherwood B, Sussman H, Manolagas S. Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Res*. 1987;2(3):231-8.
213. Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, Yamaguchi A, Azuma T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;524(3):702-9.

214. Majeska RJ, Rodan SB, Rodan GA. Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology*. 1980;107(5):1494-503.
215. Rodan SB MR, Rodan GA. Osteosarcoma cells as models for osteoblasts. In: Novak JF MJ, editor. *Frontiers of Osteosarcoma Research*. Seattle: Holgreffe and Huber; 1994. p. 192.
216. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990;143(3):420-30.
217. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017;169(3):381-405.
218. Martorana F, Motta G, Pavone G, Motta L, Stella S, Vitale SR, et al. AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Front Pharmacol*. 2021;12:662232.
219. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancer Res*. 2019;79(6):1019-31.
220. Chin L, Xia Y, Discher DE, Janmey PA. Mechanotransduction in cancer. *Curr Opin Chem Eng*. 2016;11:77-84.
221. Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(12):780-3.
222. Gal N, Weihs D. Intracellular mechanics and activity of breast cancer cells correlate with metastatic potential. *Cell Biochem Biophys*. 2012;63(3):199-209.
223. Mierke CT, Kollmannsberger P, Zitterbart DP, Diez G, Koch TM, Marg S, et al. Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem*. 2010;285(17):13121-30.
224. Deroanne CF, Lapiere CM, Nusgens BV. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):647-58.
225. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005;310(5751):1139-43.
226. Pelham RJ, Jr., Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):13661-5.
227. Wang HB, Dembo M, Wang YL. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(5):C1345-50.
228. Humphries JD, Chastney MR, Askari JA, Humphries MJ. Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol*. 2019;56:14-21.
229. Mishra YG, Manavathi B. Focal adhesion dynamics in cellular function and disease. *Cell Signal*. 2021;85:110046.
230. Fernandez-Garcia B, Eiro N, Marin L, Gonzalez-Reyes S, Gonzalez LO, Lamelas ML, et al. Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology*. 2014;64(4):512-22.
231. Insua-Rodriguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:41-55.
232. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.
233. Bercoff J, Chaffai S, Tanter M, Sandrin L, Catheline S, Fink M, et al. In vivo breast tumor detection using transient elastography. *Ultrasound Med Biol*. 2003;29(10):1387-96.
234. McKnight AL, Kugel JL, Rossman PJ, Manduca A, Hartmann LC, Ehman RL. MR elastography of breast cancer: preliminary results. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;178(6):1411-7.
235. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7):e48-72.
236. Wilson BJ, Giguere V. Meta-analysis of human cancer microarrays reveals GATA3 is integral to the estrogen receptor alpha pathway. *Mol Cancer*. 2008;7:49.
237. Dydensborg AB, Rose AA, Wilson BJ, Grote D, Paquet M, Giguere V, et al. GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis. *Oncogene*. 2009;28(29):2634-42.

238. Liu H, Shi J, Wilkerson ML, Lin F. Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues: a useful immunomarker for breast and urothelial carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(1):57-64.
239. Yan W, Cao QJ, Arenas RB, Bentley B, Shao R. GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2010;285(18):14042-51.
240. Parikh P, Palazzo JP, Rose LJ, Daskalakis C, Weigel RJ. GATA-3 expression as a predictor of hormone response in breast cancer. *J Am Coll Surg.* 2005;200(5):705-10.
241. Soto CA, Lo Celso C, Purton LE, Frisch BJ. From the niche to malignant hematopoiesis and back: reciprocal interactions between leukemia and the bone marrow microenvironment. *JBMR Plus.* 2021;5(10):e10516.