

---

# **Efectos de la estimulación mecánica sobre células madre aplicado a la regeneración de cartílago**

---

**RUBÉN SALVADOR CLAVELL**

DIRECTORES: CARMEN CARDA BATALLA  
MARÍA SANCHO-TELLO VALLS  
JOSÉ JAVIER MARTÍN DE LLANO

**Tesis Doctoral**

**Programa de Doctorado en Medicina**

València, noviembre 2020

学 书  
海 山  
无 有  
涯 路  
苦 勤  
作 为  
舟 径

(春联)

La montaña de los libros tiene una ruta,  
el trabajo diligente es el camino.  
El océano del aprendizaje no tiene fin,  
el duro esfuerzo es el barco.

(Coplas de primavera)

**TÍTULO DEL PROYECTO:**

*Efectos de la estimulación mecánica sobre células madre aplicado a la regeneración de cartílago*

**DATOS DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN:**

**Programa de Doctorado:** 3139 MEDICINA

**Línea de investigación:** Histopatología e Ingeniería Tisular

**DATOS DEL DOCTORANDO:**

**Apellidos:** SALVADOR CLAVELL      **Nombre:** RUBÉN

**D.N.I.:** 73398730A

**e-mail:** rubensalvadorclavell@gmail.com

**CODIRECTORES:**

1.- CARMEN CARDA BATALLA

**Departamento:** PATOLOGÍA

**Centro:** FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

2.- MARÍA SANCHO-TELLO VALLS

**Departamento:** PATOLOGÍA

**Centro:** FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

3.- JOSÉ JAVIER MARTÍN DE LLANO

**Departamento:** PATOLOGÍA

**Centro:** FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Dña. **Carmen Carda Batalla**, Catedrática del Departamento de Patología de la Universitat de València.

Dña. **María Sancho-Tello Valls**, Profesora Titular del Departamento de Patología de la Universitat de València.

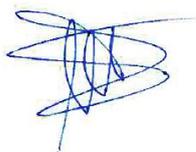
D. **José Javier Martín de Llano**, Profesor Titular del Departamento de Patología de la Universitat de València.

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria, titulada *Efectos de la estimulación mecánica sobre células madre aplicado a la regeneración de cartílago*, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **D. Rubén Salvador Clavell**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado 3139 Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste, firman el presente certificado en València, a 17 de noviembre de 2020.

Firmado:



C. Carda Batalla



M. Sancho-Tello Valls



J.J. Martín de Llano

# AGRADECIMIENTOS

El camino de una Tesis Doctoral puede ser complicado, difícil, duro. Sinceramente, en mi caso lo fue por diferentes circunstancias. No obstante, los problemas se hacen más llevaderos cuando una persona se rodea de gente maravillosa. Por otro lado, estoy muy feliz de haber alcanzado la meta, mi propia meta personal, con mi esfuerzo y mi trabajo. Estoy muy agradecido.

Quiero agradecer a Carmen, María y Javier el apoyo que he recibido por su parte a lo largo de todo este camino. Carmen, gràcies de tot cor per ser una de les meues mares en la ciencia, gràcies per fer que m'apassione per la histologia, gràcies per fer-me sentir com un fill quan ho necessitava. María, gracias por ayudarme y darme ánimos cuando más desesperado me sentía, gracias por respetar siempre mis decisiones. Y Javier, gracias por confiar en mí en estos años de trabajo, gracias por darme la oportunidad de entrar en nuestro mundo laboral que tanto me apasiona.

Gracias a mis compañeras (y amigas) de trabajo, por enseñarme a que la ciencia puede ser emocionante y divertida a la vez.

Agradecer a mis amigas el apoyo recibido. Rebeca (Yuko), gracias por ser mi mejor amiga, por escucharme y respetarme y por hacerme reír cada día.

A ma mare, mon pare i Sara, gràcies per donar-me suport en tot moment. Sense la vostra ajuda, no seria com sóc ni estaria onestic.

Y final y fundamentalmente, a Héctor, Komatsu y Oosaki. Gracias por ser mi familia, por apoyarme, por soportarme, por respetarme y por quererme y enseñarme a quererme. Gràcies de tot cor per fer-me completament feliç.

# RESUMEN

La baja capacidad de regeneración del cartílago hialino articular ha estimulado el desarrollo de numerosas terapias, con resultados poco satisfactorios hasta la fecha. Desde hace años la ingeniería tisular ha puesto a punto diferentes procedimientos *in vitro* para favorecer la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales. Debido a los buenos resultados que se han alcanzado, algunos de los constructos obtenidos con estas técnicas han acabado implantándose en pacientes con lesiones condrales u osteocondrales, pero con fracasos a medio y largo plazo en muchos de los casos.

Es por ello que esta Tesis Doctoral tiene como objetivo seguir profundizando en las técnicas de ingeniería tisular aplicadas a las terapias de las lesiones condrales, concretamente se han estudiado diferentes mecanismos para conseguir la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC), promoviendo la síntesis de proteínas características de la matriz extracelular cartilaginosa hialina.

Por un lado, se han cultivado hDPSC en hidrogeles y en forma de organoide celular o microtejidos con diferentes medios de cultivo (proliferación celular o diferenciación condrogénica), a lo largo de diferentes tiempos (3 días y 2, 4 y 6 semanas). Los resultados han revelado que el cultivo en un entorno tridimensional induce la diferenciación condrogénica, mientras que el cultivo con medio de inducción condrogénica promueve la síntesis de proteínas o proteoglicanos características de la matriz extracelular condral, como son el agregano y el colágeno de tipo II, a tiempos más cortos.

Finalmente, la estimulación de microtejidos de hDPSC mediante campos magnéticos y fuerzas mecánicas indujo la diferenciación condrogénica a los 3 días de tratamiento, promoviendo la síntesis de estas proteínas fundamentales de la matriz condral de manera más consistente, mientras que un tiempo de estimulación más largo (2 semanas) indujo la producción de colágeno de tipo I, característico del fibrocartílago.

En definitiva, el cultivo de hDPSC en modo de microtejido induce la diferenciación condrogénica y la síntesis de proteínas características de la matriz extracelular del cartílago hialino. Además, su estimulación mediante fuerzas electromagneto-mecánicas acelera este proceso de diferenciación, generándose una matriz de proteínas condrales consistente a lo largo del tiempo.

## PALABRAS CLAVE

Cartílago hialino; fuerza mecánica; célula madre; hDPSC; condrogénesis; campo electromagnético; microtejido; hidrogel.

# RESUM

La baixa capacitat de regeneració del cartílag hialí articular ha estimulat el desenvolupament de diverses teràpies, amb resultats poc satisfactoris fins a l'actualitat. Des de fa diversos anys l'enginyeria tissular ha portat a cap diferents procediments in vitro per a afavorir la diferenciació condrogènica de cèl·lules mare mesenquimals. Degut als bons resultats obtinguts, alguns dels constructes elaborats amb estes tècniques han acabat implantant-se en pacients amb lesions condrials o osteocondrials, però amb fracassos a mitjan i llarg termini en molts dels casos.

És per això que esta Tesi Doctoral té com objectiu seguir aprofundint en les tècniques d'enginyeria tissular aplicades a les teràpies de les lesions cartilaginoses, concretament s'han estudiat diferents mecanismes per a aconseguir la diferenciació condrogènica de cèl·lules mare mesenquimals de pulpa dental humana (hDPSC), promovent la síntesi de proteïnes característiques de la matriu extracel·lular cartilaginosa hialina.

Per un costat, s'han cultivat hDPSC en hidrogels y en forma d'organoide cel·lular o microteixts amb diferents medis de cultiu (proliferació cel·lular i diferenciació condrogènica), al llarg de diferents temps (3 dies i 2, 4 i 6 setmanes). Els resultats han desvetlat que el cultiu en un entorn tridimensional induïx la diferenciació condrogènica, mentre que el cultiu amb medi d'inducció condrogènica promou la síntesi de proteïnes o proteoglicans característics de la matriu extracel·lular condrial, com són l'agrecà i el col·lagen de tipus II, a temps més curts.

Finalment, l'estimulació de microteixts de hDPSC mitjançant camps electromagnètics i forces mecàniques va induir la diferenciació condrogènica als 3 dies de tractament, promovent la síntesi d'estes proteïnes fonamentals de la matriu condrial de manera més consistent, mentre que un temps d'estimulació més llarg (2 setmanes) va induir la producció de col·lagen de tipus I, característic del fibrocartílag.

En definitiva, el cultiu de hDPSC en mode de microteixit induïx la diferenciació condrogènica i la síntesi de proteïnes característiques de la matriu extracel·lular del cartílag hialí. A més a més, la seua estimulació mitjançant forces electromagnètiques-mecàniques accelera este procés de diferenciació, generant-se una matriu de proteïnes condrials consistent al llarg del temps.

## PARAULES CLAU

Cartílag hialí; força mecànica; cèl·lula mare; hDPSC; condrogènesi; camp electromagnètic; microteixit; hidrogel.

# ABSTRACT

The low regeneration capacity of hyaline joint cartilage has stimulated the development of numerous therapies, with unsatisfactory results. For years, tissue engineering has tuned up different *in vitro* procedures to promote chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Due to the good results obtained, some of the constructs elaborated with these techniques have ended up being implanted in patients with chondral or osteochondral lesions, but with medium- and long-term failures in many of the cases.

Therefore, the aim of this Doctoral Thesis is to get in deeper knowledge about several tissue engineering techniques applied in chondral injuries therapies. More specifically, different mechanisms have been studied to achieve chondrogenic differentiation of human dental pulp mesenchymal stem cells (hDPSC), promoting the synthesis of characteristic proteins of the extracellular cartilaginous hyaline matrix.

On the one hand, hDPSC have been cultivated in hydrogels and cellular organoid or microtissue form with different culture media (cellular proliferation or chondrogenic differentiation), over different times (3 days and 2, 4 and 6 weeks). The results have revealed that culture in a three-dimensional environment induces chondrogenic differentiation, while culture with chondrogenic induction medium promotes the synthesis of characteristic proteins or proteoglycans of the chondral extracellular matrix, such as aggrecan and type II collagen, at shorter times.

Finally, stimulation of hDPSC microtissues by electromagnetic fields and mechanical forces induced chondrogenic differentiation after 3 days of treatment, promoting the synthesis of these fundamental proteins of the chondral matrix more consistently, while a longer stimulation time (2 weeks) induced production of type I collagen, characteristic of fibrocartilage.

Briefly, the culture of hDPSC in the microtissue model induces chondrogenic differentiation and the synthesis of proteins characteristic of the extracellular matrix of hyaline cartilage. Furthermore, its stimulation by electromagnetic-mechanical forces accelerates this differentiation process, generating a consistent matrix of chondral proteins over time.

## KEY WORDS

Hyaline cartilage; mechanical force; stem cell; hDPSC; chondrogenesis; electromagnetic field; microtissue; hydrogel.

## ABREVIATURAS

ACAN	factor de transcripción asociado con la síntesis de agrecano
ACI	implantación de condrocitos autólogos ( <i>Autologous Chondrocytes Implantation</i> )
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ácido desoxiribonucleico complementario
ADSC	células madre mesenquimales de tejido adiposo ( <i>Adipose-Derived Stem Cells</i> )
ALKL	factor de transcripción asociado con la fosfatasa alcalina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BM-MSC	células madre mesenquimales de médula ósea ( <i>Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells</i> )
BMP	proteína morfogenética del hueso ( <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> )
BSA	albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CaCl <sub>2</sub>	dicloruro de calcio
CDM	medio basal de diferenciación de condrocitos ( <i>Chondrocyte Differentiation Medium</i> )
CE	Comunidad Europea
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
COL10A1	factor de transcripción asociado con la cadena alfa 1 del colágeno tipo X
COL1A1	factor de transcripción asociado con la cadena alfa 1 del colágeno tipo I
COL2A1	factor de transcripción asociado con la cadena alfa 1 del colágeno tipo II
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	trifosfatos desoxinucleótidos ( <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> )
DPSC	células madre mesenquimales de pulpa dental ( <i>Dental Pulp Stem Cells</i> )
EDTA	etilendiaminotetraacético
EMF	campo electromagnético ( <i>ElectroMagnetic Field</i> )
EMFGS	sistema generador de campos electromagnéticos ( <i>Electromagnetic Fields Generator System</i> )
FBS	suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FDA	Food and Drug Administration
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
FICT	fluoresceína
GAG	glucosaminoglicano
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GelMA	gelatín metacriloido
hADSC	células madre mesenquimales de tejido adiposo humano ( <i>human Adipose-Derived Stem Cells</i> )
HCl	ácido clorhídrico
hDPSC	células madre mesenquimales de pulpa dental humana ( <i>human Dental Pulp Stem Cells</i> )
H-E	hematoxilina-eosina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico
HIF1A	factor de transcripción asociado con la hipoxia
IGF	factor de crecimiento insulínico ( <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
IgG	inmunoglobulina G
IT	ingeniería tisular
MACI	implantación de condrocitos autólogos inducidos en matriz ( <i>Matrix-</i>

*Induced Autologous Chondrocytes Implantation*

MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteasas de matriz
MSC	células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
MTS	ensayo de actividad metabólica ( <i>Metabolic Activity Assay</i> )
NaCl	cloruro sódico
NaOH	sosa cáustica
PBS	tampón fosfato salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PCL	policaprolactona
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEGDMA	poli(etilen-glicol) dimetacrilato
PEMF	campo electromagnético de pulsos continuados ( <i>Pulsed EMF</i> )
PG	proteoglicano
PGA	ácido poliglicólico
PLA	ácido poliláctico
PLLA	ácido poli-L-láctico
PVA	poli(vinil-alcohol)
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativa)
R <sup>3</sup> -IGF-1	factor de crecimiento insulínico de tipo 1 recombinante
RER	retículo endoplasmático rugoso
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcriptasa inversa
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa mediante transcriptasa inversa
RUNX2	factor de transcripción asociado con la diferenciación de los osteoblastos

SOX9	SRY-box 9
SP7	factor de transcripción asociado con la síntesis de osterix
SPEMF	campo electromagnético de pulso simple ( <i>Single-Pulse EMF</i> )
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante beta ( <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i> )
TGF- $\beta$ 1	factor de crecimiento transformante beta 1 ( <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1</i> )
VBH	virus de la hepatitis B
VCH	virus de la hepatitis C
VEGFA	factor de transcripción asociado con el crecimiento endotelial vascular
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
$\alpha$ MEM	medio esencial mínimo alfa ( <i>alpha Minimum Essential Medium</i> )

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. El cartílago.....	4
1.1. Células y matriz estructural.....	4
1.2. Tipos de cartílago.....	6
1.2.1. Cartílago fetal o epiteliideo.....	7
1.2.2. Cartílago hialino.....	7
1.2.3. Cartílago elástico.....	8
1.2.4. Cartílago fibroso o fibrocartílago.....	9
1.3. El cartílago en las articulaciones sinoviales.....	9
1.3.1. Superficies articulares: cartílago articular.....	10
1.3.2. Cápsula articular.....	13
1.3.3. Cavidad articular.....	13
2. Lesiones condrales.....	14
2.1. Tratamientos clínicos.....	15
2.1.1. Tratamiento ortopédico.....	15
2.1.2. Desbridamiento artroscópico.....	15
2.1.3. Condroabrasión.....	16
2.1.4. Microfracturas.....	16
2.1.5. Mosaicoplastia.....	16
2.1.6. Aloinjertos.....	17
3. Ingeniería tisular.....	18
3.1. Células madre. DPSC.....	20
3.1.1. Descripción del diente.....	22
3.1.2. Células madre mesenquimales de pulpa dental (DPSC).....	23
3.2. Biomateriales en Ingeniería Tisular.....	25
3.2.1. Hidrogeles.....	27
4. Irradiación electromagnética como terapia.....	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
1. Hipótesis.....	33
2. Objetivo principal.....	34
3. Objetivos específicos.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
1. Cultivos celulares.....	39

1.1.	Origen de las células usadas.....	39
1.2.	Medios de cultivo.....	39
1.2.1.	Proliferación de células mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC).....	39
1.2.2.	Proliferación de células mesenquimales de tejido adiposo humano (hADSC).....	40
1.2.3.	Medio de diferenciación condrogénica.....	40
1.3.	Descongelación, expansión, recuento celular y criopreservación.....	40
1.4.	Estudio de la actividad proliferativa celular.....	42
2.	Hidrogeles.....	43
2.1.	Elaboración de hidrogeles de alginato-agarosa.....	43
2.2.	Estudio de la citotoxicidad de los hidrogeles y de la solución de CaCl <sub>2</sub> .....	44
2.2.1.	Condicionamiento de los medios y preparación de la placa de ensayo..	44
2.2.2.	Elaboración de las diluciones de CaCl <sub>2</sub> y preparación de la placa.....	46
2.2.3.	Ensayo de citotoxicidad.....	47
2.3.	Cultivo en hidrogeles de alginato-agarosa.....	48
2.3.1.	Estudio del comportamiento de hDPSC en hidrogeles de alginato 3 %- agarosa 1 %.....	49
3.	Cultivos de microtejidos celulares.....	50
3.1.	Estudio del comportamiento de hDPSC en forma de microtejidos.....	51
4.	Técnica histológica.....	53
4.1.	Fijación.....	53
4.2.	Inclusión.....	54
4.3.	Sección.....	55
4.4.	Tinción.....	55
4.4.1.	Tinción histoquímica.....	55
4.4.1.1.	<i>Tinción con hematoxilina y eosina</i> .....	56
4.4.1.2.	<i>Tinción con DAPI</i> .....	57
4.4.1.3.	<i>Tinción con rodamina-faloidina</i> .....	58
4.4.1.4.	<i>Recuento celular</i> .....	58
4.4.2.	Inmunofluorescencia.....	59
4.4.3.	Selección de las imágenes.....	62
5.	Sistema generador de campos electromagnéticos (EMFGS).....	64
5.1.	Descripción y características del EMFGS.....	64
5.1.1.	Descripción general y listado de componentes.....	64
5.1.2.	Principio de funcionamiento.....	66
5.1.3.	Características generales y eléctricas.....	68

5.1.4.	Modo de uso del dispositivo EMFGS .....	69
5.1.5.	Listado de riesgos .....	81
5.1.6.	Validación del campo electromagnético generado .....	83
5.2.	Determinación de los estudios temporales de exposición al EMF .....	83
5.3.	Estudio de la viabilidad de hDPSC expuestas al EMF .....	84
6.	Elaboración de las partículas electromagnéticas .....	86
6.1.	Determinación de la densidad de partículas por muestra.....	89
7.	Elaboración de microtejidos para la exposición electromagnética-mecánica.....	90
7.1.	Estudio de la estimulación electromagneto-mecánica durante 72 h y 14 días91	
7.2.	Estudio morfológico de microtejidos estimulados 72 h con posterior cultivo ..	92
7.3.	Listado final de muestras elaboradas para los estudios .....	93
8.	Caracterización de la expresión génica .....	94
8.1.	Extracción de ARN total .....	94
8.1.1.	Separación de fases .....	94
8.1.2.	Precipitado del ARN.....	95
8.1.3.	Lavado del ARN y conservación .....	95
8.1.4.	Cuantificación del ARN total .....	95
8.2.	Retrotranscripción (RT-PCR).....	96
8.3.	PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real.....	97
8.3.1.	Genes analizados.....	98
8.4.	Análisis bioestadístico mediante R.....	99
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	104
	RESULTADOS: bloque preliminar.....	106
1.	Estudio preliminar de la proliferación y viabilidad celular.....	107
1.1.	Células mesenquimales de tejido adiposo humano (hADSC).....	107
1.2.	Células mesenquimales de pupa dental humana (hDPSC) .....	108
	DISCUSIÓN: bloque preliminar.....	109
1.	Estudio preliminar de la viabilidad celular.....	110
	RESULTADOS: bloque 1 .....	112
1.	Estudio de la citotoxicidad de los hidrogeles .....	113
2.	Estudio de la citotoxicidad del CaCl <sub>2</sub> .....	115
3.	Cultivo de hDPSC en hidrogeles de alginato-agarosa con medio de proliferación o de diferenciación condrogénica.....	116
3.1.	Inmunofluorescencia.....	117
3.1.1.	Tiempo cero y 3 días de cultivo en medio de cultivo de proliferación o de diferenciación condrogénica .....	117

3.1.2.	Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de proliferación.....	118
3.1.3.	Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de diferenciación condrogénica.....	119
	DISCUSIÓN: bloque 1 .....	121
1.	Estudios de citotoxicidad.....	122
2.	Cultivo de hDPSC en hidrogel alginato 3 %-agarosa 1 %.....	124
	RESULTADOS: bloque 2 .....	127
1.	Cultivo de microtejidos de hDPSC con medio de proliferación o de diferenciación condrogénica.....	128
1.1.	Tinción de H-E .....	129
1.1.1.	Tiempo cero y 3 días de cultivo en medio de proliferación o de diferenciación condrogénica .....	129
1.1.2.	Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de proliferación o de diferenciación condrogénica .....	130
1.2.	Densidad celular en los microtejidos .....	132
1.3.	Inmunofluorescencia.....	134
1.3.1.	Tiempo cero y 3 días de cultivo en medio de proliferación o de diferenciación condrogénica .....	134
1.3.2.	Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de proliferación.....	135
1.3.3.	Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de diferenciación condrogénica.....	136
	DISCUSIÓN: bloque 2 .....	138
1.	Cultivo de microtejidos de hDPSC.....	139
1.1.	Características histológicas y recuento celular.....	139
1.2.	Inmunofluorescencia.....	142
	DISCUSIÓN: interbloques 1 y 2.....	144
	RESULTADOS: bloque 3 .....	147
1.	Obtención y validación del EMF generado .....	148
1.1.	Obtención y estudio.....	148
1.2.	Validación.....	149
2.	Determinación de los tiempos de exposición electromagnética.....	152
3.	Estudio preliminar de hDPSC expuestas a EMF .....	154
3.1.	Estudio de viabilidad celular.....	154
3.2.	Estudio morfológico.....	155
4.	Elaboración de las partículas electromagnéticas.....	156
4.1.	Determinación de la densidad de partículas por muestra .....	156
5.	Estudio de la expresión génica de microtejidos de hDPSC estimulados electromagneto-mecánicamente.....	157

5.1. Estudio de la expresión génica.....	157
6. Estudio histológico y de la expresión de proteínas de muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 3 días .....	165
6.1. Tinción con hematoxilina-eosina .....	165
6.1.1. Adhesión celular a las partículas electromagnéticas.....	167
6.2. Densidad celular en los microtejidos .....	168
6.3. Caracterización celular mediante inmunofluorescencia .....	169
DISCUSIÓN: bloque 3.....	172
1. Sistema generador de campos electromagnéticos .....	173
2. Determinación de los tiempos de exposición electromagnética .....	174
3. Estudio preliminar de hDPSC expuestas a EMF.....	177
4. Elaboración de las partículas electromagnéticas .....	179
5. Caracterización de microtejidos expuestos a estimulación electromagneto- mecánica mediante la determinación de la expresión génica.....	180
6. Caracterización morfológica de microtejidos expuestos a estimulación electromagneto-mecánica durante 3 días .....	183
6.1. Caracterización histológica y recuento celular.....	183
6.2. Inmunofluorescencia.....	184
DISCUSIÓN: interbloques 2 y 3.....	186
CONCLUSIONES.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	194
ANEXOS .....	212

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tinción con hematoxilina-eosina de condrocitos en cartílago traqueal. A: condrocito aislado, y B: grupo isógeno o agrupación de 3 condrocitos. Durante el procesamiento de las muestras, se ha producido la retracción del citoplasma de los condrocitos, lo que facilita observar, en este caso, el límite de las lagunas que ocupan. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ . Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. .... 5

Figura 2. Tinción con hematoxilina-eosina de condrocitos en cartílago epiteloideo en un hueso en formación de la mano de un feto de 6 meses. Obsérvese que no todavía no hay ordenamiento celular por el tejido. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. .... 7

Figura 3. Tinción con hematoxilina-eosina de cartílago hialino de conejo en A: tráquea, y B: rodilla (cóndilo femoral). Barras de escala = A: 50  $\mu\text{m}$ , y B: 100  $\mu\text{m}$ . Obsérvese que, por un lado, los condrocitos de la tráquea se encuentran ligeramente aplanados en la zona más externa de esta, mientras que en su interior presentan una morfología más redondeada o poligonal. Por lo que respecta al cóndilo femoral, obsérvese grupos isógenos de condrocitos en la zona interna, mientras que en la superficie estas células tienden a presentarse con morfología ligeramente aplanada. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. .... 8

Figura 4. A: Tinción con orceína de cartílago elástico del pabellón auricular humano. Obsérvese la abundancia de grupos isógenos, en que los condrocitos a menudo se disponen en hileras. Esta tinción destaca la presencia de fibras elásticas en la matriz extracelular. B: Tinción con hematoxilina-eosina de cartílago fibroso humano de la unión tendón-hueso. Obsérvese los condrocitos alineados en hileras, rodeados en su proximidad por una matriz basófila. Entre las hileras de condrocitos, hay una gran cantidad de tejido conjuntivo denso en el que se aprecian algunos fibroblastos. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . Preparaciones propias obtenidas en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. .... 9

Figura 5. Diartrosis. A: esquema representativo extraído de <sup>1</sup>, y B: tinción con tricrómico de Masson de una diartrosis en las falanges de dedo humano. La imagen B es el resultado de la fusión de varias imágenes digitales solapadas realizada empleando el programa PhotoShop; barra de escala = 400  $\mu\text{m}$ . En esta preparación, se pueden observar todas las partes de la diartrosis (hueso subcondral, cartílago articular y cavidad articular). Preparación obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. .... 10

Figura 6. Estratos del cartílago articular. A: representación esquemática de los estratos condrales<sup>6</sup>, y B: histología de cartílago articular mediante la tinción con tricrómico de Masson, imagen tomada de <sup>1</sup>. Obsérvese la distribución de las fibras en la matriz extracelular como también la disposición de las células, siendo más aplanada en la superficie del cartílago y redondeadas formando hileras hacia el interior de este. .... 12

Figura 7. Diagrama de los pilares de la ingeniería tisular. Composición propia. .... 19

Figura 8. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido conjuntivo del cordón umbilical humano, en el que hay presentes, entre otras, células madre mesenquimales. Barra de escala = 20 $\mu$ m. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. ....	21
Figura 9. Corte sagital de diente incisivo superior humano, incluido en polimetilmetacrilato. Se realizó una tinción mediante azul de Stevenel (tinción de tejidos blandos) y fucsina de van Gieson (tejidos mineralizados). La imagen es el resultado de la fusión de varias imágenes digitales solapadas realizada empleando el programa PhotoShop; barra de escala= 800 $\mu$ m. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. ....	22
Figura 10. Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental humana en monocapa. A: imagen obtenida en microscopio invertido de contraste de fases, y B: imagen obtenida con el microscopio de fluorescencia Se observan los núcleos teñidos con DAPI (azul) y los filamentos de actina citoplasmáticos teñidos con rodamina-faloidina (rojo). Barras de escala = A: 100 $\mu$ m, y B: 50 $\mu$ m. Preparación propia obtenida en los laboratorios de Ingeniería Tisular y de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València. ....	23
Figura 11. Ruta de la expresión de genes condrogénicos y osteogénicos en células DPSC. Composición propia, inspirada en <sup>56</sup> .....	25
Figura 12. Fotografía tomada de un generador de fijación externa Hoffmann® de campos electromagnéticos irradiando la tibia fracturada de un paciente. Imagen de <sup>106</sup> . ....	29
Figura 13. Distribución de los medios condicionados con los hidrogeles y los medios control en la placa de cultivo de 96 pocillos. Columna 1: medio de cultivo control; 2: medio condicionado con alginato 3 %-agarosa 1 %; 3: medio condicionado con alginato 3 %; 4: medio condicionado con agarosa 1 %; 5: medio condicionado con agarosa 1 % + CaCl <sub>2</sub> 10 %; 6: células + medio de cultivo control (control negativo de toxicidad); 7: células + medio condicionado con látex durante 24 h (control positivo de toxicidad); 8: células + medio condicionado con alginato 3 %-agarosa 1 %; 9: células + medio condicionado con alginato 3 %; 10: células + medio condicionado con agarosa 1 %, y 11: células + medio condicionado con agarosa 1 % + CaCl <sub>2</sub> 10 %.....	46
Figura 14. Distribución de las diluciones de CaCl <sub>2</sub> y los controles en la placa de cultivo de 96 pocillos. Columna 1: medio de cultivo control; 2: células + medio de cultivo control (control negativo de toxicidad); 3: células + medio condicionado con látex durante 24 h (control positivo de toxicidad); 4: dilución de CaCl <sub>2</sub> al 10 %; 5: dilución de CaCl <sub>2</sub> al 5 %; 6: dilución de CaCl <sub>2</sub> al 2,5 %; 7: dilución de CaCl <sub>2</sub> al 1,25 %, y 8: dilución de CaCl <sub>2</sub> al 0,63 %.....	47
Figura 15. Células pulpares embebidas en hidrogeles de alginato 3 % y agarosa 1 %. Construcción del hidrogel en pocillos MilliCell EZ slides de 8 pocillos (Merck Millipore, EE.UU.) a modo de ejemplo. Barra de escala = 3 mm.....	49
Figura 16. Proceso de elaboración de microtejidos de hDPSC en pocillos de agarosa 3 % in vitro. A: hidrogel de agarosa al 3 % pasadas 48 h a 4 °C; B: siembra de las células en los pocillos realizados en el hidrogel; C: formación de los microtejidos	

pasadas 24 h desde la siembra, y D: microtejido completamente formado pasadas 72 h desde la siembra. Barras de escala = A: 12 mm, y B-D: 3 mm. ....	51
Figura 17. Ejemplo de imagen empleada para realizar el recuento celular utilizando el programa informático Image Pro Plus. En rojo se observan los núcleos marcados de manera automática por el programa; en verde se delimita el área estudiada (límites del microtejido) en el recuento celular. ....	59
Figura 18. Montaje completo del Sistema Generador de campos magnéticos, junto con la enumeración de todos los dispositivos que lo componen. Barra de escala = 15 cm. ....	65
Figura 19. Estructura del dispositivo, con las bobinas de los módulos 1 y 2 y el núcleo electromagnético en naranja.....	67
Figura 20. Distribución de las líneas de flujo magnético cuando solo las bobinas del módulo superior están activadas, y cómo afecta en la zona de trabajo (como referencia, el motor estaría en la parte derecha de la imagen). ....	68
Figura 21. Conexión de las fuentes de alimentación al circuito eléctrico.....	70
Figura 22. Conexión de las fuentes de alimentación para que realizaran el seguimiento de la consigna en corriente dada por el generador de señales. ....	70
Figura 23. Conexión del motor eléctrico.....	71
Figura 24. Dispositivo de cultivo, con tres tubos de microcentrífuga con microtejidos en ellos. ....	72
Figura 25. Toma de tierra.....	72
Figura 26. Pantalla de configuración en el generador de señales. ....	73
Figura 27. Sincronización invertida de las salidas del generador de señales para lograr un comportamiento alterno en cada uno de los módulos magnéticos. ....	74
Figura 28. Opción del menú para que las fuentes de alimentación sigan la consigna del generador de señales. ....	74
Figura 29. Opción del menú para que las fuentes de alimentación sigan la consigna del generador de señales como una señal en voltaje. ....	75
Figura 30. Configuración del control de voltaje en el amplificador para seguir la señal de referencia en corriente, y B: configuración de la señal de referencia en corriente en el amplificador.....	75
Figura 31. Explicación gráfica de los movimientos relativos que permite realizar el motor. ....	78
Figura 32. Explicación gráfica de los movimientos absolutos que permite realizar el motor. ....	79
Figura 33. Esquema seguido para la toma de medidas con el gausímetro de Bell.....	83

Figura 34. Esquema del movimiento de las partículas electromagnéticas al verse sometidas a los EMF; A: activación del par derecho, y B: activación del izquierdo. ....	86
Figura 35. A: fase orgánica elaborada con PLLA y nanopartículas de ferrita disueltas en cloroformo, y B: cabina de extracción de gases donde se realizan las manipulaciones.....	87
Figura 36. Montaje del sistema e inyección de la fase orgánica en la solución acuosa para la formación de las microesferas con partículas férricas. A: bomba de inyección y agitador, y B: inyección de la fase orgánica en la solución acuosa de PVA, donde se observa una gota de la de PLLA + partículas férricas a punto de caer en la fase acuosa.....	88
Figura 37. Formación de un microtejido (flecha negra) rodeado de partículas magnéticas (flecha blanca).....	91
Figura 38. Representación esquemática de las 3 fases obtenidas en el proceso de extracción de ARN.....	94
Figura 39. Análisis bioestadístico del estudio “Determinación tiempos exposición EMF”. .....	102
Figura 40. Análisis bioestadístico del estudio “Estimulación EMF microtejidos”. .....	103
Figura 41. Viabilidad celular de hDPSC cuando han sido expuestas a medios condicionados, durante 24 y 72 h y 7 días, con A: medio control (control negativo); B: látex (control positivo); C: alginato 3 %-agarosa 1 %; D: alginato 3 %; E: agarosa 1 % + 10 % CaCl <sub>2</sub> , y F: agarosa 1 % sin CaCl <sub>2</sub> . Promedio ± desviación estándar; *p ≤ 0,05 respecto al control negativo/tiempo, y <sup>□</sup> p ≤ 0,05 respecto al valor de 24 h/condición.	113
Figura 42. Viabilidad celular de hDPSC cuando han sido expuestas a medios con CaCl <sub>2</sub> , a las concentraciones A: medio control (control negativo); B: látex (control positivo); C: 10 %; D: 5 %; E: 2,50 %; F: 1,24 %, y E: 0,63 %. Promedio ± desviación estándar; *p ≤ 0,05 respecto al control negativo. ....	115
Figura 43. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en hidrogeles de alginato 3 %-agarosa 1 % a A-D: tiempo cero; E-H: 3 días con medio de proliferación, e I-L: 3 días con medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares, en rojo se muestra la distribución de filamentos de actina y en verde, la presencia de las proteínas analizadas que en este caso no se inmunodetectó ninguna de ellas. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 10 μm. ....	117
Figura 44. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en hidrogeles de alginato 3 %-agarosa 1 % con medio de proliferación durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares, en rojo se muestra la distribución de filamentos de actina y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. En la esquina inferior izquierda de aquellas muestras en que se inmunodetectó alguna de las proteínas aparece la imagen correspondiente al canal verde, para facilitar su visualización. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 10 μm. ....	119

Figura 45. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en hidrogeles de alginato 3 %-agarosa 1 % con medio de diferenciación condrogénica durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares, en rojo se muestra la distribución de filamentos de actina y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. En la esquina inferior izquierda de aquellas muestras en que se inmunodetectó alguna de las proteínas aparece la imagen correspondiente al canal verde, para facilitar su visualización. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ..... 120

Figura 46. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido, teñidas con hematoxilina-eosina, a A y D: tiempo cero; B y E: 3 días con medio de proliferación, y C y F: 3 días con medio de diferenciación condrogénica. Barras de escala = A-C: 50  $\mu\text{m}$ , y D-F: 20  $\mu\text{m}$ ..... 130

Figura 47. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido, teñidas con hematoxilina-eosina, o a A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas, y C y F: 6 semanas. Los medios de cultivo empleados fueron A-C: proliferación, y D-F: diferenciación condrogénica. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ..... 131

Figura 48. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido, teñidas con hematoxilina-eosina, a A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas, y C y F: 6 semanas. Los medios de cultivo empleados fueron A-C: proliferación, y D-F: diferenciación condrogénica. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ ..... 132

Figura 49. Densidad celular en los microtejidos en los diferentes tiempos (rojo: control a  $t = 0$ ) y medios de cultivo analizados (verde: proliferación; azul: diferenciación condrogénica). Promedio  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente significativas (ANOVA one-way,  $p \leq 0,05$ ) en las muestras a 3 días y 2, 4 y 6 semanas respecto al tiempo cero y entre ambos medios de cultivo en las muestras de 2, 4 y 6 semanas. .... 134

Figura 50. Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo de hDPSC en forma de microtejido a A-D: tiempo cero; E-H: 3 días en medio de proliferación, e I-L: 3 días en medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 25  $\mu\text{m}$ . .... 135

Figura 51. Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo de hDPSC en forma de microtejido con medio de proliferación a A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Para resaltar la emisión de fluorescencia en la longitud de onda del color verde, el canal verde de las imágenes de modificó mediante el programa PhotoShop: E y G (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y F (saturación +100 % y luminosidad +25 %). La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 25  $\mu\text{m}$ ..... 136

Figura 52. Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo de hDPSC en forma de microtejido con medio de diferenciación condrogénica a A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Para resaltar la emisión de fluorescencia en la

longitud de onda del color verde, el canal verde de las imágenes de modificó mediante el programa PhotoShop: A y C (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y E-G (saturación +100 % y luminosidad. +25 %). La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 25  $\mu\text{m}$ . ..... 137

Figura 53. Densidad de flujo magnético en la zona de trabajo, distinguiendo 1: a 30 mm de la línea central; 2: a 15 mm de la línea central, y 3: en la línea central. La línea azul representa la tendencia del sistema. .... 148

Figura 54. Campo electromagnético generado cuando se aplicó corriente sobre las bobinas superiores (como referencia, el motor estaría en la parte derecha de la imagen). Medidas tomadas con el gausímetro Metrolab expresadas en mT..... 149

Figura 55. Campo electromagnético generado cuando se aplicó corriente sobre las bobinas inferiores (como referencia, el motor estaría en la parte derecha de la imagen). Medidas tomadas con el gausímetro Metrolab expresadas en mT..... 150

Figura 56. Evolución temporal (tiempo inicial, 1, 6 y 24 h y 3, 7 y 14 días) de la expresión relativa de A: SOX9, B: ACAN, C: COL2A1, D: COL1A1, E: COL10A1, F: VEGFA, y G: HIF1A1. Las muestras en tiempo cero o inicial se tomaron como control de la expresión relativa. Se representa el valor promedio y la desviación estándar (barra de error); \* $p \leq 0,05$  respecto al control (t = 0). ..... 153

Figura 57. Estudio de la viabilidad de A: microtejidos de hDPSC expuestos al campo electromagnético durante 3 días. Se tomaron como controles B: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a 37 °C durante los periodos de exposición; C: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a temperatura ambiente durante la exposición, y D: microtejidos mantenidos dentro del incubador celular durante todo el estudio. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \* $p \leq 0,05$  respecto al grupo control D. .... 154

Figura 58. Imágenes representativas de microtejidos de hDPSC procesados y teñidos con hematoxilina-eosina. A: microtejidos de hDPSC expuestos al campo electromagnético durante 3 días. Se tomaron como controles B: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a 37 °C durante los periodos de exposición; C: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a temperatura ambiente durante la exposición, y D: microtejidos mantenidos dentro del incubador celular durante todo el estudio. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . ..... 155

Figura 59. Imágenes tomadas al microscopio óptico de una partícula. Imágenes tomadas en diferentes planos de enfoque, siendo A: plano superior, y B: plano medio o ecuatorial de la partícula. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . ..... 156

Figura 60. Expresión relativa de SOX9 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$

desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $^{\alpha} p \leq 0,05$  respecto a la muestra J, y  $^{\#} p \leq 0,05$  respecto la muestra K. .... 158

Figura 61. Expresión relativa de ACAN respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $^{\alpha} p \leq 0,05$  respecto a la muestra J, y  $^{\circ} p \leq 0,05$  respecto a la muestra A. .... 159

Figura 62. Expresión relativa de COL2A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $^{\alpha} p \leq 0,05$  respecto a la muestra J;  $^{\#} p \leq 0,05$  respecto a la muestra K, y  $^{\circ} p \leq 0,05$  respecto a las muestras A/C en su caso. .... 160

Figura 63. Expresión relativa de COL1A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $^{\alpha} p \leq 0,05$  respecto a la muestra J;  $^{\#} p \leq 0,05$  respecto a la muestra K; y  $^{\circ} p \leq 0,05$  respecto a la muestra A. .... 161

Figura 64. Expresión relativa de COL10A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $^{\alpha} p \leq 0,05$  respecto a la muestra J; y  $^{\#} p \leq 0,05$  respecto a la muestra K. .... 162

Figura 65. Expresión relativa de VEGFA respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas

electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $^{\alpha}$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J; y  $^{\#}$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra K. .... 163

Figura 66. Expresión relativa de HIF1A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $^{\alpha}$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J;  $^{\#}$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra K; y  $^{\circ}$   $p \leq 0,05$  respecto a las muestras A/C en su caso. .... 164

Figura 67. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido teñidas con hematoxilina-eosina. A-C: microtejidos estimulados electromagneto-mecánicamente durante 3 días o, D-F, mantenidos en el incubador celular 3 días y, posteriormente, mantenido en el incubador con medio de diferenciación condrogénica durante A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas; y C y F: 6 semanas. Barra de escala = 50  $\mu$ m. .... 166

Figura 68. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido teñidas con hematoxilina-eosina. A-C: microtejidos estimulados electromagneto-mecánicamente durante 3 días o, D-F, mantenidos en el incubador celular 3 días, y posteriormente mantenidos en el incubador con medio de diferenciación condrogénica durante A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas, y C y F: 6 semanas. Barra de escala = 20  $\mu$ m. .... 167

Figura 69. Imagen de un microtejido estimulado electromagneto-mecánicamente durante 72 h en presencia de partículas electromagnéticas y mantenido 4 semanas en el incubador celular. La flecha indica la partícula electromagnética con células adheridas a ella. Tinción de hematoxilina-eosina. Barra de escala = 50  $\mu$ m. .... 168

Figura 70. Densidad celular en los microtejidos en las diferentes condiciones estudiadas (azul: muestras en incubador sin estimular; verde: muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 3 días) y tiempos de cultivo analizados (rojo: control a  $t = 0$ ). Promedio  $\pm$  desviación estándar. Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en las muestras a 2, 4 y 6 semanas respecto al tiempo cero y entre ambas condiciones en las muestras de 4 y 6 semanas. .... 169

Figura 71. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en forma de microtejidos, estimulados electromagneto-mecánicamente durante 3 días y mantenidos posteriormente en el incubador celular durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En todo el estudio las muestras estuvieron en medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares (teñidos con DAPI) y, en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Canal verde de las

imágenes modificado mediante PhotoShop: A-C, E, G y K (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y F, I y J (sat. +100 % y lum. +25 %). Barra de escala = 25  $\mu$ m. 170

Figura 72. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en forma de microtejidos mantenidos en el incubador celular tanto durante el tratamiento de estimulación electromagneto-mecánica como posteriormente, durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas; e I-L: 6 semanas. En todo el estudio las muestras estuvieron en medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares (teñidos con DAPI) y, en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Canal verde de las imágenes modificado mediante PhotoShop: A y C (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y E-G (sat. +100 % y lum. +25 %). Barra de escala = 25  $\mu$ m. .... 171

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Daly et al. de los diferentes tipos de hidrogeles junto con su capacidad condrogénica <sup>81</sup> .....	27
Tabla 2. Protocolo de inclusión de tejidos y muestras en parafina.....	54
Tabla 3. Protocolo de desparafinación e hidratación de las secciones.....	55
Tabla 4. Puntuaciones según la presencia de la sustancia analizada en la muestra...	62
Tabla 5. Principales componentes del dispositivo EMFGS.....	66
Tabla 6. Características generales y eléctricas del dispositivo.....	69
Tabla 7. Riesgos del Sistema Generador de campos magnéticos. ....	82
Tabla 8. Listado de muestras elaboradas para este estudio de viabilidad de hDPSC expuestas al campo electromagnético empleado.....	85
Tabla 9. Listado de las muestras con las diferentes condiciones estudiadas en los tratamientos de estimulación electromagneto-mecánica.....	93
Tabla 10. Volúmenes de muestra y reactivos empleados para la RT-PCR. ....	96
Tabla 11. Temperatura y tiempo seguidos en cada paso de la PCR.....	97
Tabla 12. Volúmenes de muestra y reactivos empleados para la PCR cuantitativa. ...	98
Tabla 13. Temperatura y tiempo seguidos en cada paso de la qPCR.....	98
Tabla 14. Listado de genes con su significancia. ....	99
Tabla 15. Determinación de variables por estudio realizado y analizado mediante expresión génica.....	100
Tabla 16. Siembra de hADSC, cultivadas durante varios días y determinación de la viabilidad celular. ....	107
Tabla 17. Siembra de hDPSC, cultivadas durante varios días y determinación de la viabilidad celular. ....	108
Tabla 18. Medidas de EMF obtenidas con la sonda paralela al recorrido de las muestras. S: superior, C: central, I: inferior, y P: promedio. Medidas expresadas en mT. ....	150
Tabla 19. Medidas de EMF obtenidas con la sonda perpendicular al recorrido de las muestras. S: superior, C: central, I: inferior, y P: promedio. Medidas expresadas en mT. ....	151

# INTRODUCCIÓN

Una de las características que hacen del ser humano un ente único es su capacidad de razonar y sociabilizar. Convive en sociedad, y el movimiento forma parte de su día a día. De entre todos los aparatos que forman el cuerpo, es el locomotor el que permite el movimiento, en definitiva, el desplazamiento en la sociedad, posibilitando la interacción entre personas.

El cartílago forma parte de este aparato locomotor, y se trata de un tejido fundamental debido a sus funciones de amortiguamiento y disipación de tensiones. Factores como la edad, enfermedades, hábitos de vida o traumatismos provocan lesiones en el tejido cartilaginoso, de difícil autorregeneración por sus características estructurales y fisiológicas.

La baja capacidad de regeneración autónoma de cartílago ha puesto a este tejido en el punto de mira de la investigación biomédica, siendo hoy en día su regeneración una de las metas a conseguir. Aunque se han desarrollado terapias o tratamientos quirúrgicos que han dado resultados aceptables a corto plazo, con el tiempo se han descartado, solo aplicándolos a determinados casos de pacientes.

En las últimas décadas ha surgido la ingeniería tisular, una nueva rama de la biomedicina que, combinada con los principios de la ingeniería, se centra en reparar los tejidos. Esta nueva ciencia está basada en tres pilares fundamentales: las células, los biomateriales y el entorno, tanto en lo que se refiere a los factores de crecimiento o estimulantes como a los estímulos físicos.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha centrado en la regeneración de cartílago articular. Para ello, se han tenido en cuenta los pilares de la ingeniería tisular. Por una parte, la elección del tipo celular empleado ha sido clave tanto para la puesta a punto de los procedimientos como también para conseguir los objetivos planteados. Y es que se ha demostrado el uso de las células madre, y en concreto las células madre de pulpa dental, permite obtener resultados óptimos en la regeneración condral.

Existe un listado muy extenso de biomateriales utilizados en investigación, con sus respectivas propiedades biofísicas, bioquímicas y biomecánicas. No obstante, el cartílago, por su composición y características mecánicas, se apoya en el uso de hidrogeles, un material viscoelástico con propiedades similares al cartílago articular.

Finalmente, aunque se han descrito innumerables factores químicos que favorecen la diferenciación condrogénica, queda mucho por estudiar en el campo de la estimulación física, específicamente mediante el electromagnetismo. La frecuencia, el tiempo de exposición y la magnitud del campo electromagnético son variables a tener en cuenta. Y es que el uso de pulsos electromagnéticos ha dado resultados positivos tanto en estudios *in vitro* como en estudios clínicos, sin que todavía exista un protocolo estándar de uso.

## 1. El cartílago

El tejido cartilaginoso<sup>1,2</sup>, en general, desempeña un papel fundamental en el aparato locomotor, desde su formación hasta su mantenimiento. Durante el desarrollo embrionario, muchos de los elementos esqueléticos empiezan como un molde de cartílago que tiene su origen en el mesénquima, con su posterior calcificación y formación de hueso (osificación endocondral).

Su función de sostén, característica principal de este tejido conjuntivo especial, viene determinada por los componentes de su matriz extracelular (MEC). Estos componentes le confieren rigidez, elasticidad y deformabilidad.

El cartílago es avascular y carece de inervación. Es por ello por lo que las células presentes en su matriz se nutren por difusión y en gran medida se considera un sistema anaerobio.

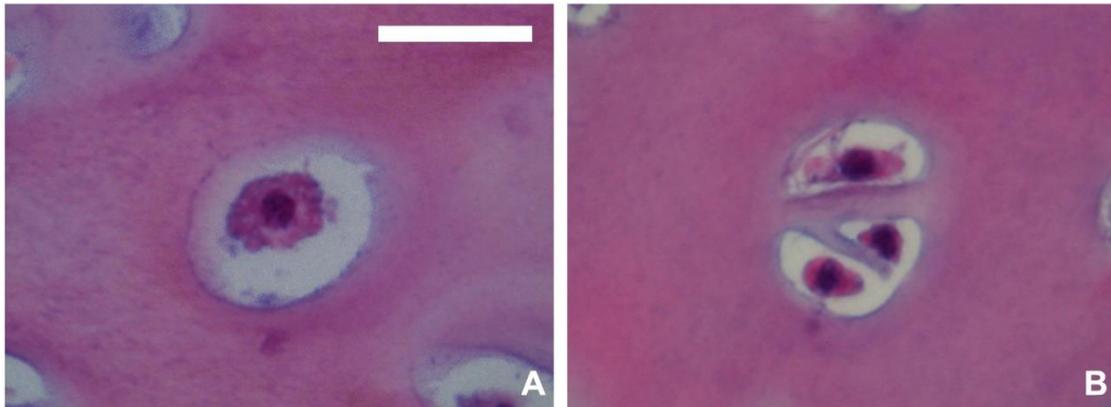
### 1.1. Células y matriz estructural

Las células presentes en el tejido cartilaginoso son los condrocitos y los condroblastos junto con condroclastos, y también células madre mesenquimáticas<sup>1,2</sup>. Estas últimas se sitúan en el pericondrio, la capa más externa del cartílago.

Los condroblastos son células que provienen de las células mesenquimáticas. Son los encargados de sintetizar las moléculas que formarán la matriz condral, y se sitúan en las áreas más periféricas de las piezas cartilaginosas en formación.

Una vez el condroblasto se ve rodeado por la matriz sintetizada, ocupando un espacio denominado laguna o condrocele (figura 1), se diferencia hacia un condrocito (figura 1). Los condrocitos que a su vez siguen sintetizando sustancias de la matriz se denominan condrocitos activos, los cuales poseen citoplasma basófilo, con muchas organelas y un núcleo de cromatina laxa. En el momento en el que el condrocito se vuelve inactivo o quiescente, su citoplasma se hace eosinófilo, progresivamente pierde organelas y la cromatina de su núcleo se condensa.

Finalmente, las últimas células presentes en el tejido cartilaginoso son los condrocitos. Estas células, que derivan de los macrófagos, son las encargadas de digerir los componentes de la matriz condral, lo que ocurre en el momento en el que se debe regenerar el cartílago o sustituir por otro tejido, en concreto por tejido óseo.



*Figura 1. Tinción con hematoxilina-eosina de condrocitos en cartílago traqueal. A: condrocito aislado, y B: grupo isógeno o agrupación de 3 condrocitos. Durante el procesamiento de las muestras, se ha producido la retracción del citoplasma de los condrocitos, lo que facilita observar, en este caso, el límite de las lagunas que ocupan. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.*

La matriz cartilaginosa tiene como función principal dar sostén a todo el sistema cartilaginoso, rodeando los condrocitos.

Se compone en gran medida de fibras rodeadas de sustancia fundamental amorfa. Se trata de una matriz muy hidratada (el agua es el componente principal y puede llegar a ser hasta el 80 % del peso neto de la matriz) y gelatinosa, debido a los glucosaminoglicanos (GAG) y glicoproteínas que contiene. En general, las fibras que componen la matriz son mayoritariamente el colágeno tipo II (en cartílago hialino) y, en menor cantidad, los colágenos tipo IX, X y XI. En el cartílago fibroso (y en el pericondrio) abunda el colágeno tipo I. En la variedad de cartílago elástico se encuentran además de las de colágeno tipo II, fibras elásticas. Finalmente, la sustancia fundamental está compuesta por glucosaminoglicanos, proteoglicanos (PG) y glicoproteínas de adhesión, como la condronectina. Además, la matriz condral contiene

diversas metaloproteasas de matriz (MMP) que ayudan a degradar componentes de la matriz de forma regulada y precisa.

La mayoría de los cartílagos están rodeados de una capa denominada pericondrio. Este a su vez se compone de dos capas. La más externa, también llamada capa nutricia, está compuesta por tejido conjuntivo denso, con fibras de colágena y elásticas, y en ella se sitúan fibroblastos. Esta capa fibrosa queda por fuera de las piezas cartilaginosas, aportando vascularización e inervación. Formada sobre todo por colágeno tipo I, le da consistencia a todo el sistema, y a su vez permite la nutrición de las células del sistema cartilaginoso mediante difusión.

La capa interna del pericondrio, la capa condrogénica, es más laxa y celular, y es donde se observan las células madre mesenquimales, las cuales acabarán diferenciándose a condroblastos para formar nueva matriz y, globalmente, nuevo cartílago.

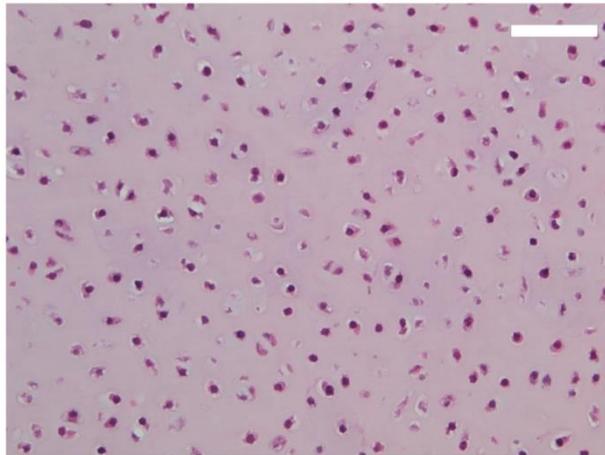
No obstante, cabe adelantar que, como se detallará más adelante, el cartílago presente en las articulaciones móviles carece de pericondrio, por lo que su nutrición se lleva a cabo a partir de la difusión de los nutrientes que están en el líquido sinovial situado en la cavidad articular, una de las partes que componen dichas articulaciones.

### 1.2. Tipos de cartílago

Existen cuatro tipos de cartílago diferentes, atendiendo a la etapa de desarrollo en que están presentes y, fundamentalmente, a sus componentes y su función<sup>1,2</sup>.

### 1.2.1. Cartílago fetal o epitelióideo

Este tipo de cartílago tiene una gran densidad de células cartilaginosas fusiformes o más o menos redondeadas, que en muchos casos llegan a ser estrelladas. Se distribuyen uniformemente, de forma individual o en pequeños grupos, por toda la matriz condral, en la que no se forman lagunas donde las células se situarán. El pericondrio se encuentra muy vascularizado, permitiendo la nutrición de las células en la matriz.

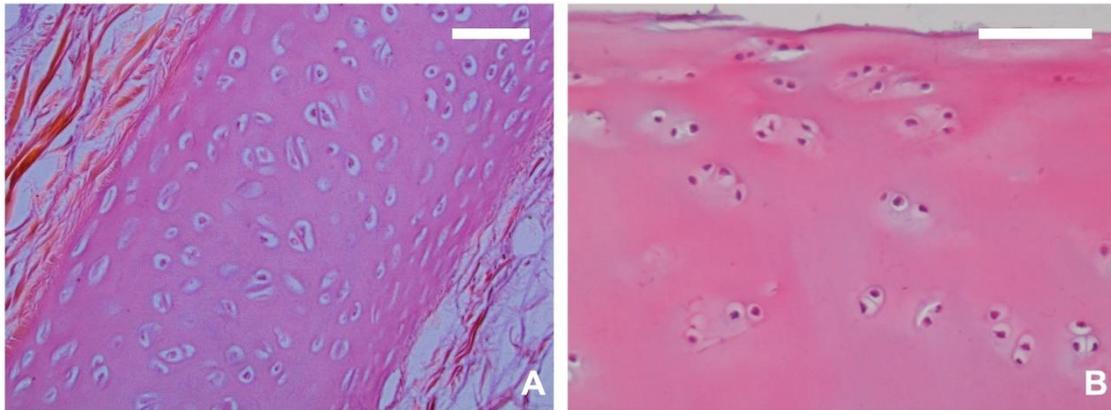


*Figura 2. Tinción con hematoxilina-eosina de condrocitos en cartílago epitelióideo en un hueso en formación de la mano de un feto de 6 meses. Obsérvese que no todavía no hay ordenamiento celular por el tejido. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.*

### 1.2.2. Cartílago hialino

Es el más abundante del sistema locomotor del cuerpo, y son las características de este tipo de cartílago las que se pretenden conseguir en el modelo experimental que se desarrolla en este trabajo.

Se trata de un cartílago de aspecto vítreo, de ahí el nombre de cartílago hialino (*hyalos* = vidrio). Es transparente en secciones finas y de color blanco-azulado. Su matriz está compuesta fundamentalmente por fibras de colágena tipo II; en el cartílago articular, estas fibras se disponen de forma paralela a la superficie y forman estructuras en arcada, las cuales se dirigen hacia el interior del cartílago de forma perpendicular a la superficie.



*Figura 3. Tinción con hematoxilina-eosina de cartílago hialino de conejo en A: tráquea, y B: rodilla (cóndilo femoral). Barras de escala = A: 50  $\mu$ m, y B: 100  $\mu$ m. Obsérvense que, por un lado, los condrocitos de la tráquea se encuentran ligeramente aplanados en la zona más externa de esta, mientras que en su interior presentan una morfología más redondeada o poligonal. Por lo que respecta al cóndilo femoral, obsérvense grupos isógenos de condrocitos en la zona interna, mientras que en la superficie estas células tienden a presentarse con morfología ligeramente aplanada. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.*

Con el envejecimiento del cartílago hialino, este tiende a sufrir alteraciones degenerativas, debido, en gran medida, a la pérdida de agua en la matriz, a alteraciones en los proteoglicanos, a la calcificación de la matriz y a la muerte celular. Debido a todo esto se desarrollan patologías como la osteoartritis y la osteocondritis, patologías con gran impacto en la sociedad española<sup>3</sup>.

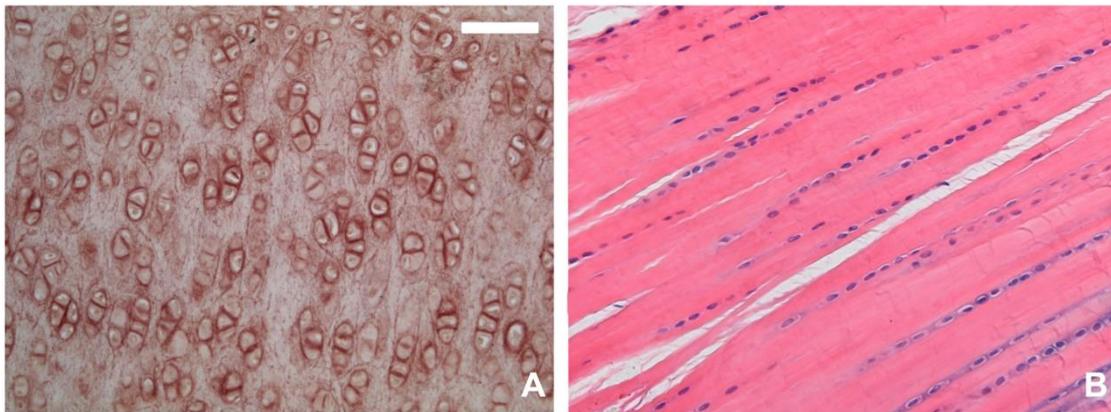
### 1.2.3. Cartílago elástico

Este cartílago es rico en fibras elásticas, lo que hace que tenga una coloración amarillenta pálida. Dada su flexibilidad y elasticidad es el que se sitúa en el pabellón auricular, la epiglottis y en algunas zonas de la laringe.

En este tipo de cartílago, a diferencia del cartílago hialino, los condrocitos normalmente se distribuyen en hileras, perpendiculares a la superficie, y las condronas son más pequeñas.

#### 1.2.4. Cartílago fibroso o fibrocartílago

Se trata de un cartílago denso y resistente. Se sitúa en las porciones internas del anillo fibroso de los discos intervertebrales y en regiones de inserción de los tendones en los huesos. Los condrocitos son de aspecto fusiforme, se encuentran organizados en hileras y se ven rodeados de conjuntivo denso en el que hay gran cantidad de fibras de colágeno tipo I. Esta composición confiere resistencia a la tracción.



*Figura 4. A: Tinción con orceína de cartílago elástico del pabellón auricular humano. Obsérvese la abundancia de grupos isógenos, en que los condrocitos a menudo se disponen en hileras. Esta tinción destaca la presencia de fibras elástica en la matriz extracelular. B: Tinción con hematoxilina-eosina de cartílago fibroso humano de la unión tendón-hueso. Obsérvese los condrocitos alineados en hileras, rodeados en su proximidad por una matriz basófila. Entre las hileras de condrocitos, hay una gran cantidad de tejido conjuntivo denso en el que se aprecian algunos fibroblastos. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Preparaciones propias obtenidas en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.*

#### 1.3. El cartílago en las articulaciones sinoviales

Las articulaciones sinoviales<sup>1,2,4,5</sup>, también llamadas diartrosis, están compuestas por las superficies articulares cartilaginosas, la cavidad articular y la cápsula articular. Este tipo de articulación permite movimientos libres de diferentes amplitudes entre dos huesos separados por un espacio, llamado espacio articular. Además, sirve de amortiguación de las presiones recibidas durante los movimientos y de lubricación entre los huesos que componen la articulación.

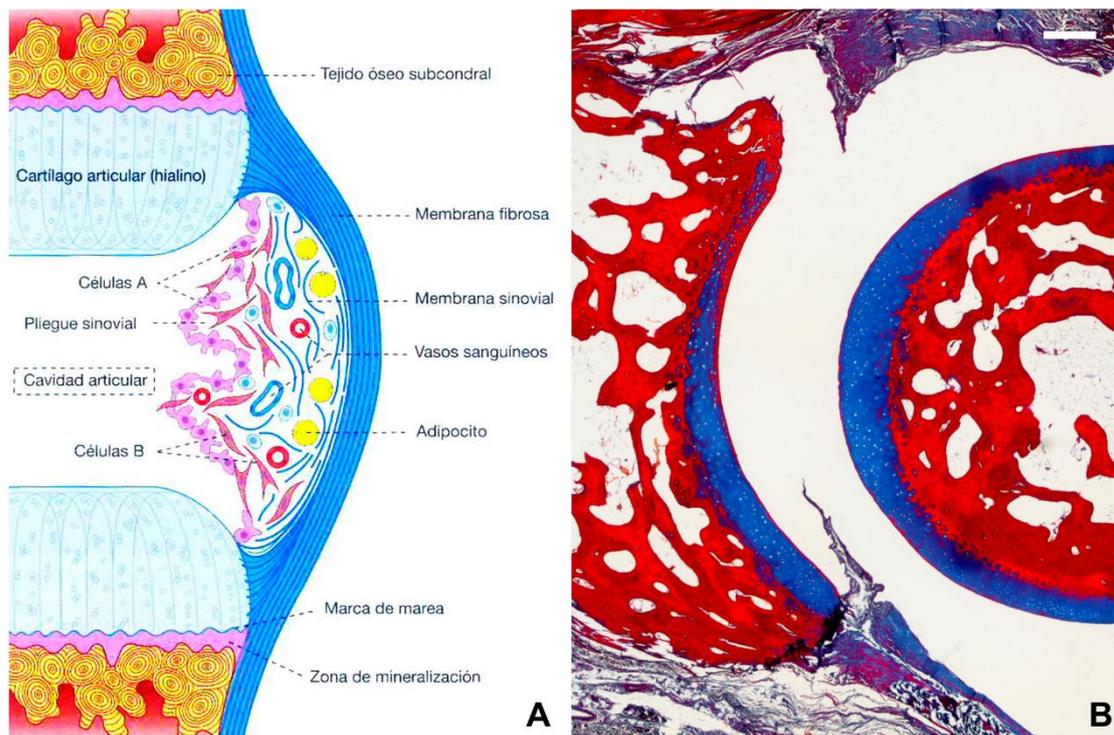


Figura 5. Diarthrosis. A: esquema representativo extraído de <sup>1</sup>, y B: tinción con tricrómico de Masson de una diarthrosis en las falanges de dedo humano. La imagen B es el resultado de la fusión de varias imágenes digitales solapadas realizada empleando el programa PhotoShop; barra de escala = 400  $\mu$ m. En esta preparación, se pueden observar todas las partes de la diarthrosis (hueso subcondral, cartílago articular y cavidad articular). Preparación obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.

### 1.3.1. Superficies articulares: cartílago articular

En general, se trata de un cartílago hialino, aunque en ocasiones puede ser fibrocartílago (por ejemplo, en las articulaciones temporomandibular y esternoclavicular). La superficie es lisa y de espesor variable, dependiendo de la intensidad de las fuerzas mecánicas (presión y compresión, entre otras) que recibe.

En el cartílago articular se distinguen cuatro zonas, a causa de la diferente distribución de las fibras de colágena de tipo II y de la organización espacial de las células condrales.

#### 1.3.1.1. *Zona I o superficial*

Se trata de la zona superficial, con disposición tangencial de las fibras de colágeno tipo II respecto a la superficie. Estas fibras, abundantes y delgadas, se organizan prácticamente de forma paralela a la superficie, pudiendo describir arcos con el punto de máxima altura orientado hacia la superficie. Este entramado fibroso protege de forma directa el cartílago de los estratos inferiores de las presiones directas recibidas durante el funcionamiento de la articulación.

En esta zona los condrocitos son fusiformes y pequeños, y se encuentran organizados paralelamente a la superficie articular.

Durante el crecimiento, el tejido cartilaginoso se va generando desde este primer estrato<sup>1</sup>.

#### 1.3.1.2. *Zona II o intermedia*

Este estrato es una zona de transición. En este caso la mayor parte de los condrocitos se encuentran aislados o formando parejas. Las fibras de colágena, en su caso, se arquean hasta disponerse perpendiculares a la superficie, formando entrecruzamientos; esto posibilita la disgregación de las presiones puntuales en tensiones de menor valor hacia los estratos inferiores.

#### 1.3.1.3. *Zona III o radial*

Esta es la zona radial del cartílago articular. Las fibras de colágeno se orientan de forma prácticamente perpendicular a la superficie, distribuyéndose de forma laxa por la matriz. Estas fibras son más gruesas que en los estratos superiores.

Esta distribución radial de las fibras colágenas tiene un papel fundamental en todo el complejo articular. En este estrato las presiones recibidas y disgregadas en los estratos superiores se distribuyen uniformemente por toda la matriz, atenuando el valor absoluto de la presión puntual recibida. Esto impide la formación de microlesiones en el hueso subcondral.

Los condrocitos siguen la distribución de las fibras radiales, formando a su vez grupos isógenos lineales, alargados. Estas células tienen un retículo endoplasmático rugoso (RER) abundante, y su aparato de Golgi es grande y activo. Debido a su actividad de síntesis, estos condrocitos contienen mucho glucógeno.

#### 1.3.1.4. Zona IV o calcificada

Se trata de la zona de cartílago mineralizado, ubicado directamente sobre el hueso subcondral. Se observa un número muy bajo de condrocitos en esta zona, e incluso muchos de ellos están muertos.

Una vez las presiones llegan a zona IV, se transmiten hacia el hueso subcondral con tal de que acaben disipándose. Además, impide que el cartílago se separe del mismo hueso, formando entrelazamientos importantes en el límite cartílago-hueso, denominado línea de marea. Sin embargo, estos entrelazamientos no hacen que las fibras de colágeno pasen de un tejido al otro.

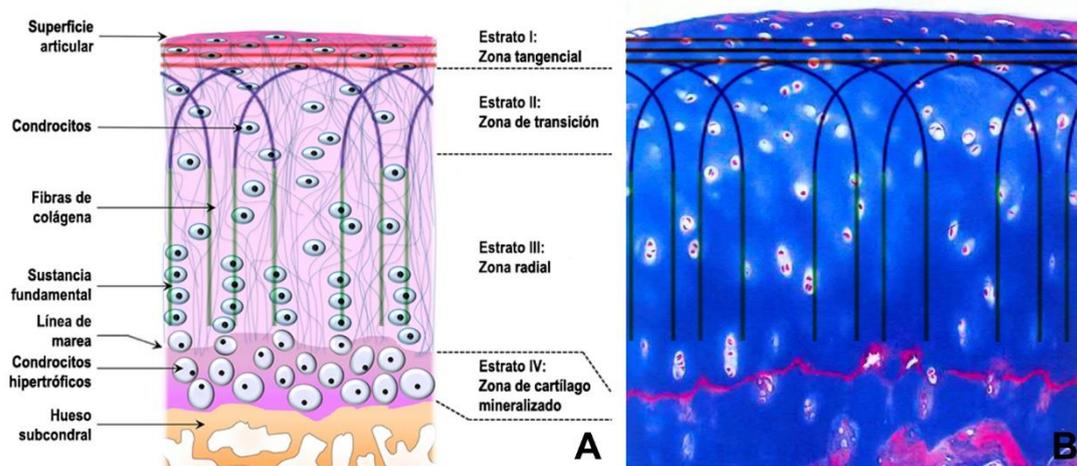


Figura 6. Estratos del cartílago articular. A: representación esquemática de los estratos condrales<sup>6</sup>, y B: histología de cartílago articular mediante la tinción con tricrómico de Masson, imagen tomada de <sup>1</sup>. Obsérvese la distribución de las fibras en la matriz extracelular como también la disposición de las células, siendo más aplanada en la superficie del cartílago y redondeadas formando hileras hacia el interior de este.

### 1.3.2. Cápsula articular

La cápsula articular está formada por dos membranas: la membrana fibrosa externa y la membrana sinovial interna (figura 5).

La membrana fibrosa, compuesta por tejido conjuntivo denso, se sitúa en la parte externa y es continuación del tejido conjuntivo denso del periostio. Su función principal es dar estabilidad a la articulación.

Por lo que respecta a la membrana sinovial, esta forma pliegues y vellosidades de formas variadas las cuales sobresalen en la cavidad articular. Está compuesta a su vez por la íntima sinovial (capa de revestimiento sinovial, situada en el interior) y externamente por la capa subintimal (subsinovial).

### 1.3.3. Cavidad articular

El líquido sinovial se encuentra en la cavidad articular. Es transparente y filante, y contiene proteínas, hialuronato, glucosa y agua. Sus funciones principales son la lubricación y la amortiguación de la articulación, y además nutre por difusión el cartílago articular, ya que este es avascular y carece de pericondrio.

## 2. Lesiones condrales

Como ya se ha explicado, una de las principales funciones del cartílago es soportar las tensiones que recibe. Una prolongada exposición a estas provoca el desgaste condral. Este desgaste prolongado se convierte en irreversible porque, como ya se ha detallado anteriormente, el cartílago es avascular, lo que dificulta el flujo hacia él de células menos diferenciadas, capaces de regenerar el tejido y curarlo<sup>1,2</sup>. Además, el cartílago articular carece de pericondrio, por lo que no dispone de vascularización externa ni de presencia de células madre mesenquimales (MSC). Todo ello se suma a la limitada capacidad proliferativa de los condrocitos maduros<sup>7</sup>.

Así pues, en respuesta a la generación de un daño en el cartílago articular se origina normalmente una cicatriz de carácter fibroso, compuesta por colágeno tipo I y células de tipo fibroblasto. Este tejido fibroso posee una organización celular y matricial pobre y, por lo tanto, peores propiedades biomecánicas<sup>8</sup> que el cartílago hialino articular.

La etiología de estas lesiones condrales viene determinada por diferentes factores, como son la propia degeneración articular natural (debida a la edad<sup>9</sup>), como también por causas infecciosas (artritis séptica), enfermedades de depósito (condrocalcinosis) y otras causas no traumáticas (necrosis condilar). Sumado a lo anterior, se deben incluir también los traumatismos articulares.

Además, la alteración del eje mecánico o la inestabilidad de la articulación del paciente son también factores que en traumatología es importante considerar. Esta alteración puede provocar, en definitiva, una sobrecarga mecánica sobre el tejido cartilaginoso articular<sup>10</sup>, provocando lesiones condrales<sup>11,12</sup>.

El tejido tendrá la capacidad de regenerar estas lesiones según sean el tamaño y la profundidad de las mismas. Si la lesión no altera la superficie articular y las células son viables la reestructuración del tejido será posible por la neosíntesis de la matriz. No obstante, si la lesión es mayor, la reparación del tejido dará lugar a un tejido fibroso, con su posterior degeneración articular<sup>13,14</sup>.

## 2.1. Tratamientos clínicos

Como ya se ha comentado anteriormente, debido a que el cartílago carece de vascularización, este posee una baja capacidad autorregenerativa. Y, además, esta regeneración intrínseca viene determinada por el tamaño y profundidad de la lesión condral.

Es por lo anterior que a lo largo de los años se han ido elaborando un gran número de tratamientos que ayudan a, inicialmente, paliar el dolor provocado por la lesión y, también, a intentar reparar el daño provocado. No obstante, hoy en día todavía no se ha desarrollado ninguna terapia que proporcione resultados óptimos a largo plazo.

### 2.1.1. Tratamiento ortopédico

La limitación de las cargas se aplicará en casos de pacientes de mayor edad, con menor posibilidad de movimiento funcional y con lesiones de menor tamaño. Para ello se emplean elementos ortopédicos externos, que fijan la articulación y, en muchos casos, la inmovilizan. Además, estos elementos ayudan a controlar las cargas que llegan directamente a la articulación lesionada.

### 2.1.2. Desbridamiento artroscópico

La artroscopia es una técnica mínimamente invasiva que consiste en la eliminación de fragmentos condrales rotos y la regularización de la superficie articular. Este tratamiento está indicado en pacientes con baja demanda funcional, con síntomas meniscales, pérdida del eje de alineación (menor a 5°), en los que hay presencia de cuerpos libres en la articulación y en que solo está afectado un compartimento condral.

Sin embargo, este procedimiento ofrece malos resultados a medio y largo plazo, debiendo realizarse una posterior intervención a los pocos años<sup>15</sup> de la primera.

### 2.1.3. Condroabrasión

Este tratamiento consiste en la limpieza quirúrgica de la lesión superficial condral, no aplicable en casos de inestabilidad y desalineación articular, obesidad mórbida e incapacidad para descargas prolongadas. La aplicación de este tratamiento no consigue buenos resultados en la mayoría de los casos<sup>16</sup>.

### 2.1.4. Microfracturas

La técnica de las microfracturas consiste en realizar perforaciones en la zona de la lesión condral, lo suficientemente profundas como para penetrar en el hueso subcondral, donde se encuentra la médula ósea. Debido a lo anterior, esta técnica también es conocida como estimulación medular<sup>17</sup>.

Estas perforaciones tienen como objetivo permitir el acceso de las células madre mesenquimáticas desde la médula hasta la lesión. Estas células pluripotenciales tenderán a la diferenciación condrogénica, ayudando así a la regeneración.

El tratamiento mediante microfracturas está indicado en pacientes jóvenes, con demanda funcional. Los resultados observados a corto plazo no llegan a ser óptimos en lesiones menores a 2 cm<sup>2</sup>, llegando a ser un fracaso a los 5 años posteriores al tratamiento<sup>18,19</sup>.

### 2.1.5. Mosaicoplastia

En lesiones de mayor tamaño (mayores a 2 cm<sup>2</sup>) se puede realizar la técnica de la mosaicoplastia. Esta consiste en extraer una porción cilíndrica de tejido osteocondral sano propio del paciente e implantarlo en la zona de la lesión. Debido a que se emplea en lesiones en que está afectada una superficie grande, la mosaicoplastia debe realizarse conjuntamente con una cirugía artroscópica.

Se puede llevar a cabo en pacientes de menos de 50 años, con articulaciones estables y sin alteraciones del eje mecánico. Los resultados

obtenidos con esta técnica son favorables en muchos casos, observándose una regeneración condral óptima<sup>20</sup>.

### 2.1.6. Aloinjertos

Los aloinjertos se emplean en lesiones traumáticas grandes, de hasta 4 cm<sup>2</sup>. También se emplean en cirugías de salvamento. No obstante, la viabilidad de estos injertos plantea controversias<sup>21</sup> y está sujeta a diversas consideraciones que se deben tener en cuenta a la hora de la intervención. Estos condicionamientos son, en definitiva, la coordinación con el banco proveedor del tejido, la protocolización del procedimiento, el tiempo máximo de conservación del aloinjerto y su esterilización mediante agentes químicos, entre otros.

### 3. Ingeniería tisular

La ingeniería tisular es una ciencia interdisciplinar, en la que la biología y la ingeniería se unen para desarrollar sustitutos que ayuden a reparar lesiones en tejidos del cuerpo de los seres vivos, hasta conseguir unas propiedades tanto fisiológicas como mecánicas óptimas propias del tejido nativo. Este término lo acuñó el profesor Yuan-Cheng Fung (Universidad de California, San Diego, EE.UU.) por primera vez en 1987, adoptándose finalmente por la sociedad estadounidense *National Science Foundation*<sup>22,23</sup>.

El impacto de lesiones por pérdida tisular y por fallo orgánico es importante<sup>22</sup>. Como posibles soluciones se encuentran el trasplante, con sus múltiples limitaciones, y la reconstrucción quirúrgica, con problemas a largo plazo, entre otras.

Así pues, Skalak y Rox<sup>23</sup> determinaron que cualquier sustituto o tejido artificial elaborado siguiendo los principios de la ingeniería tisular debía tener como objetivo regenerar, mantener y mejorar las funciones del tejido dañado. Estos tejidos artificiales simulan o mimetizan aquellos tejidos naturales o nativos a los cuales van a sustituir. Es por ello por lo que se requiere un estudio previo exhaustivo de estos sustitutos, siguiendo controles de calidad tanto antes, como durante y después del estudio y del uso clínico.

Claros ejemplos de tejidos artificiales implantados en seres vivos son los vasos linfáticos artificiales de Asano *et al.*<sup>24</sup>, el iris artificial de Mayer *et al.*<sup>25</sup> la implantación de porciones pequeñas de hueso elaborado artificialmente (Ozaki *et al.*<sup>26</sup>), el cartílago artificial combinado con hidroxapatita de Kumai *et al.*<sup>27</sup> y las membranas de poli(vinil-alcohol) (PVA) implantadas en cartílago articular (Tai *et al.*<sup>28</sup>), siendo las tres primeras intervenciones realizadas en humanos y las dos siguientes en rata y conejo, respectivamente.

Partiendo de todo lo anterior, se determinaron tres pilares fundamentales en la ingeniería tisular (IT): células, matriz o estructura material y factores de crecimiento o de estimulación celular<sup>29-33</sup>.

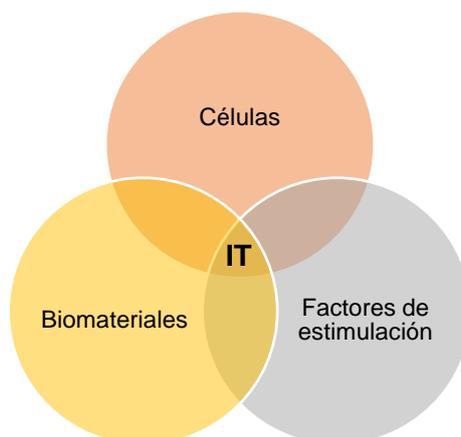


Figura 7. Diagrama de los pilares de la ingeniería tisular. Composición propia.

Estos pilares han sido fundamentales para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Como elemento principal y fundamental del sistema artificial se encuentran las células. El componente celular es, pues, un constituyente básico en la ingeniería de los tejidos. Aunque el uso de las células viene determinado por el objetivo que persigue el tejido artificial, gran parte de los estudios se basan en la utilización de células madre por su capacidad pluripotencial<sup>34-38</sup>. Más aún, conocer las técnicas para la correcta manipulación de las células es fundamental, como también emplear mecanismos de control de calidad, aportando un seguro de buen funcionamiento.

Ejemplos de técnicas más empleadas en las que el uso de las células es fundamental, se encuentran la técnica ACI (*autologous chondrocytes implantation*) y la técnica MACI (*matrix-induced autologous chondrocytes implantation*)<sup>39-41</sup>. Mientras que la primera técnica consiste en la obtención de condrocitos del propio paciente, su cultivo y proliferación *in vitro* y su posterior implantación en la lesión condral, la segunda técnica es más compleja.

Para la técnica MACI se elabora inicialmente una matriz artificial a partir de biomateriales, bioestables y degradables, como son diferentes tipos de polímeros solidificables o sustancias más viscosas como los hidrogeles. Una vez fabricados los andamiajes o hidrogeles, se siembran o se embeben en

ellos las células del paciente, obteniéndose una estructura estable para su posterior implantación en la lesión.

No obstante todo lo anterior, el primer paso a tener en cuenta a la hora de elaborar tejidos artificiales es conocer perfectamente qué tipo de tejido se quiere mimetizar. Es fundamental estudiar qué propiedades biológicas y mecánicas tiene este tejido nativo sano y cuál es su morfología estructural y su composición bioquímica. Además, es importante conocer cómo se regenera en condiciones fisiológicas y cómo se comporta ante factores ambientales o intrínsecos, entre otras muchas consideraciones. En definitiva, conocer todas estas variables condicionará, en gran medida, el resultado final de la intervención.

El siguiente paso es determinar qué tipos celulares se van a emplear y en qué condiciones. El uso del biomaterial es clave en la ingeniería tisular, ya que servirá de sostén celular, determinando las propiedades físicas y mecánicas del tejido artificial. Finalmente, el uso de factores de crecimiento vendrá determinado según el objetivo que se pretenda conseguir con la elaboración del tejido sintético, la posterior implantación quirúrgica y, en definitiva, su posterior comportamiento *in vivo*.

### 3.1. Células madre. DPSC

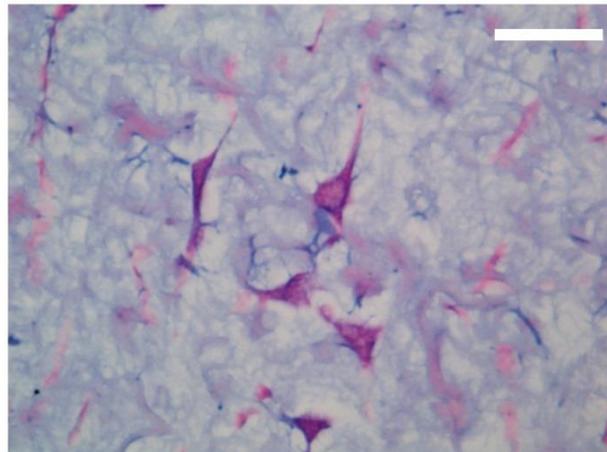
Uno de los puntos más importantes en la ingeniería de los tejidos es escoger qué células se emplearán, teniendo en cuenta su comportamiento y también dependiendo del objetivo a alcanzar.

El uso de células en ingeniería tisular ha ido evolucionando de la misma manera que lo ha hecho esta ciencia. Inicialmente, se consideró el uso de células embrionarias<sup>42,43</sup>. No obstante, rápidamente se descartó su uso debido a su difícil obtención y a problemas éticos<sup>44</sup>. Se continuó con células progenitoras del tejido a reparar<sup>45,46</sup>. Así pues, el uso de las células madre mesenquimales (MSC) tomó protagonismo, y no por pocas razones. La más importante de todas ellas es que se había demostrado la plasticidad y potencialidad de estas células, las cuales se estudiaron mediante técnicas de

transdiferenciación<sup>7,44,47-51</sup>. Otro de los motivos del uso de MSC para regeneración de cartílago es, por ejemplo, su elevada tasa de proliferación, comparada con la de los condrocitos<sup>52-55</sup>.

Las MSC, o también llamadas células madre multipotentes<sup>56</sup>, tienen una alta capacidad de diferenciación a diferentes estirpes celulares. Cabe destacar, entre muchas otras, las capacidades osteoprogenitora y condroprogenitora que poseen. Esta facilidad de diferenciación se ve influida, además, por el microentorno en el que se encuentran, como por ejemplo las adhesiones celulares o las interacciones célula-célula<sup>57</sup>.

Estas células madre se encuentran en diferentes partes del cuerpo, como son la médula ósea (BM-MSC, por sus siglas en inglés), la pulpa dental (DPSC, por sus siglas en inglés) o el tejido adiposo (ADSC, por sus siglas en inglés). También se encuentran en la matriz que compone la gelatina de Wharton del cordón umbilical, como se puede observar en la figura 8.



*Figura 8. Tinción con hematoxilina-eosina de tejido conjuntivo del cordón umbilical humano, en el que hay presentes, entre otras, células madre mesenquimales. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.*

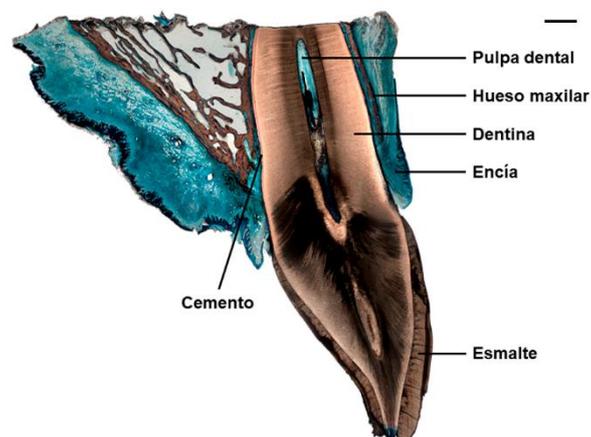
En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se emplearon, inicialmente, células provenientes de la pulpa dental (DPSC) y del tejido adiposo (ADSC). Tras un estudio preliminar, el trabajo se centró, finalmente, en el uso de células pulpares por su capacidad proliferativa, corroborada en numerosos estudios y,

más aún, por su multipotencialidad y evidente capacidad de diferenciación condrogénica<sup>58</sup>.

### 3.1.1. Descripción del diente

Es uno de los órganos fundamentales de la cavidad bucal, siendo la masticación de los alimentos una de sus funciones principales, junto con la fonación. Aunque su morfología varía según su función y su localización dentro de las arcadas maxilar o mandibular, a nivel estructural todas las piezas dentarias son muy parecidas.

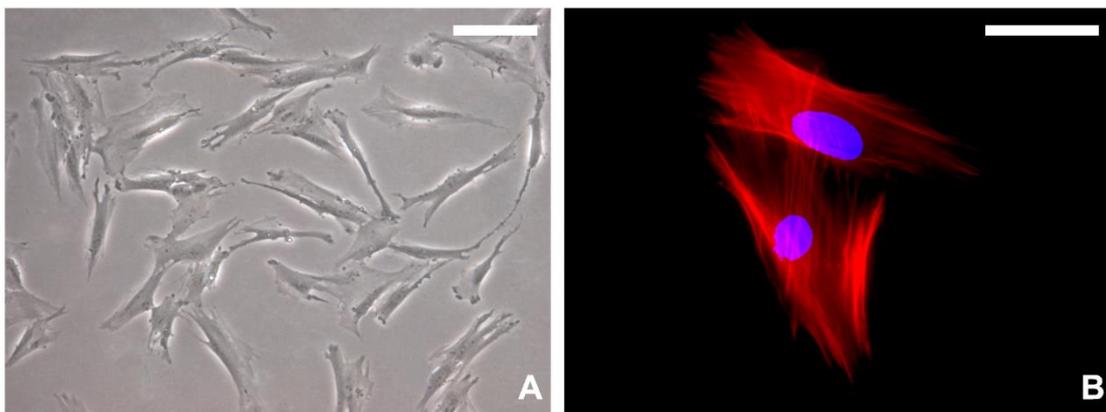
El diente está constituido por tejidos duros mineralizados (dentina, esmalte y cemento, componente este último del periodonto), que envuelven y protegen la pulpa dental<sup>59</sup>. Es en esta última, formada por un tejido conjuntivo laxo mucoso, donde se encuentran los odontoblastos, formadores de la dentina, junto con fibroblastos, células defensivas y las células madre mesenquimales. En la figura 9 se puede observar la estructura de un diente incisivo superior en un corte sagital.



*Figura 9. Corte sagital de diente incisivo superior humano, incluido en polimetilmetacrilato. Se realizó una tinción mediante azul de Stevenel (tinción de tejidos blandos) y fucsina de van Gieson (tejidos mineralizados). La imagen es el resultado de la fusión de varias imágenes digitales solapadas realizada empleando el programa PhotoShop; barra de escala= 800  $\mu$ m. Preparación propia obtenida en el laboratorio de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.*

### 3.1.2. Células madre mesenquimales de pulpa dental (DPSC)

Gronthos *et al.*<sup>60</sup> describieron estas células por primera vez en el año 2000. Las DPSCs son células de citoplasma elongado, fusiforme, con escasas prolongaciones cortas y con un único núcleo normalmente centrado, como se observa en la figura 10. Estas células son precursoras de diferentes células del órgano dentinario<sup>61</sup>, capaces de desarrollar, entre otros, tejidos duros mineralizados. Como se ha comentado anteriormente, gracias a su alta capacidad multipotencial, son capaces de diferenciarse en otros tipos diferentes de células, como son células adipogénicas, osteogénicas y condrogénicas<sup>62</sup>.



*Figura 10. Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental humana en monocapa. A: imagen obtenida en microscopio invertido de contraste de fases, y B: imagen obtenida con el microscopio de fluorescencia. Se observan los núcleos teñidos con DAPI (azul) y los filamentos de actina citoplasmáticos teñidos con rodamina-faloídina (rojo). Barras de escala = A: 100  $\mu\text{m}$ , y B: 50  $\mu\text{m}$ . Preparación propia obtenida en los laboratorios de Ingeniería Tisular y de Histología del departamento de Patología de la Universitat de València.*

Cuando se produce una lesión en el complejo dentinopulpar, se ha observado una proliferación masiva de las DPSC debida a la aparición de señales o factores estimulantes, tanto químicos como físicos, que finalmente inducen la diferenciación de estas células en odontoblastos hasta regenerar la lesión dentinaria<sup>63</sup>.

### 3.1.2.1. Capacidad condrogénica

Diversos trabajos han estudiado la evolución de los genes condroprogenitores en las DPSC, según los estímulos que reciben estas células. Como se puede observar en la figura 11, en el momento en el que una célula mesenquimal, como por ejemplo una célula troncal pulpar, recibe un estímulo condrogénico, esta empieza a expresar inicialmente factor de transcripción SRY 9 (SOX9) a niveles normales<sup>64</sup>. En el momento en el que el factor de crecimiento TFG- $\beta$  entra en acción, la expresión de SOX9 se dispara y, además, entran en juego otros genes como son el COL2A1 (cadena 1 $\alpha$  del colágeno tipo II) y el COL1A1 (cadena 1 $\alpha$  del colágeno tipo I), aunque este último con un nivel de expresión muy bajo<sup>56</sup>.

Llegado el momento, la célula en cuestión puede hipertrofiarse, llegándose a mineralizar la matriz extracelular y vascularizar. Esto se debe a la actuación de una proteína ósea llamada BMP (proteína morfogenética de hueso), que activa la expresión del factor de hipertrofia COL10A1<sup>56</sup>.

No obstante, la presencia de forskolina en el medio de cultivo inhibe la activación del COL10A1 (cadena 1 $\alpha$  del colágeno tipo X), manteniendo el fenotipo condrogénico<sup>65,66</sup>. La inhibición de la forskolina no solo activa la expresión del factor hipertrófico, sino que también favorece la expresión del factor de transcripción relacionado con la diferenciación osteoblástica (RUNX2), del factor de transcripción de la fosfatasa alcalina (ALKL) y del factor de transcripción relacionado con la diferenciación osteogénica (SP7), genes protagonistas de la osteogénesis, como se observa en la figura 11.

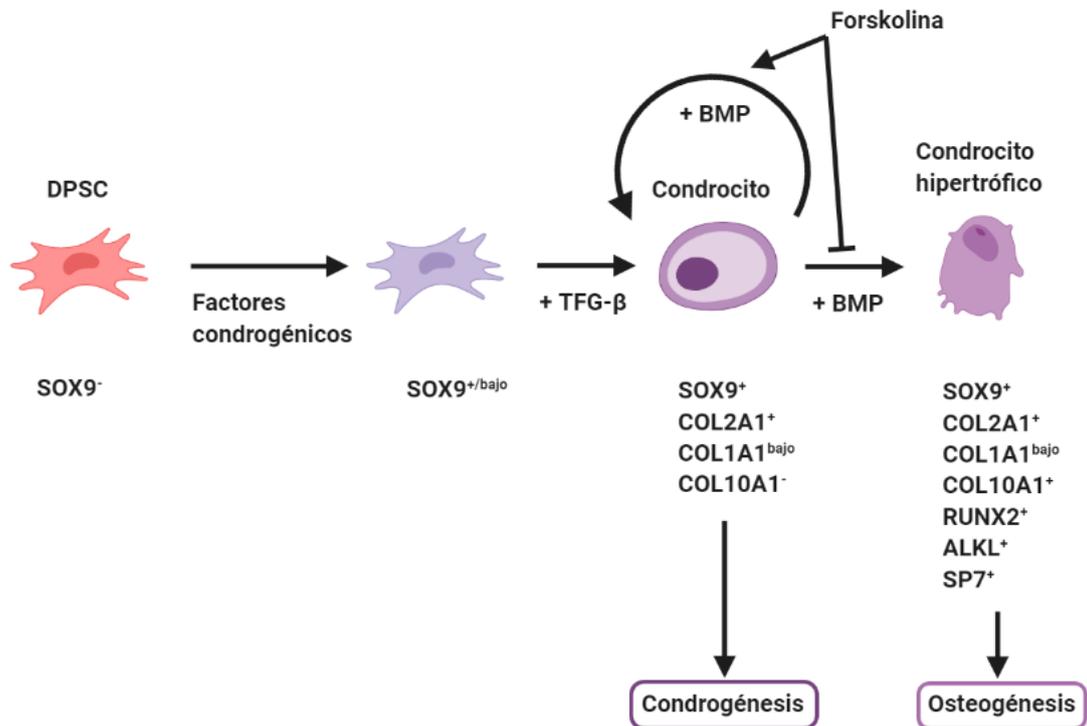


Figura 11. Ruta de la expresión de genes condrogénicos y osteogénicos en células DPSC. Composición propia, inspirada en <sup>56</sup>.

### 3.2. Biomateriales en Ingeniería Tisular

El cartílago no posee una capacidad regenerativa elevada<sup>3</sup> y, a diferencia del hueso, no experimenta una reparación espontánea<sup>67</sup>. Como ya se ha indicado, muchas terapias quirúrgicas se basan en la implantación de una pieza pequeña de este tejido sano en la lesión, promoviendo que las células presentes en este migren hacia el tejido dañado y el conjunto se acabe regenerando. No obstante, estas terapias junto con otras aplicadas actualmente plantean problemas éticos, como por ejemplo la procedencia de los injertos empleados en la cirugía<sup>21</sup>, en primer lugar, y fracasan a corto pero, sobre todo, a largo plazo.

La ingeniería tisular permite, como ya se ha comentado anteriormente, la elaboración de conjuntos formados por células, biomateriales y factores de crecimiento. En el caso de los biomateriales, estos forman la parte estructural de este complejo, es decir, forman una matriz artificial en la que se encuentran

las células a las cuales se les estimulará mediante factores externos. Y es que se ha demostrado que un entorno tridimensional favorece la condrogénesis<sup>68</sup>.

Así pues, los biomateriales empleados para la elaboración de estas matrices pueden ser tanto naturales como sintéticos y también mixtos, y cumplen con una serie de características, como son la biocompatibilidad, la baja citotoxicidad y la estabilidad química. A su vez, deben reunir una serie de propiedades biomecánicas, estructurales y superficiales, dependiendo del tejido en el cual se implantarán, intentando imitar las propiedades de este tejido nativo. Además, deben ofrecer una adecuada morfología que favorezca la interacción entre células y, en caso necesario, deben poder experimentar un proceso de degradación con el tiempo<sup>69</sup>.

Este es el caso de la policaprolactona (PCL), el ácido poliláctico (PLA) y su combinación con el ácido poliglicólico (PGA), la composición química de los cuales permite su moldeado tridimensional, mediante técnicas de polimerización<sup>50,69-74</sup>. Estos materiales permiten crear poros internos en el andamiaje elaborado, futuro nicho de las células. El módulo de compresión, E, de estas estructuras vendrá determinado por su grado de porosidad, siendo la relación inversamente proporcional (a mayor grado de porosidad, menor módulo de compresión)<sup>69</sup>.

Los materiales más empleados para la regeneración condral hoy en día son los hidrogeles, como el alginato y la agarosa<sup>49,75-78</sup>, dado su fácil manipulación y diseño de estructuras tridimensionales, su alta biocompatibilidad y su morfología microestructural similar a la matriz extracelular de este tejido. Los hidrogeles presentan un alto contenido en agua en su estructura, lo cual puede resultar tanto una ventaja como un inconveniente para según qué técnicas empleadas.

Más aún, la ingeniería tisular no se ha quedado solo en el uso de los hidrogeles, sino también ha indagado en su funcionalización<sup>49,79</sup>. Así, estos biomateriales están siendo mejorados hoy en día mediante técnicas mecánicas, como son la compresión axial, y químicas, como el entrecruzamiento mediante diversos compuestos químicos, como por ejemplo el glutaraldehído o el genipín. Además, se han desarrollado otros

procedimientos, como la orientación de las fibras en el hidrogel utilizando campos electromagnéticos juntamente con nanopartículas férricas, las cuales, atraídas por el campo magnético, ejercen tensiones sobre la estructura orientándola internamente a su vez<sup>80</sup>.

### 3.2.1. Hidrogeles

Daly *et al.*<sup>81</sup> resumen los hidrogeles más empleados tanto en investigación básica como en clínica, como se muestra en la tabla 1. Diferencian entre materiales con capacidad condrogénica permisiva, esto es, la que soporta la condrogénesis a partir de un estímulo externo, como son los factores de crecimiento, y la capacidad condro-inductiva, la que promueve directamente la condrogénesis.

<b>Hidrogel</b>	<b>Capacidad condrogénica</b>
<b>Agarosa</b>	Condro-permisivo
<b>Alginato</b>	Condro-permisivo
<b>Alginato sulfatado</b>	Condro-inductor
<b>Alginato / nano-celulosa</b>	Condro-permisivo
<b>GeIMA (gelatín metacrilato)</b>	Condro-permisivo
<b>Ácido hialurónico</b>	Condro-inductor
<b>PEGDMA (poli(etilen-glicol) dimetacrilato)</b>	Condro-permisivo
<b>Colágeno</b>	Condro-permisivo
<b>Fibrina</b>	Condro-permisivo

Tabla 1. Clasificación de Daly *et al.* de los diferentes tipos de hidrogeles junto con su capacidad condrogénica<sup>81</sup>.

## 4. Irradiación electromagnética como terapia

Actualmente, y como referencia, se producen cada semana en los Estados Unidos de Norteamérica decenas de miles de fracturas de miembros del aparato locomotor, suponiendo un coste muy importante a nivel global<sup>82-84</sup>. Aunque se ha avanzado tanto en terapias quirúrgicas como también de inmovilización, el grado de reparación no es aceptable, pudiendo ocasionar además problemas a largo plazo<sup>85-89</sup>. Un claro ejemplo es la reparación del cartílago articular en la que el resultado quirúrgico no provoca la formación de nuevo cartílago hialino, rico en colágeno tipo II y glucosaminoglicanos, sino que induce la síntesis de colágeno tipo I, típico del cartílago fibroso, y tipo X, provocando la hipertrofia de los condrocitos<sup>90</sup>.

Junto a lo anterior, cabe recordar que el tejido cartilaginoso, por su composición, tiene un grado de autorregeneración bajo.

La ingeniería tisular, como ya se ha comentado, consiste en generar sustitutos que provoquen en el organismo una regeneración del tejido nativo. Por eso es importante poder inducir la diferenciación de las MSC hacia un linaje condrogénico que permita la regeneración de cartílago articular, pudiendo lograr la síntesis de matriz condral hialina<sup>91</sup>.

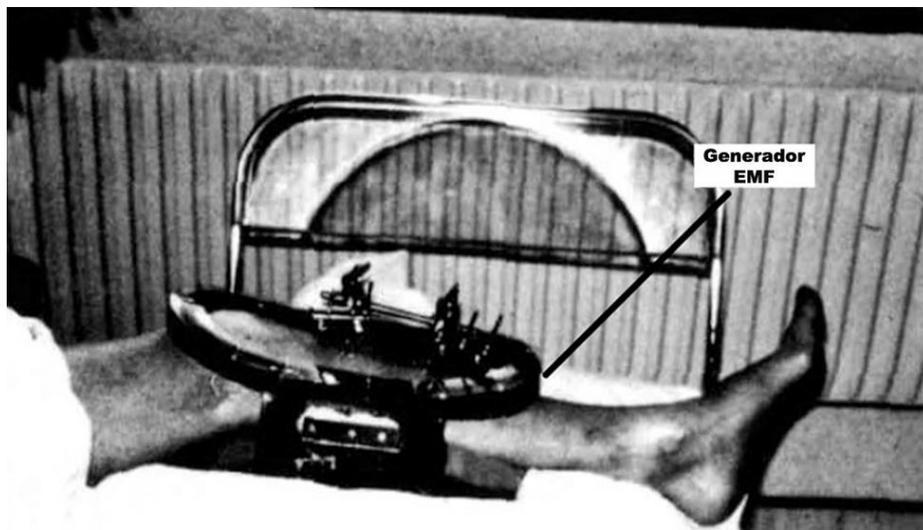
El tercer pilar de la ingeniería tisular (los factores de crecimiento) ayuda a mejorar esta diferenciación. Estos factores de crecimiento pueden ser químicos (como el IGF, FGF, TGF $\beta$ , etc.<sup>92-96</sup>), pero también físicos y ambientales. El uso de los primeros puede lograr una diferenciación de las células madre completa, pero los resultados finales pueden no ser del todo los deseados<sup>97</sup>.

Es por ello que estudios más recientes han empezado a estudiar el efecto de la aplicación de campos electromagnéticos (EMF, por sus siglas en inglés) para favorecer esta diferenciación<sup>51</sup>. Se considera, pues, esta estimulación biofísica como un factor externo aplicado en la ingeniería tisular<sup>45,80,98,99</sup>.

En el caso del cartílago, este tiene propiedades electrofisiológicas gracias a las cargas negativas existentes debido a la presencia de GAG y

proteoglicanos en su matriz, por lo que la aplicación de EMF ha demostrado que promueve la diferenciación y maduración de los condrocitos<sup>100</sup>. Además, los canales transmembrana de estas células también se ven influidos por la aplicación de campos electromagnéticos<sup>101</sup>.

Por lo que respecta a la clínica, la Agencia Europea del Medicamento y la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos han aprobado el uso de EMF para el tratamiento de fracturas óseas<sup>102-106</sup>, ya que se ha observado que promueve la diferenciación de BM-MSK hacia un linaje osteoblástico<sup>107</sup>.



*Figura 12. Fotografía tomada de un generador de fijación externa Hoffmann® de campos electromagnéticos irradiando la tibia fracturada de un paciente. Imagen de <sup>106</sup>.*

El empleo de EMF como tratamiento no solo ha provocado mejoras en el ámbito de la regeneración ósea, sino también en enfermedades musculoesqueléticas como la osteoartritis, y en la regeneración de nervios, entre otras<sup>108-110</sup>.

No obstante, todavía hoy en día no existen suficientes resultados clínicos sobre la efectividad del uso de EMF en la reparación de tejidos. Esto es debido, en gran parte, al bajo número de casos por estudio y a la heterogeneidad de los resultados obtenidos<sup>111</sup>. Además, todavía no existe un consenso que determine los valores de los parámetros relacionados con la aplicación de los campos electromagnéticos sobre los pacientes que permiten

conseguir un resultado óptimo<sup>112-115</sup>. En otras palabras, en la actualidad se escogen al azar las magnitudes de los parámetros del EMF y de la frecuencia, normalmente según las experiencias previas del profesional en fisioterapia o traumatología.

No obstante, se considera que hay 3 parámetros importantes que se deben valorar en la aplicación de EMF: la frecuencia, la intensidad del campo y la duración de la exposición de este<sup>116</sup>.

Con el objetivo de inducir al máximo la condrogénesis y, en definitiva, la regeneración del cartílago articular, se han empleado múltiples valores de frecuencia y magnitudes de campo electromagnético. También se ha variado el tiempo de exposición a estas irradiaciones. Se han utilizado frecuencias en el rango de 30 a 75 Hz y magnitudes de campo de miliTeslas (mT)<sup>117-120</sup>, exponiendo las muestras al EMF durante minutos, hasta conseguir la inducción condrogénica de células mesenquimales.

Un ejemplo es el estudio planteado por Chen *et al.*<sup>121</sup>, en el que intentaron estimular la diferenciación condrogénica de ADSC en forma de agregados celulares y también promover la formación de matriz condral a partir de la aplicación de campos electromagnéticos. Su hipótesis de partida era que el uso de EMF de pulsos únicos (*Single-Pulse* EMF o SPEMF) mejoraría los resultados respecto a los PEMF (EMF de múltiples pulsos seguidos) empleados habitualmente.

Para ello, generaron 21 pulsos en 5 ms repetidos en 15 Hz con una magnitud de campo electromagnético de 2 mT, como PEMF, y 1 pulso de 1 T de 5 s de duración, repetido 30 veces al día, para los SPEMF. El primer estudio duró 8 h diarias, mientras que el segundo solo 3 min. El tratamiento aplicado se realizó durante 7 días.

Una vez aplicados los tratamientos de estimulación por EMF, se analizó mediante biología molecular la expresión de diferentes genes relacionados con la condrogénesis. Así pues, al primer día de tratamiento se observó un aumento de la expresión de SOX9 en las muestras estimuladas con PEMF y SPEMF. A los 3 días, este aumento fue mayor para los 2 grupos celulares. Entre el tercer y el quinto día los tratamientos mostraron un incremento

considerable de COL2A1 y ACAN. Finalmente, por lo que respecta a la expresión de COL1A1, este tuvo un aumento importante al término de los 7 días de tratamiento en las muestras irradiadas con PEMF, mientras que en las muestras estimuladas con SPEMF se observó una disminución, en todos los casos con respecto al control interno del estudio.

A modo de conclusión, Chen *et al.* demostraron que la aplicación de campos electromagnéticos, ya sean de múltiples o únicos pulsos, favorece la diferenciación condrogénica de ADSC y, en general, de células mesenquimales. Sin embargo, el pulso único incrementa levemente esta diferenciación respecto a la técnica con pulsos múltiples, mientras que reduce la expresión del gen COL1A1, típico de cartílagos fibrosos.

Finalmente, cabe destacar también la investigación realizada por Li *et al.*<sup>122</sup>, en la que se observó una gran mejora en pacientes con enfermedades osteoporóticas cuando se les aplicaba una terapia con campo electromagnético sumado a la realización de una actividad física. Y es que, en numerosos casos, en los que el paciente era activo físicamente, la regeneración de la lesión en cartílago era más rápida y con resultados mejores y óptimos comparados con pacientes con vidas sedentarias.

En el futuro inmediato las investigaciones deben centrarse en el uso de líneas celulares y cultivos primarios autólogos o de donantes en la elaboración de tejidos artificiales, intentando alcanzar una efectividad elevada. Además, el sostén de estas células debe ser posible mediante el uso de materiales naturales, biocompatibles y biodegradable, en los casos en los que así fuere idóneo. Finalmente, la presencia de diferentes sustancias o factores estimulantes químicos o físicos debe ir determinada según el objetivo a alcanzar.

Y es que la aplicación de la ingeniería tisular sobre pacientes resultará finalmente satisfactoria solo si los estudios previos realizados han sido exhaustivos y correctos.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1. Hipótesis

La baja regeneración del cartílago ha provocado el desarrollo de numerosas terapias con resultados poco satisfactorios. Desde hace muchos años, la ingeniería tisular ha desarrollado diferentes procedimientos *in vitro* para la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales. Debido a los resultados óptimos obtenidos, estos dispositivos o constructos desarrollados han acabado implantándose en pacientes con lesiones condrales u osteocondrales, pero con fracasos a medio y largo plazo en muchos de los casos. Es por ello, que en esta Tesis Doctoral se han estudiado diferentes mecanismos para conseguir la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales de pulpa dental humana, promoviendo la síntesis de proteínas características de la matriz extracelular cartilaginosa hialina.

Por un lado, los hidrogeles han sido ampliamente utilizados como soporte para el cultivo de células, con su posterior implantación en animales, obteniendo resultados medianamente óptimos. Sin embargo, se ha observado que el contacto entre células promueve la diferenciación de células pluripotentes (MSC) hacia una estirpe condral. Por ello, se plantea la generación de organoides celulares o microtejidos, cultivados en diferentes medios de cultivo, con tal de observar diferencias en el aspecto morfológico y en la síntesis de macromoléculas características de la matriz extracelular condral.

Por otro lado, cada vez es más frecuente el uso de campos electromagnéticos (EMF) en clínica, donde se observan buenos resultados a corto plazo en pacientes con lesiones condrales. Así pues, se propone la estimulación electromagnética de microtejidos celulares con tal de estudiar la afectación en la diferenciación condrogénica. Además, se añadirá una estimulación mecánica de estos microtejidos, ya que se ha demostrado que pacientes con lesiones en el cartílago articular obtienen mayores mejoras si realizan movimientos articulares suaves diariamente, como por ejemplo andar.

## 2. Objetivo principal

Esta Tesis Doctoral trata de evaluar la síntesis de macromoléculas presentes en la matriz extracelular condral en microtejidos elaborados con células madre mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC). Estos microtejidos han sido estimulados con diferentes medios y expuestos a campos electromagnéticos, donde se ha estudiado la afectación de la estimulación mecánica sobre ellos.

## 3. Objetivos específicos

1. Determinación del tipo celular óptimo para los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral.
2. Elaboración de hidrogeles de alginato y agarosa, y cultivo de hDPSC en ellos durante diferentes tiempos y medios de cultivo. Evaluación histológica de la presencia o ausencia de proteínas características de la matriz extracelular condral mediante inmunofluorescencia.
3. Elaboración de microtejidos de hDPSC y cultivo durante diferentes tiempos y medios de cultivo. Evaluación histológica de la morfología celular de los microtejidos, y de la presencia o ausencia de proteínas características de la matriz extracelular condral mediante inmunofluorescencia.
4. Determinación de los tiempos de estimulación electromagnética de microtejidos de hDPSC mediante la evolución génica de diferentes marcadores condrales. Elaboración de partículas magnéticas, las cuales se emplearán en la estimulación electromagneto-mecánica de los microtejidos. Determinación de la densidad de partículas por microtejido para una óptima estimulación mecánica.

5. Estimulación de microtejidos de hDPSC mediante campos electromagnéticos y fuerzas mecánicas. Evaluación por biología molecular de diferentes marcadores condrogénicos y otros de especial interés.
  
6. Estimulación de microtejidos de hDPSC mediante fuerzas electromagneto-mecánicas y posterior cultivo celular durante diferentes tiempos. Evaluación histológica de la morfología celular de los microtejidos, y de la presencia o ausencia de proteínas características de la matriz extracelular condral mediante inmunofluorescencia.

# MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo de Tesis Doctoral se llevaron a cabo 3 bloques de tareas diferenciados, siendo los dos primeros complementarios entre sí. Más aún, estos dos primeros bloques se realizaron paralelamente, determinando qué procedimiento llevar a cabo a lo largo del tercer bloque.

La primera parte o bloque del trabajo consistió en elaborar estructuras tridimensionales en las que sembrar células madre mesenquimales y cultivarlas durante diferentes periodos de tiempo y con diferentes medios de cultivo; en definitiva, se pretendió estudiar la diferenciación condrogénica de estas células mesenquimales. Cabe adelantar que finalmente se optó por una estructura en forma de hidrogel, compuesta por alginato y agarosa.

Por lo que respecta al segundo bloque, y de manera paralela al anterior, se elaboraron microtejidos de estas células madre mesenquimales y se cultivaron durante los mismos tiempos y medios de cultivo que en el caso anterior. Ello permitió analizar las diferencias en la posible diferenciación condrogénica de estas células con respecto al cultivo en hidrogel, comparando ambos resultados.

Para caracterizar las células y microtejidos obtenidos en los puntos anteriores, las muestras se analizaron mediante técnicas histomorfológicas y por inmunofluorescencia, comparando los resultados obtenidos entre sí.

Finalmente, se optó por emplear el procedimiento con microtejidos para llevar a cabo la tercera parte del trabajo.

Este último bloque fue el más extenso, siendo además la aportación más innovadora de este trabajo. Esta tarea experimental se dividió en dos partes, consistiendo la primera en exponer a campos electromagnéticos los microtejidos elaborados, con tal de estimularlos y estudiar su posible influencia en la diferenciación condrogénica. Además, no solo se estimuló electromagnéticamente, sino que, siguiendo el principio de mejora fisiológica de lesiones en cartílago articular, las células también se estimularon electromagneto-mecánicamente, siendo esta la segunda parte de esta tarea. Esto último fue posible incorporando partículas magnéticas en los microtejidos

elaborados, las cuales produjeron presiones sobre estos al verse sometidas al campo electromagnético; estas presiones simulaban aquellas que recibe el cartílago articular durante la marcha en condiciones fisiológicas.

Así pues, en primer lugar se desarrolló, en colaboración con el instituto aragonés de investigación en ingeniería (I3A) de la Universidad de Zaragoza, un sistema generador de campos electromagnéticos el cual generaba pulsos únicos en una misma dirección pero en sentidos opuestos alternantes. Paralelamente se elaboraron las partículas magnéticas que se utilizaron en los estudios posteriores. El siguiente paso fue determinar los tiempos e intervalos de exposición electromagnética y, finalmente, se diseñó el programa informático que controló el sistema electromagnético.

Una vez realizados todos los estudios de exposición electromagnética, se caracterizó la expresión génica de las células de los microtejidos, analizando los posibles cambios a lo largo del tiempo cómo les afectaba la estimulación electromagneto-mecánica en comparación a aquellas muestras en la que solo se aplicaron campos electromagnéticos. Con el fin de verificar los resultados obtenidos mediante las técnicas de biología molecular, también se realizó la caracterización de las muestras mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

## 1. Cultivos celulares

### 1.1. Origen de las células usadas

Uno de los pilares fundamentales de esta Tesis Doctoral fue el uso de células madre mesenquimales humanas. Con el fin de homogeneizar los resultados las células empleadas se obtuvieron de la casa comercial distribuidora LONZA (EE.UU.).

Estas líneas celulares se recibieron junto con sus certificados de identificación y de análisis realizados por dicha casa comercial; estos certificados se adjuntan en los Anexos. En estos certificados se exponían los resultados obtenidos al aplicarles diferentes pruebas, como fueron pruebas microbiológicas (micoplasma y esterilidad), virológicas (VIH, VBH y VCH) y de actuación celular (viabilidad, eficiencia de la siembra y proteínas o marcadores de membrana celular característicos de cada tipo de célula). Además, en cada certificado se especifica las características de la persona donante, junto con un número de adquisición tisular.

### 1.2. Medios de cultivo

#### 1.2.1. Proliferación de células mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC)

Las células se recibieron criopreservadas en fase 1, a una densidad de  $0,75 \times 10^6$  células/mL. Eran células (fase 1) obtenidas de la pulpa dental de un varón de 16 años, criopreservadas el 21/03/2013. Estas células mesenquimales se cultivaron (fase 2) en un medio de cultivo de proliferación, medio esencial mínimo alfa ( $\alpha$ -MEM, por sus siglas en inglés) (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1 % de L-glutamina (Gibco) y 1 % de la mezcla de antibióticos penicilina-estreptomina (Gibco)<sup>123</sup>. Se permitió que las células proliferaran activamente durante 7-10 días, hasta cubrir el 80-90 % de la superficie del frasco (80-90 % del estado de confluencia del cultivo), cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

### 1.2.2. Proliferación de células mesenquimales de tejido adiposo humano (hADSC)

Las células se recibieron crioconservadas en pase 1, a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL. Eran células (pase 1) obtenidas de tejido adiposo de varón de 55 años, crioconservadas el 20/04/2016. Estas células mesenquimales se cultivaron (pase 2) en el mismo medio de cultivo de proliferación que el empleado con las células madre pulpares (ver apartado anterior). Al igual que en el caso anterior, se permitió que las células proliferaran activamente durante 7-10 días, hasta cubrir el 80-90 % de la superficie del frasco, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

### 1.2.3. Medio de diferenciación condrogénica

El medio de diferenciación condrogénica empleado fue el suministrado por Lonza, la empresa distribuidora de las células.

Este medio estaba compuesto por medio basal de diferenciación (CDM), suplementado con 5 % de FBS, 0,2 % de insulina, 0,2 % de factor de crecimiento insulínico de tipo 1 recombinante ( $R^3$ -IGF-1), 0,5 % de factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), 0,2 % de transferrina, 0,2 % gentamicina/B-anfotericina y ácido ascórbico a una concentración de 70 mM.

### 1.3. Descongelación, expansión, recuento celular y criopreservación

Uno de los primeros aspectos a tener en cuenta a la hora de trabajar con cultivos celulares es disponer de reservas suficientes de los mismos para todo el trabajo. Fue por ello por lo que se hicieron proliferar las células durante 2 a 3 pases celulares como máximo y, en cada uno de estos, las células se crioconservaron, para mantenerlas viables para sucesivos estudios, como se detalla a continuación.

En los siguientes puntos se detalla cómo se procedió con las muestras celulares recibidas de la casa comercial.

Las células se recibieron criocongeladas en viales. Se descongelaron las células rápidamente, sumergiendo los crioviales en un baño de agua a 37 °C. Una vez descongeladas, se resuspendieron en medio de cultivo y se centrifugaron a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente. Esto permite eliminar restos de los componentes crioconservantes utilizados. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió nuevamente en medio de proliferación. A continuación, las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Las células se dejaron proliferar durante 7-10 días hasta cubrir el 80-90 % de la superficie del frasco, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días. El crecimiento y el aspecto de las células se controló visualmente empleando un microscopio de contraste de fases.

Para la crioconservación de las células se siguió el protocolo de criopreservación recomendado por la empresa distribuidora. Las células se despegaron de los frascos de cultivo mediante tratamiento con 1 mL de tripsina-EDTA (Gibco, EE.UU.) por cada 25 cm<sup>2</sup> de superficie de cultivo durante 5 min en el incubador a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras ello, se procedió al recuento celular con un hemocitómetro EVE Automatic Cell Counter (NanoEnTek Inc, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Considerando el valor de densidad celular obtenido, se separó la cantidad de células deseada y se centrifugó a 210 g durante 5 min a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante. Finalmente, el sedimento celular obtenido se resuspendió en suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés) (Gibco) el cual contenía un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

Se realizaron alícuotas de 1 mL, conteniendo 10<sup>6</sup> células (*hDPSC*, en pase 2, y *hADSC*, en pase 2), que se transfirieron a viales de crioconservación. Estos criotubos se introdujeron en un recipiente conteniendo isopropanol (Sigma-Aldrich) que se situó en un congelador de -80 °C, lo cual permitió una disminución gradual y controlada de la temperatura hasta llegar a los -80 °C. Finalmente, las células se situaron en la fase vapor de un tanque conteniendo nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su utilización.

#### 1.4. Estudio de la actividad proliferativa celular

En estudios en los que se van a mantener células en cultivo durante periodos de tiempo relativamente largos es de vital importancia llevar a cabo un estudio de la actividad proliferativa de las células. Esto significa conocer la capacidad de duplicación de las células a emplear a lo largo del tiempo, según el pase en el que se encuentren. Con ello, se puede determinar la densidad de siembra celular por superficie según el tipo celular y también según el tiempo de cultivo, para que el estudio resulte efectivo y las células no lleguen a confluencia (cubriendo el 100 % de la superficie de cultivo), factor que en muchos casos provoca la inactividad proliferativa o también la muerte celular.

Así pues, se sembraron los 2 tipos celulares empleados en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, en el medio de proliferación detallado anteriormente. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Cuando las células llegaron a un nivel del 90 % del estado de confluencia se despegaron de la superficie de cultivo utilizando Tripsina-EDTA, siguiendo los pasos anteriormente descritos, y se realizó un recuento celular mediante el hemocitómetro automático. Se obtuvieron los valores de células vivas por mL, con su correspondiente porcentaje de viabilidad respecto del total de células detectadas, para cada muestra.

Este proceso se repitió en diferentes pases celulares, con el fin de estudiar la capacidad proliferativa tanto de las células madre de pulpa dental como de las células madre procedentes de tejido adiposo.

Una vez finalizado este estudio de viabilidad se analizaron los resultados obtenidos y se decidió el empleo de células madre de pulpa dental para todo este trabajo de Tesis Doctoral.

## 2. Hidrogeles

El segundo pilar fundamental de este trabajo fue recrear un entorno tridimensional para las células, semejante y con propiedades físicas y mecánicas parecidas al cartílago hialino. Se optó por el uso de hidrogeles, dada su versatilidad y propiedades viscoelásticas que los hacen ser similares al cartílago mencionado.

Se elaboraron hidrogeles de alginato y agarosa, sustancias que se complementan para dar lugar a un hidrogel consistente, viscoelástico y biodegradable, perfecto para convertirse en el nicho de las células.

El alginato, o ácido algínico, es un polisacárido aniónico, que se encuentra presente en las paredes celulares de las algas marinas pardas pertenecientes a la clase filogénica *Phaeophyceae*. Este ácido débil es soluble en agua alcalinizada, pudiendo absorber hasta 20 veces su peso en agua, dando lugar a un material altamente hidratado y gelatinoso.

Por lo que respecta a la agarosa, esta es un polisacárido formado por alfa y beta galactosas. Esta sustancia se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracellaria*. Es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °C, y gelifica cuando alcanza valores de 17 a 40 °C, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales. La agarosa es un producto natural que permite formar matrices consistentes e inertes, biodegradables y no tóxicas, suponiendo una herramienta muy importante en técnicas relacionadas con la biología molecular y celular y la bioquímica.

Así pues, la combinación de ambos componentes permitió obtener un hidrogel viscoelástico altamente hidratado y de notable consistencia.

### 2.1. Elaboración de hidrogeles de alginato-agarosa

Parte de los trabajos de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo empleando hidrogeles de alginato al 3 % con agarosa al 1 %, en los que se embebieron células madre de pulpa dental. La agarosa le confiere mayor consistencia al constructo polisacárido de alginato.

Las disoluciones madre de ambos componentes se elaboraron al doble de la concentración final deseada. De esta manera, para elaborar el hidrogel se mezclaron partes iguales de ambos elementos, haciendo que la concentración final tanto de alginato como de agarosa se redujera a la mitad; se obtuvo un hidrogel al 3 % de alginato y al 1 % de agarosa.

Así pues, el primer paso consistió en preparar la solución de alginato al 6 % de ácido algínico sódico procedente de alga parda (Sigma-Aldrich) en una disolución tamponada de HEPES 40 mM (Sigma-Aldrich) y NaCl (Sigma-Aldrich) 300 mM, a pH 7,4. En primer lugar se disolvieron HEPES y NaCl en agua desionizada estéril para cultivo. Tras calentar la mezcla a 60 °C, se añadió la sal de alginato, manteniendo la disolución en constante agitación. Una vez la solución estuvo homogéneamente disuelta y a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 7,4 mediante la adición de HCl y NaOH. Finalmente, la disolución se autoclavó con el fin de esterilizarla.

La solución de polimerización del alginato se preparó con CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) 102 mM y HEPES 10 mM en agua desionizada estéril para cultivos, agitando hasta su total disolución y ajustando el pH a 7,4. La disolución se pasó por un filtro estéril de 0,22 µm de tamaño de poro para su esterilización.

Por lo que respecta a la disolución de agarosa, se disolvió 2 % de agarosa tipo IX-A de temperatura de gelificación *ultra-low* (Sigma-Aldrich) en PBS (sin calcio ni magnesio). La mezcla se realizó bajo condiciones de esterilidad y no se autoclavó debido a que las altas temperaturas pueden alterar la composición química de la agarosa.

## 2.2. Estudio de la citotoxicidad de los hidrogeles y de la solución de CaCl<sub>2</sub>

### 2.2.1. Condicionamiento de los medios y preparación de la placa de ensayo

El uso de biomateriales en ingeniería tisular ha tenido un auge muy importante en los últimos tiempos. Estos materiales, que pueden ser tanto naturales como sintéticos o mixtos, deben cumplir una serie de requisitos ya comentados anteriormente, siendo fundamental confirmar la ausencia de citotoxicidad. Es

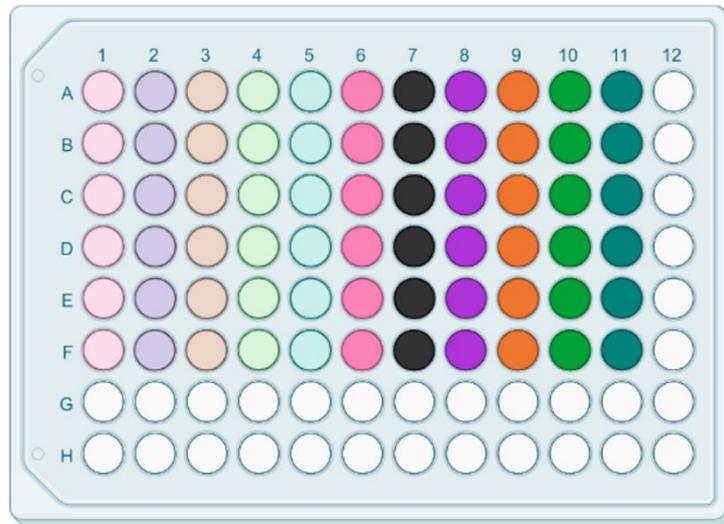
por lo anterior que cualquier biomaterial empleado en el ámbito biológico debe ser analizado con anterioridad a su uso *in vitro*.

Por tanto, se realizó el análisis de la citotoxicidad de los hidrogeles empleados en este trabajo sobre células mesenquimales de pulpa dental humana. Para ello se condicionó medio de proliferación (que en este caso no contenía rojo fenol para evitar la interferencia de este colorante en ensayos posteriores) con los diferentes hidrogeles utilizados: alginato al 3 %, agarosa al 1 %, agarosa al 1 % + 10 % del agente polimerizador  $\text{CaCl}_2$  (necesario para polimerizar el alginato) y, finalmente, su combinación de alginato 3 % y agarosa 1 %. Cabe decir que tanto el alginato como la agarosa, preparados según se ha descrito en el punto anterior, se diluyeron a la mitad de su concentración empleando sus respectivos solventes (agua y PBS, respectivamente) con tal de conseguir alginato al 3 % y agarosa al 1 %.

Este condicionamiento se realizó manteniendo dichos hidrogeles en el medio de cultivo, a una relación en volumen hidrogel-medio a condicionar de 1:2. El condicionamiento de los medios se llevó a cabo durante 24 h, 72 h y 7 días, a 37 °C y en una atmósfera conteniendo un 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Una vez condicionados los diferentes medios, se prepararon las placas de cultivo. Para ello, se emplearon placas de 96 pocillos, en las que se sembraron las células pulpares a una densidad de  $10^4$  células/pocillo en su medio de cultivo. A las 24 h de la siembra, el medio de cultivo se sustituyó por los diferentes medios condicionados, junto con los medios control. Se sembraron 6 pocillos por cada condición diferente, dejando sin células aquellos que se destinarían a los controles de los medios control y condicionados (figura 13).

El experimento se repitió dos veces más, obteniendo una  $n = 3$  de valores de todas las condiciones estudiadas.



*Figura 13. Distribución de los medios condicionados con los hidrogeles y los medios control en la placa de cultivo de 96 pocillos. Columna 1: medio de cultivo control; 2: medio condicionado con alginato 3 %-agarosa 1 %; 3: medio condicionado con alginato 3 %; 4: medio condicionado con agarosa 1 %; 5: medio condicionado con agarosa 1 % + CaCl<sub>2</sub> 10 %; 6: células + medio de cultivo control (control negativo de toxicidad); 7: células + medio condicionado con látex durante 24 h (control positivo de toxicidad); 8: células + medio condicionado con alginato 3 %-agarosa 1 %; 9: células + medio condicionado con alginato 3 %; 10: células + medio condicionado con agarosa 1 %, y 11: células + medio condicionado con agarosa 1 % + CaCl<sub>2</sub> 10 %.*

### 2.2.2. Elaboración de las diluciones de CaCl<sub>2</sub> y preparación de la placa

A partir del ensayo anterior se observó que las células en contacto con los medios condicionados con hidrogeles con CaCl<sub>2</sub> mostraban una viabilidad menor respecto aquellos medios que no estuvieron en contacto con esta sal. Así que se decidió analizar la citotoxicidad de esta solución de CaCl<sub>2</sub>. Para ello, se realizó un ensayo de diferentes diluciones de esta sal sobre las células pulpaes.

En primer lugar, se elaboraron las diferentes diluciones de CaCl<sub>2</sub>: 10, 5, 2,50, 1,25 y 0,63 % en medio de cultivo de proliferación sin rojo fenol. Cabe destacar que en este ensayo no se condicionaron medios con el soluto, sino que las diluciones de esta sal en medio de cultivo se pusieron en contacto directo con las células en los pocillos de la placa de cultivos.

A continuación, se preparó la placa de 96 pocillos siguiendo la metodología del punto anterior. Se sembraron las células pulpaes a una densidad de 10<sup>4</sup> células/pocillo en su medio de cultivo. A las 24 h de la siembra

el medio de cultivo se sustituyó por las diferentes diluciones de  $\text{CaCl}_2$ , y en el caso de los controles, por los medios control sin rojo fenol, siguiendo la figura 14.

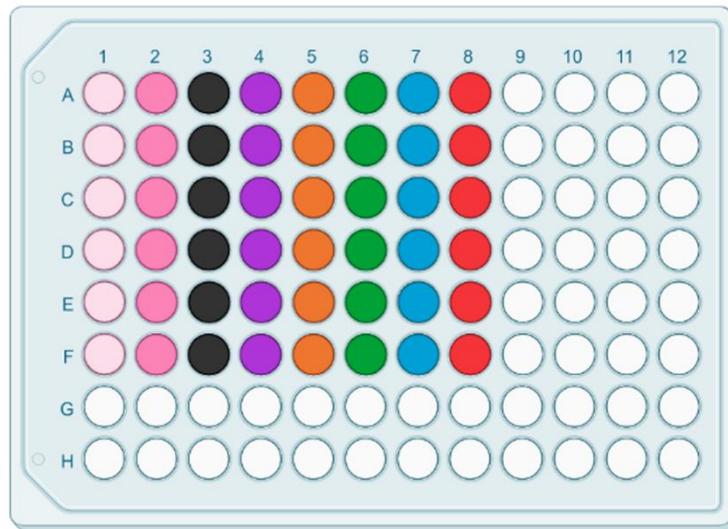


Figura 14. Distribución de las diluciones de  $\text{CaCl}_2$  y los controles en la placa de cultivo de 96 pocillos. Columna 1: medio de cultivo control; 2: células + medio de cultivo control (control negativo de toxicidad); 3: células + medio condicionado con látex durante 24 h (control positivo de toxicidad); 4: dilución de  $\text{CaCl}_2$  al 10 %; 5: dilución de  $\text{CaCl}_2$  al 5 %; 6: dilución de  $\text{CaCl}_2$  al 2,5 %; 7: dilución de  $\text{CaCl}_2$  al 1,25 %, y 8: dilución de  $\text{CaCl}_2$  al 0,63 %.

### 2.2.3. Ensayo de citotoxicidad

En ambos casos anteriores, y 24 h después de añadir a las células los medios condicionados, se añadió 20  $\mu\text{L}$ /pocillo del reactivo de MTS (*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*; Promega, España), dejándose incubar durante 2 h a 37 °C. Tras esta incubación se realizó una lectura de la absorbancia a 490 nm (longitud de onda a la que absorbe el producto generado) en un espectrofotómetro lector de placas (*Victor X3, 2030 Multilabel Reader*; Pekin Elmer, Alemania).

Los datos se analizaron mediante Microsoft Excel y se representaron gráficamente con GraphPad Prism, realizándose un análisis de la normalidad con el test de Tuckey de los datos obtenidos y, posteriormente, un estudio estadístico mediante *one-way ANOVA* (significancia estadística con  $p \leq 0,05$ ).

### 2.3. Cultivo en hidrogeles de alginato-agarosa

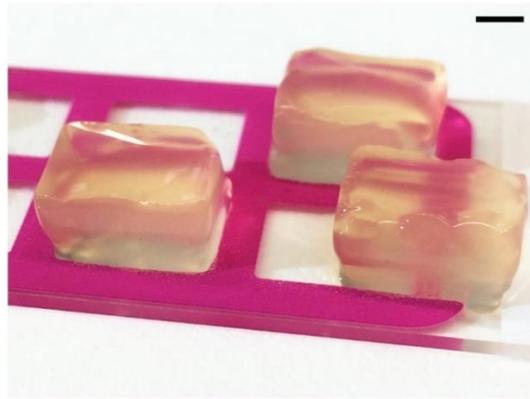
Las células pulpares necesarias, obtenidas tras centrifugación y tras eliminar el sobrenadante, se mezclaron homogéneamente con la cantidad necesaria de alginato al 6 %. Dado que se realizará una dilución de alginato y agarosa de 1:1, el alginato empleado fue la mitad del volumen total del hidrogel a fabricar. Esta solución de alginato y células se mantuvo a 37 °C hasta su uso.

A continuación, se calentó en microondas la solución de agarosa al 2 % hasta fusión, teniendo cuidado en que no se generasen burbujas. Se alicuotó el volumen necesario de esta solución en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (la mitad del volumen total del hidrogel a elaborar, precalentados a 39 °C para evitar la gelificación de la agarosa.

Se introdujo la mezcla de alginato y células en los tubos de microcentrífuga con la agarosa, a una relación 1:1 en volumen de cada componente, y se homogeneizó suavemente. De esta forma se obtuvo una solución de células en alginato al 3 % y agarosa al 1 %, concentraciones finales.

Finalmente, se precalentó la solución de  $\text{CaCl}_2$  a 37 °C y se introdujo esta disolución en el fondo de los pocillos donde se introducirán las muestras, de tal modo que el volumen añadido fuera el 10 % del volumen final del constructo que se iba a generar. Por último, se introdujo la mezcla de alginato, células y agarosa, homogeneizando la mezcla muy suavemente con la disolución de calcio polimerizadora.

Las muestras se mantuvieron durante 15 min a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar, y posteriormente otros 30 min a 4 °C. Esto permitió la polimerización completa del alginato y de la agarosa (figura 15), lo que facilita depositar el medio de cultivo, como nutriente de las células, encima del hidrogel.



*Figura 15. Células pulpares embebidas en hidrogeles de alginato 3 % y agarosa 1 %. Construcción del hidrogel en pocillos MilliCell EZ slides de 8 pocillos (Merck Millipore, EE.UU.) a modo de ejemplo. Barra de escala = 3 mm.*

### 2.3.1. Estudio del comportamiento de hDPSC en hidrogeles de alginato 3 %-agarosa 1 %

El primer bloque del trabajo de esta Tesis Doctoral fue estudiar el comportamiento de células madre de pulpa dental embebidas en el hidrogel elaborado mediante alginato al 3 % y agarosa al 1 %. El objetivo de este estudio fue analizar la síntesis por estas células de proteínas y proteoglicanos característicos de la matriz condral, a lo largo de diferentes tiempos y empleando diferentes medios de cultivo.

Así pues, una vez embebidas las células en los hidrogeles, y polimerizado el hidrogel, se añadió medio de cultivo sobre las muestras. En la mitad de las muestras, el medio de cultivo fue su medio característico de proliferación celular, mientras que en las otras muestras se añadió medio de diferenciación condrogénica, descrito anteriormente. Se realizaron 3 experimentos diferentes, con 4 muestras cada uno de ellos en las diferentes condiciones establecidas.

Los cultivos tuvieron una duración de 3 días y 2, 4 y 6 semanas, cambiándose los medios de cultivo cada 2-3 días. Al término de cada tiempo, las muestras se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído tamponado, siguiendo el protocolo descrito en un punto posterior. Además, también se fijaron, tomándose como control, muestras a tiempo inicial, una vez el estudio empezó, a las que no se había añadido medio de cultivo.

### 3. Cultivos de microtejidos celulares

Varios estudios anteriores<sup>124-126</sup> determinaron que en una suspensión de células estas tienden a juntarse y generar uniones entre ellas, formando agrupaciones tridimensionales esféricas, llamadas microtejidos u organoides celulares.

La formación del microtejido requiere de un recipiente de base cóncava sobre el que las células no deben adherirse. Así pues, se elaboraron pocillos de 4 mm de diámetro y 5 mm de profundidad en bloques de agarosa tipo IX-A al 3 %, siguiendo el protocolo establecido por Durand-Herrera *et al.*<sup>125</sup>. Para ello, se disolvió agarosa al 3 % en PBS y se homogeneizó atemperando la mezcla a 60 °C. Tras ello se vertió en pocillos de una placa de cultivos de 6 pocillos y se dejó solidificar a 4 °C durante 48 h (figura 16A). Pasado este tiempo, se realizó una cavidad de las dimensiones especificadas anteriormente con la ayuda de una cucharilla. Todo el proceso se realizó en condiciones estériles.

Para la elaboración de los microtejidos, se separaron las células madre de pulpa dental de la superficie de cultivo siguiendo los pasos descritos en un apartado anterior mediante Tripsina-EDTA. Se resuspendieron  $0,6 \times 10^6$  células en 10  $\mu$ L de medio de proliferación celular, y la suspensión se introdujo en uno de los pocillos de agarosa. Se dejaron sedimentar las células sobre el fondo del pocillo (figura 16B), manteniéndolas dentro del incubador celular. Pasadas 2 h se añadió sobre ellas más medio de proliferación, hasta cubrir el bloque de agarosa por completo. El medio de cultivo se sustituyó cada 2-3 días.

A las 24 h ya se distinguía el microtejido (figura 16C) y una vez transcurridas 72 h, el microtejido se había formado completamente (figura 16D). Este último tiempo (72 h) se consideró como tiempo cero o inicial para posteriores estudios.

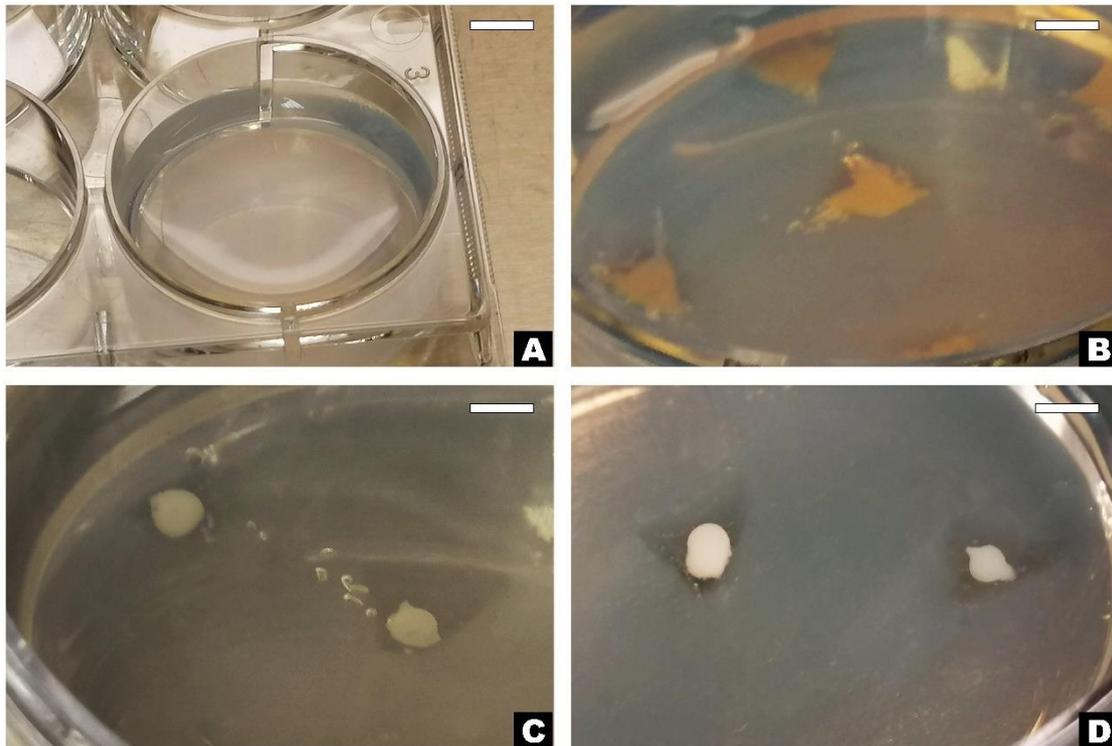


Figura 16. Proceso de elaboración de microtejidos de hDPSC en pocillos de agarosa 3 % *in vitro*. A: hidrogel de agarosa al 3 % pasadas 48 h a 4 °C; B: siembra de las células en los pocillos realizados en el hidrogel; C: formación de los microtejidos pasadas 24 h desde la siembra, y D: microtejido completamente formado pasadas 72 h desde la siembra. Barras de escala = A: 12 mm, y B-D: 3 mm.

### 3.1. Estudio del comportamiento de hDPSC en forma de microtejidos

El segundo bloque del trabajo de esta Tesis Doctoral fue estudiar el comportamiento de células madre de pulpa dental cultivadas en forma de microtejido. El objetivo de este estudio fue analizar la síntesis de proteínas y proteoglicanos característicos de la matriz condral en estas células a lo largo de diferentes tiempos y diferentes medios de cultivo.

Así pues, una vez formados los microtejidos, se añadió medio de cultivo. En la mitad de las muestras, el medio de cultivo fue su medio característico de proliferación celular, mientras que en las otras muestras se añadió medio de diferenciación condrogénica. Se realizaron 3 muestras de cada una de las diferentes condiciones establecidas.

Los cultivos tuvieron una duración de 3 días y 2, 4 y 6 semanas, cambiándose los medios de cultivo cada 2-3 días. Al término de cada tiempo, las muestras se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído, siguiendo el protocolo descrito en un punto posterior. Además, también se fijaron unas muestras a tiempo inicial, una vez el estudio empezó y todavía sin medio de cultivo, tomándose como control.

## 4. Técnica histológica

### 4.1. Fijación

Una vez los estudios celulares terminaron se realizó la caracterización de las muestras tanto por técnicas histomorfológicas como mediante biología molecular.

Por lo que respecta a la caracterización morfológica, es necesario fijar previamente el material biológico empleando formaldehído como agente fijador. Por tanto, tanto para el visionado mediante microscopía óptica de muestras sin teñir como en los casos de tinciones histoquímicas y de inmunofluorescencia la fijación se realizó mediante formaldehído.

Así pues, tras acabar el tiempo experimental de cada estudio celular, los recipientes en que se encontraban las muestras se situaron sobre hielo. Se retiró el medio de cultivo de las muestras y las células se lavaron tres veces con PBS preenfriado a 4 °C. Inmediatamente después, se añadió sobre las muestras formaldehído al 3,7 % en PBS, preenfriado a 4 °C, cubriéndolas completamente, y se mantuvieron en hielo durante 20 min (células en monocapa o en forma de microtejido) o 45 min (muestras de células en hidrogeles). Una vez pasado este tiempo, se retiró el formaldehído, se lavaron las muestras con PBS tres veces, durando cada lavado 5 min. Finalmente, las muestras se conservaron en PBS a 4 °C hasta su posterior procesado, tinción o visionado con el microscopio.

En el caso de las muestras en forma hidrogel, se procesaron directamente para realizar la caracterización mediante inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo que se describe más adelante.

En el caso de muestras de microtejidos, estas pueden ser incluidas en diferentes tipos de parafina para posteriormente obtener cortes de pocas micras de espesor y realizar las tinciones o marcajes con los anticuerpos que correspondan. Esta técnica de inclusión de muestras en parafina es un procedimiento estándar de la histología.

#### 4.2. Inclusión

Tejidos o muestras con una cierta consistencia estructural permiten ser cortados en secciones muy finas que facilitan el que sean teñidas y observadas al microscopio óptico gracias a la luz que permiten transmitir. Estas muestras también pueden ser inmunomarcadas para estudiar la presencia o ausencia de determinadas sustancias como, por ejemplo, proteínas de la MEC.

El principio de esta técnica es la sustitución progresiva del agua presente en la muestra por parafina, en nuestro caso Paraplast Plus (Sigma-Aldrich). Sin embargo, la parafina (compuesta por alcanos) no es miscible en agua, por lo que se requieren una serie de pasos intermedios. Así pues, el agua es miscible en etanol, mientras que la parafina lo es en xilol; a su vez, etanol y xilol se pueden mezclar perfectamente. Por lo tanto, el proceso es el siguiente: agua → etanol → xilol → parafina. En la tabla 2 se muestra el protocolo de inclusión automática en parafina de los microtejidos elaborados en el presente trabajo, utilizando un sistema automático de infiltración de tejidos Leica TP1020 (Leica Biosystems, Alemania). Las muestras, incluidas en bloques de parafina sólidos a temperatura ambiente, pueden ya ser cortadas de forma precisa.

Reactivo	Tiempo (h)	Temperatura
Formaldehído 3,7 %	4	T. ambiente
Agua	1	T. ambiente
Etanol 70 %	1	T. ambiente
Etanol 85 %	1	T. ambiente
Etanol 100 %	2	T. ambiente
Etanol 100 %	2	T. ambiente
Etanol 100 %	2	T. ambiente
Etanol-xilol 50/50	1	T. ambiente
Xilol 100 %	1	T. ambiente
Xilol 100 %	1,5	T. ambiente
Parafina	1	60 °C
Parafina	1	60 °C

Tabla 2. Protocolo de inclusión de tejidos y muestras en parafina.

#### 4.3. Sección

Se obtuvieron cortes de las muestras de espesores de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  empleando un microtomo Leica RM2245 (Leica Biosystems). Las secciones se depositaron sobre portaobjetos de vidrio y se mantuvieron durante 24 h a 37 °C, favoreciendo de esta forma la tanto la adhesión anteriormente comentada como el secado de la muestra.

#### 4.4. Tinción

Pasado el tiempo de adhesión con calor y secado, se continuó con el protocolo manual de desparafinación y posterior hidratación de las secciones, como se detalla en la tabla 3.

Reactivo	Tiempo	
Xilol 100 %	5 min	Desparafinación: el xilol disuelve la parafina y la va sustituyendo progresivamente.
Xilol 100 %	3 min	
Xilol 100 %	3 min	
Etanol 100 %	5 min	Sustitución del xilol de la muestra por etanol puro.
Etanol 100 %	3 min	
Etanol 100 %	3 min	
Etanol 70 %	3 min	Hidratación: sustitución del etanol puro en la muestra por agua, mediante diluciones decrecientes.
Etanol 50 %	3 min	
Etanol 30 %	3 min	
Agua	5 min	

*Tabla 3. Protocolo de desparafinación e hidratación de las secciones.*

##### 4.4.1. Tinción histoquímica

El procedimiento más utilizado para la visualización y estudio de muestras en histología es la tinción histoquímica. Esta técnica se basa en el principio de afinidad de colorantes a los diferentes componentes que forman los tejidos o, en general, las muestras. Son técnicas rápidas y que aportan gran cantidad de información acerca de las propiedades microscópicas de las muestras.

Existen un sinnúmero de colorantes y usos combinados de los mismos diferentes, por lo que la tinción que se vaya a utilizar dependerá de la sustancia o estructura biológica a estudiar.

Una vez la muestra está teñida, se observa al microscopio óptico. Esta visualización puede ser en el momento inmediatamente posterior a la tinción o mucho tiempo después, ya que por lo general la tinción de las muestras permanece estable durante muchos años.

#### 4.4.1.1. *Tinción con hematoxilina y eosina*

La tinción de rutina básica y rápida por excelencia es la hematoxilina-eosina. Mientras que el primer componente tiñe los núcleos celulares y el RER citoplásmico (con sus ribosomas asociados) por ser basófilos (ácidos nucleicos), la eosina es una sustancia ácida que tiñe el citoplasma y ciertos componentes de la matriz extracelular, donde se encuentran componentes generalmente de carácter básico.

Para ello las muestras, una vez fijadas e hidratadas, se sumergieron en la solución acuosa de hematoxilina según Harris (Merck Millipore), durante 1 min a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron con agua.

A continuación, las muestras se sumergieron en eosina amarillenta al 1 % en solución acuosa (Merck Millipore), durante 30 s a temperatura ambiente, y se lavaron rápidamente en agua.

Finalmente, las muestras se deshidrataron nuevamente hasta llegar al xilol (siguiendo el protocolo descrito en la tabla 3, esta vez en sentido inverso, manteniendo las muestras 1 min en cada solución) y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio, utilizando medio de montaje soluble en xilol (Dako, EE.UU.).

Las secciones teñidas se observaron con un microscopio de campo claro Leica DM4000 B conectado a una cámara Leica DFC420 (Leica Biosystems).

#### 4.4.1.2. Tinción con DAPI

La tinción con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro) se emplea en microscopía de fluorescencia. Se trata de un marcador fluorescente que se une fuertemente a las secuencias de ADN bicatenario ricas en adenina y timina. Puede pasar por la membrana celular y llegar al núcleo de la célula, tiñendo las moléculas de ADN presentes en el mismo.

El DAPI, unido al ADN es excitado cuando incide sobre él la luz, siendo la longitud de onda máxima de excitación 358 nm (ultravioleta) y la longitud de onda máxima a la que emite fluorescencia 461 nm (en el rango del azul). Es por ello que durante la microscopía de fluorescencia se excita la muestra con luz ultravioleta y se detecta la luz emitida empleando un filtro azul/cian.

Esta técnica permite, pues, tanto determinar visualmente la densidad de núcleos de células que se han adherido y han proliferado en el biomaterial, como también las características morfológicas de estos núcleos.

Para llevarlo a cabo la tinción se sumergieron las muestras en una disolución de DAPI (Sigma-Aldrich) en PBS a una concentración final de 300 nM durante 60 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se lavaron con PBS durante 5 min a temperatura ambiente, a fin de eliminar el exceso de DAPI no unido fuertemente al ADN nuclear.

Sobre las muestras se depositó medio de montaje especial para moléculas fluorescentes (*Fluorescence Mounting Medium*, Dako), y se cubrió con un cubreobjetos. Los bordes de este se sellaron mediante una laca insoluble en agua. Finalmente, las muestras se observaron inmediatamente con el microscopio de fluorescencia o se mantuvieron a 4 °C en oscuridad hasta su visionado.

Para su observación, a diferencia de las tinciones de este apartado explicadas, se utilizó un microscopio Leica DM4000 B, dotado de un sistema que permite su uso como microscopio de fluorescencia, y conectado a una cámara Leica DFC340 FX (Leica Biosystems).

#### 4.4.1.3. *Tinción con rodamina-faloidina*

La faloidina se une a los filamentos de actina presentes en el citoplasma celular. La actina es una proteína filamentosa que se encuentra en el citoplasma de la célula y se forma por agregación de unidades de actina globular presente en él, formando microfilamentos.

Se utiliza faloidina conjugada con rodamina, un fluorocromo que, al incidir luz a en la región de la longitud de onda del verde, emite luz en la región roja del espectro. Por ello, se suele emplear juntamente con el marcaje de los núcleos celulares (con DAPI) y de proteínas u otras macromoléculas (empleando anticuerpos conjugados a fluorocromos), permitiendo observar la disposición de las macromoléculas por el citoplasma celular (en el que se observarán los filamentos de actina en rojo, gracias a la rodamina) o en la matriz extracelular.

Las células se incubaron en presencia del conjugado rodamina-faloidina (Invitrogen, EE.UU.) durante 1 h, en oscuridad, empleando una dilución de la disolución madre 5:200, en PBS. Posteriormente se retiró la dilución de rodamina-faloidina y la muestra se lavó 3 veces con PBS, durando cada 5 min.

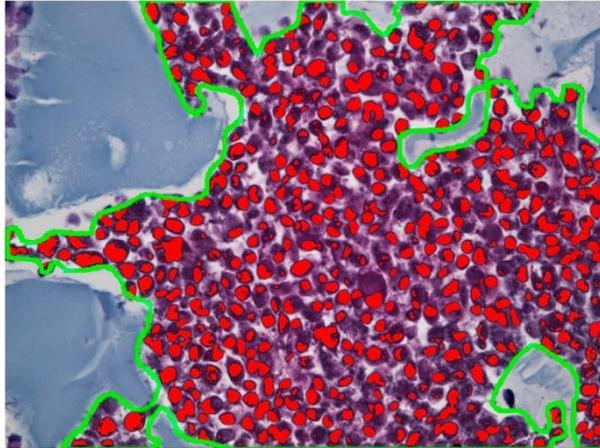
Por último, de la misma manera que en el caso de la tinción con DAPI, se depositó sobre las muestras *Fluorescence Mounting Medium* para inmunofluorescencias, se cubrió con un cubreobjetos, se selló empleando laca y se observó al microscopio de fluorescencia Leica DM400 B.

#### 4.4.1.4. *Recuento celular*

Una vez se tiñeron las muestras con H-E, se determinó la densidad celular por mm<sup>2</sup> en los microtejidos. El propósito fue determinar el número de células por superficie y analizar la influencia que en este parámetro tenían las diferentes condiciones estudiadas.

Para realizar esta cuantificación las imágenes digitales capturadas con el microscopio se convirtieron a imágenes en escala de grises de 8 bits de

profundidad, con tal de segmentar la imagen, y se contaron de manera automática los núcleos celulares mediante el programa informático Image Pro Plus, como se puede observar en la figura 17. Posteriormente se delimitó la zona de estudio en concreto y se obtuvo el área total en mm<sup>2</sup>. Finalmente, se determinó el número de células por mm<sup>2</sup> en las diferentes muestras.



*Figura 17. Ejemplo de imagen empleada para realizar el recuento celular utilizando el programa informático Image Pro Plus. En rojo se observan los núcleos marcados de manera automática por el programa; en verde se delimita el área estudiada (límites del microtejido) en el recuento celular.*

#### 4.4.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que permite la marcación de moléculas, como por ejemplo las proteínas, mediante la utilización de anticuerpos específicos unidos químicamente a una sustancia que es fluorescente. Con ello se pretende demostrar la presencia de una molécula determinada, que actuará como antígeno, a la cual se le unirá el anticuerpo conjugado con un fluoróforo. La observación con el microscopio de fluorescencia Leica DM400 B permitirá determinar la presencia y distribución del antígeno en la muestra analizada.

A continuación, se expone el procedimiento de inmunodetección utilizado.

Una vez la muestra se fijó con formaldehído siguiendo el protocolo anteriormente descrito, se desparafinó e hidrató (en el caso de las muestras incluidas en parafina), se añadió sobre ella 0,1 % de Triton X-100 (Sigma-

Aldrich) en PBS, manteniéndola en esta disolución durante 5 min a temperatura ambiente. El Triton X-100 es un detergente que se utiliza para disolver los lípidos presentes en las membranas celulares y hacerlas permeables, por lo que facilita la entrada de otras sustancias en el interior de células que, antes del tratamiento, mantienen intactas sus membranas (por ejemplo, en el caso de muestras fijadas pero no incluidas en parafina).

A continuación, se lavaron las muestras tres veces con PBS y se incubaron con BSA al 1 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Ello permite la reducción de las uniones no específicas posteriores que pueden tener lugar entre los anticuerpos empleados con componentes de las células y de la matriz extracelular.

A continuación, se retiró la disolución de BSA y, sin lavar, se añadió la disolución del anticuerpo primario correspondiente a la molécula a estudiar a la concentración recomendada para cada anticuerpo. Los anticuerpos se diluyeron con una solución diluyente para anticuerpos EnVision FLEX (Dako). A esta solución se le añadió también DAPI, a una concentración de 600 nM, con el fin de visualizar los núcleos celulares juntamente con la molécula analizada. La incubación del anticuerpo primario se realizó durante 16 h, a 4 °C.

Al día siguiente, la muestra se lavó tres veces con PBS, durante 5 min cada vez, y se añadió el anticuerpo secundario, el cual va unido al fluorocromo, diluido en PBS conteniendo BSA al 1 % a la concentración requerida. La incubación del anticuerpo secundario se prolongó dejó 2 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Este anticuerpo se unirá al primario (reconoce específicamente alguna región del tipo de inmunoglobulina que es el anticuerpo primario) y, al irradiar sobre la muestra con una luz de la longitud de onda a la que se excita el fluorocromo, se visualizará la presencia de la molécula estudiada al detectar la emisión de luz en la región a la que lo hace el fluorocromo excitado.

Por último, las muestras se lavaron tres veces con PBS, se cubrieron con cubreobjetos empleando el medio de montaje para inmunofluorescencia (*Fluorescence Mounting Medium*), y se observaron con el microscopio de fluorescencia Leica DM400 B.

Cabe indicar que, para mostrar las imágenes tomadas en los resultados, en algunas de ellas se modificó el canal verde para una mejor visualización.

### 4.4.2.1. *Agrecano*

El agrecano, también denominada proteína central proteoglicada específica del cartílago, es un proteoglicano, presente en la matriz cartilaginosa, formado por una cadena central proteica, codificada por el gen ACAN, a la que se unen covalentemente una gran cantidad de glicosaminoglicanos (condroitín, queratán y dermatán sulfatos), adoptando el conjunto una estructura tridimensional similar a una escobilla.

Para realizar la inmunolocalización se siguió el protocolo de inmunofluorescencia descrito anteriormente. El anticuerpo primario que se empleó específico del agrecano fue un monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), a una dilución 1:100 en la solución diluyente para anticuerpos EnVision FLEX. El anticuerpo secundario fue una IgG anti-ratón IgG (Sigma-Aldrich), unida al fluorocromo FITC, a una dilución 1:200 en PBS.

### 4.4.2.2. *Colágeno tipo I*

Esta proteína está ampliamente distribuida, estando presente en dermis, tendones, hueso, cartílagos fibrosos, dentina, esclerótica, córnea, etc., ya que es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. Las moléculas se disponen ordenadamente formando fibrillas, que a su vez se agrupan formando fibras de colágena de mayor grosor. Por ello, su función más importante consiste en conferir a los tejidos resistencia al estiramiento. La presencia de esta proteína en un cartílago articular, hialino, es algo no deseable, ya que alteraría las propiedades del cartílago, perjudicando en último término el movimiento de la articulación.

Se siguió el protocolo explicado en el punto anterior, correspondiente al agrecano. El anticuerpo primario que se empleó para detectar la presencia del colágeno tipo I fue un monoclonal de ratón (Sigma-Aldrich), a una dilución

1:100 en la solución diluyente para anticuerpos EnVision FLEX. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo FITC, a una dilución 1:200 en PBS.

#### 4.4.2.3. Colágeno tipo II

El colágeno tipo II se encuentra en el cartílago hialino, formando fibrillas, y es sintetizado por condroblastos. Su función principal, en este caso, es darle al material resistencia a la presión intermitente, por lo que es una proteína esencial en el cartílago articular.

Siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia, el anticuerpo primario (Sigma-Aldrich) que se empleó para detectar el colágeno tipo II fue un monoclonal de ratón, a una dilución 1:500 en la solución diluyente para anticuerpos EnVision FLEX. El anticuerpo secundario fue, como en los casos anteriores, un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo FITC, a una dilución 1:200 en PBS.

#### 4.4.3. Selección de las imágenes

La selección de las imágenes a exponer en los resultados se llevó a cabo de manera aleatoria, no sesgada, es decir, objetivamente. Para ello, se realizaron 10 fotografías de campos diferentes por cada muestra teñida o marcada de manera distinta. En cada imagen se analizó la presencia de la molécula concreta empleando la puntuación detallada en la tabla 4.

<b>Puntuación</b>	<b>Área de la sustancia ocupada en la célula/microtejido (%)</b>
<b>0</b>	0
<b>1</b>	50
<b>2</b>	100

*Tabla 4. Puntuaciones según la presencia de la sustancia analizada en la muestra.*

Una vez puntuadas todas las imágenes, se realizó la media de las puntuaciones correspondientes a cada molécula en cada muestra, y se escogió aquella imagen cuya área ocupada por la sustancia (0, 50 o 100 %) en la célula o microtejido estuviera cercana al valor de la media obtenida.

## 5. Sistema generador de campos electromagnéticos (EMFGS)

### 5.1. Descripción y características del EMFGS

La generación de campos electromagnéticos resultó esencial para el desarrollo de este proyecto. Con estos campos se pretendió estimular cultivos celulares electromagnética y mecánicamente con tal de estudiar su comportamiento y si esta estimulación inducía a una diferenciación condrogénica con mejores resultados a los conseguidos solo con factores de diferenciación químicos.

Para ello se diseñó y construyó un sistema generador de campos electromagnéticos (en adelante EMFGS, por sus siglas en inglés) por parte del grupo de investigación de la Universidad de Zaragoza que forma parte de un proyecto coordinado del Ministerio de Ciencia e Innovación del que también forma parte nuestro grupo de trabajo<sup>127</sup>. Este sistema es capaz de producir una serie de campos electromagnéticos controlados en un espacio de estudio concreto, generando pulsos únicos o también llamados *Single-Pulse EMF*. El dispositivo desarrollado no posee el marcado CE debido a que está diseñado y fabricado con vistas a la investigación para el uso temporal en laboratorio (*apartado h, punto 2, artículo 1 de la Directiva 2006/452/CE relativa a máquinas, y traspuesta en España mediante Real Decreto 1644/2008, sobre el marcado CE*).

#### 5.1.1. Descripción general y listado de componentes

La figura 18 muestra el montaje del dispositivo desarrollado con los principales componentes que lo configuran (tabla 5).

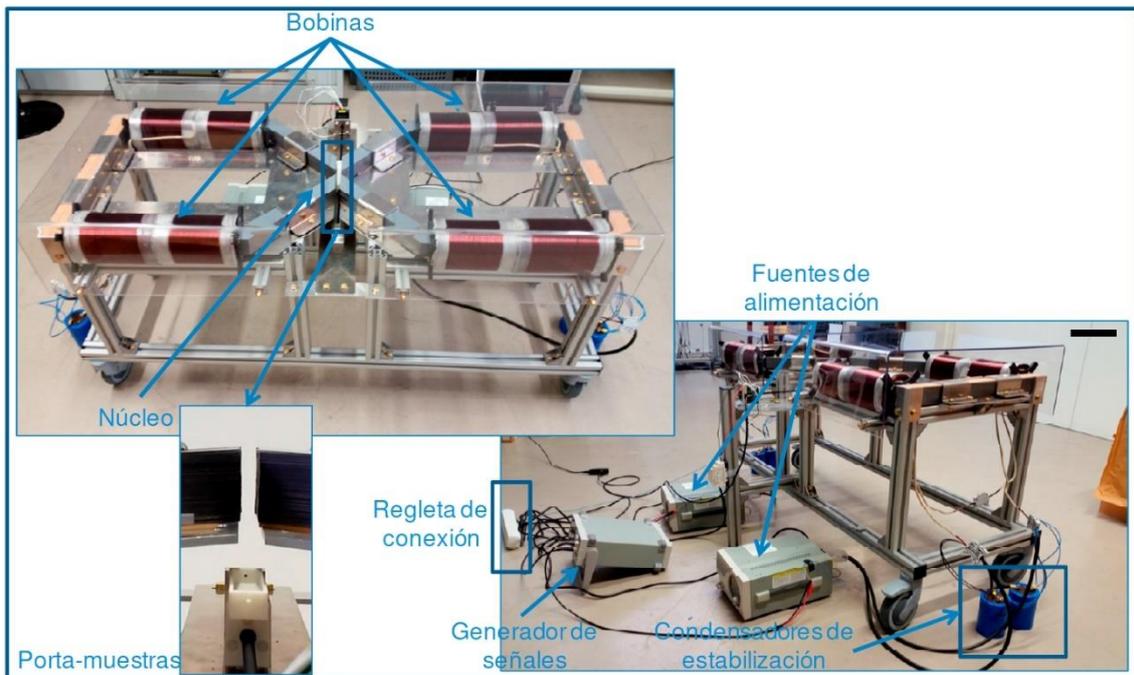


Figura 18. Montaje completo del Sistema Generador de campos magnéticos, junto con la enumeración de todos los dispositivos que lo componen. Barra de escala = 15 cm.

Como se observa en la imagen de la figura 18, dos fuentes de alimentación generan sendas curvas de corriente para crear un campo electromagnético alternativo sobre el elemento porta-muestras que contiene las muestras celulares del estudio. Para la definición de las curvas de trabajo deseadas, se utilizó un generador de señales que envía la señal de referencia a ambas fuentes de alimentación.

Las muestras celulares se instalaron en el elemento porta-muestras, el cual se desplazaba mediante un motor eléctrico programado a través de una aplicación instalada en el ordenador (*Véase: Programa ejecutor del movimiento de las muestras en el EMFGS*).

La siguiente tabla 5 contiene el listado de los principales elementos que componen el sistema generador de campos electromagnéticos desarrollado.

Componente	Descripción
<b>Bobinas</b>	Generación del campo electromagnético
<b>Núcleo electromagnético</b>	Núcleo que define el camino de la mínima reluctancia para el flujo magnético. El material empleado es chapa magnética de <i>M330 – 50 A</i> y de sección 40 × 40 mm
<b>Condensadores de estabilización</b>	Dos condensadores de 22000 µF para cada fuente de alimentación. Estabilizan el control de la corriente utilizada.
<b>Fuentes de alimentación</b>	Dos fuentes que controlan la corriente entregada a las bobinas ( <i>GW-Instek AFG-2225</i> )
<b>Generador de señales</b>	Se encarga de enviar la referencia de corriente a ambas fuentes de alimentación ( <i>GW-Instek PSB 2800L</i> )
<b>Porta-muestras</b>	Elemento sobre el que se instala el dispositivo donde se encuentran las muestras de estudio
<b>Motor</b>	Actuador del elemento porta-muestras para modificar la posición del dispositivo de cultivo (muestras) sobre el que actúa el campo magnético ( <i>motor Elmeq para desplazamiento lineal MLI1FRL17A4-EQ-LB3M180GT</i> )
<b>Dispositivo de cultivo</b>	Elemento de policarbonato con tres agujeros en la cara superior, donde se sitúan los tubos de microcentrífuga dentro de los cuales realizar los cultivos celulares
<b>Ordenador de control</b>	Ordenador con el <i>software</i> para el control del motor
<b>Estructura</b>	Estructura sobre la que se instala todo el dispositivo
<b>Regleta de conexión</b>	Regleta con cinco enchufes para conectar los distintos elementos

Tabla 5. Principales componentes del dispositivo EMFGS.

### 5.1.2. Principio de funcionamiento

El objetivo del dispositivo fue la generación de un gradiente de campo electromagnético homogéneo para producir fuerzas sobre el cultivo celular. Estas fuerzas siguieron la ecuación que se indica a continuación:

$$\vec{F} = \vec{m}\nabla\vec{B}$$

Donde,

$m$ : momento dipolar magnético ( $A \cdot m^2$ ), el cual es un valor volumétrico relacionado con la magnetización del material.

$B$ : densidad de campo electromagnético (T).

En el caso del aire, la densidad de campo electromagnético sería:

$$B = \mu_0(H + M) = \mu_0 H + \mu_0 \frac{m}{V}$$

Con,

$\mu_0$ : permeabilidad magnética del aire.

$H$ : intensidad de campo electromagnético.

El diseño del núcleo electromagnético se realizó para lograr un gradiente homogéneo entre los polos. La estructura general es la que se refleja en la figura 19, donde pueden observarse dos módulos electromagnéticos en forma de U con dos bobinas en cada uno de ellos.

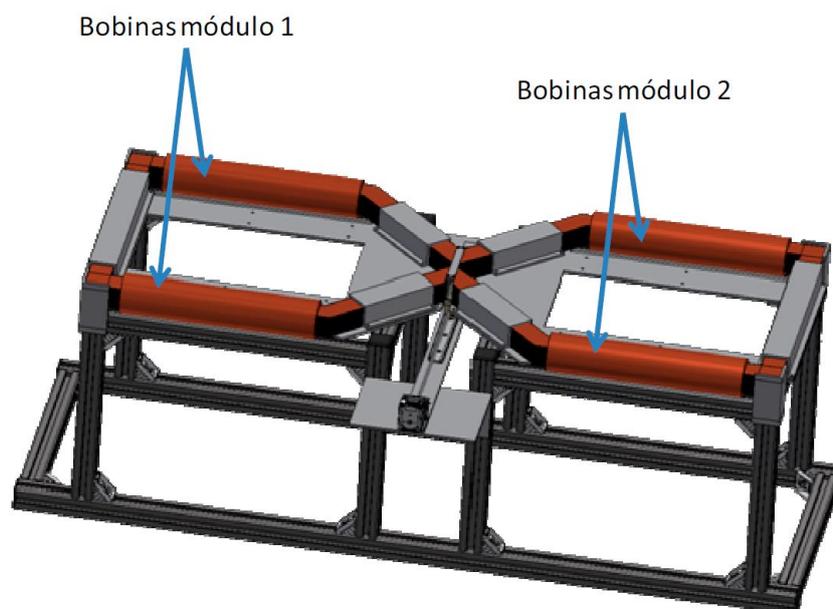


Figura 19. Estructura del dispositivo, con las bobinas de los módulos 1 y 2 y el núcleo electromagnético en naranja.

El dispositivo funciona alimentando alternativamente las bobinas de cada uno de los dos módulos. La figura 20 muestra la distribución de las curvas de flujo electromagnético entre los polos cuando solo las bobinas del módulo superior estaban activadas (ambas generaban un flujo electromagnético en la misma dirección). El salto que se producía en las líneas en la zona de trabajo que se definió entre los cuatro polos del dispositivo fue el responsable del gradiente electromagnético que generaba la fuerza sobre el cultivo celular.

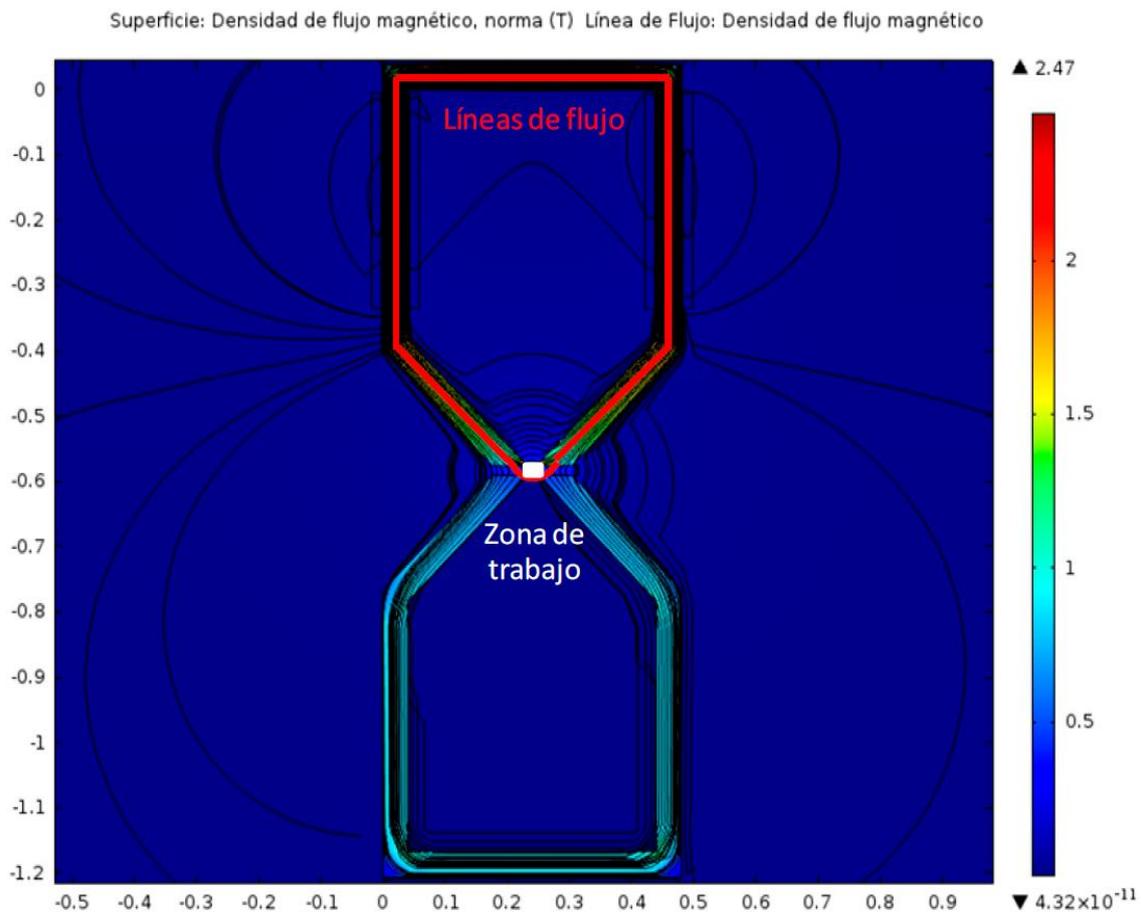


Figura 20. Distribución de las líneas de flujo magnético cuando solo las bobinas del módulo superior están activadas, y cómo afecta en la zona de trabajo (como referencia, el motor estaría en la parte derecha de la imagen).

### 5.1.3. Características generales y eléctricas

Las características generales y eléctricas del dispositivo EMFGS está detalladas en la tabla 6.

<b>Características generales</b>	
<b>Rango de operación</b>	15 x 15 mm
<b>Gradiente magnético</b>	30 T/m
<b>Campo electromagnético (en punto central)</b>	245 mT
<b>Fuerza</b>	14 nN (para partículas de 20 $\mu$ m Dynabeads M280)
<b>Características eléctricas</b>	
<b>Número de espiras en las bobinas</b>	380 espiras
<b>Resistencia de las bobinas</b>	0,1 $\Omega$
<b>Inductancia de las bobinas</b>	117 mHr
<b>Potencia consumida</b>	90 W/bobina
<b>Diámetro del cobre</b>	4 mm

*Tabla 6. Características generales y eléctricas del dispositivo.*

#### 5.1.4. Modo de uso del dispositivo EMFGS

##### 5.1.4.1. Conexión de los distintos elementos

Para comenzar a utilizar el dispositivo fue necesario conectar los siguientes elementos que lo componen. A continuación, se exponen todos ellos, con una breve explicación de su conexión.

##### Fuentes de alimentación con el circuito eléctrico

Las fuentes de alimentación se conectaron con dos condensadores en paralelo a cada uno de los dos módulos magnéticos. Es importante destacar que se utilizaron condensadores electrolíticos, por lo que era importante respetar la polaridad. La figura 21 muestra el montaje realizado mediante fichas de conexión.



Figura 21. Conexión de las fuentes de alimentación al circuito eléctrico.

Generación de señales con las fuentes de alimentación

Las dos salidas del sistema de generación de señales se conectaron al EXT CONT (J3) de cada una de las fuentes para que estas realizaran seguimiento de la consigna en corriente (figura 22).

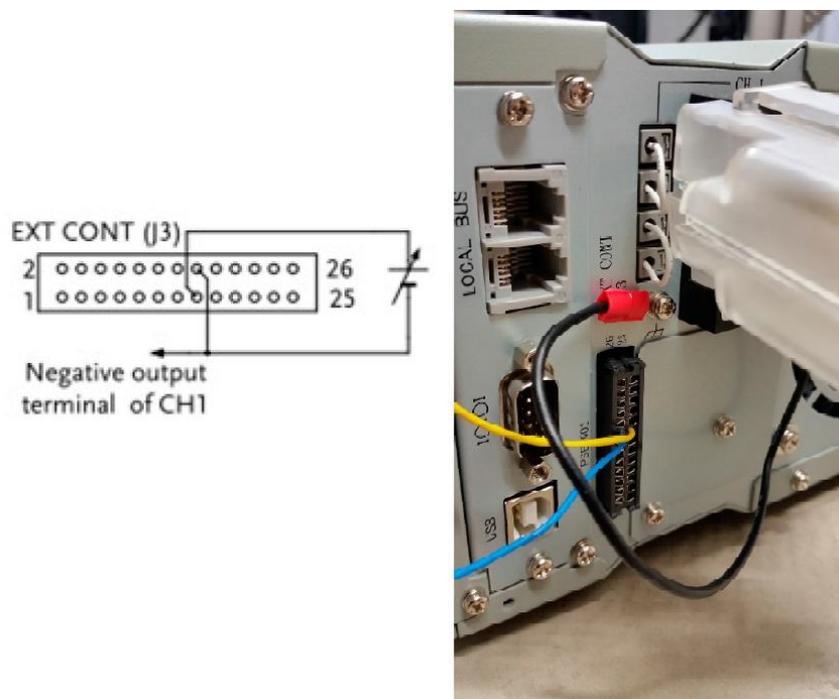


Figura 22. Conexión de las fuentes de alimentación para que realizaran el seguimiento de la consigna en corriente dada por el generador de señales.

Motor eléctrico

El motor eléctrico se conectó al controlador como muestra en la figura 23.

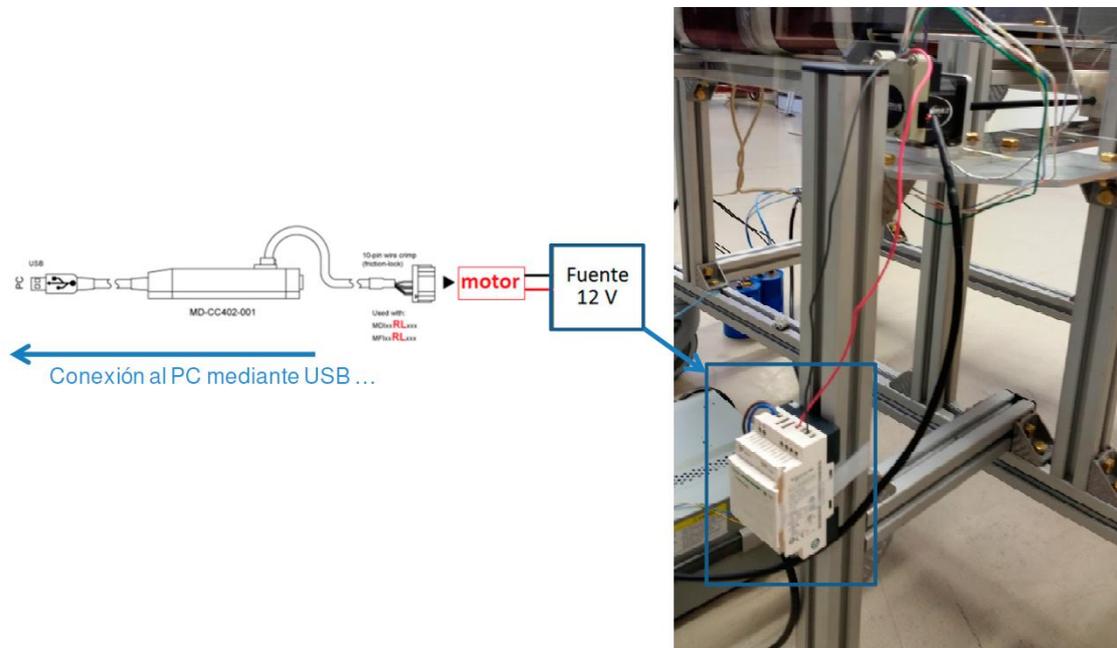
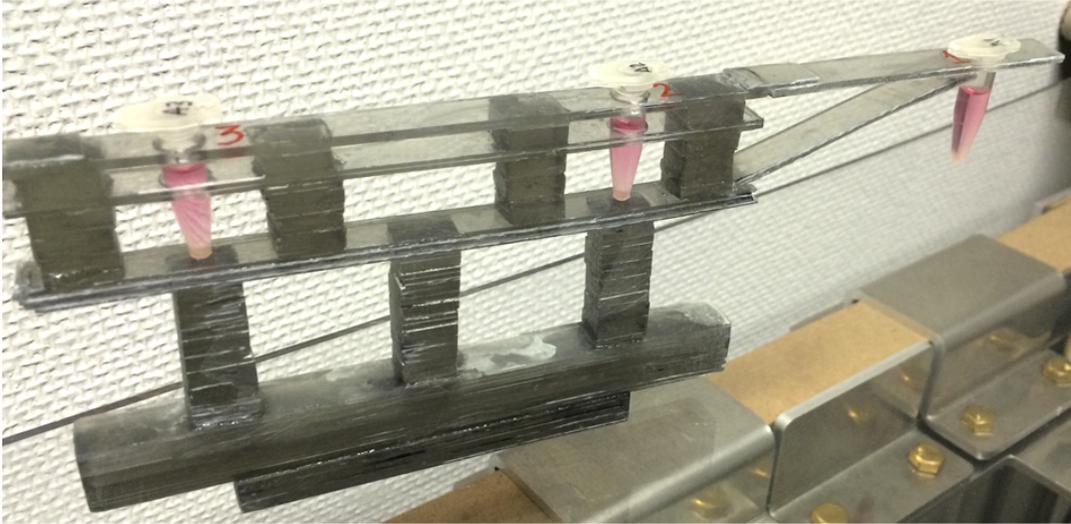


Figura 23. Conexión del motor eléctrico.

Dispositivo de cultivo

Consiste en el elemento que permitía situar, de forma longitudinal, los tubos de microcentrífuga donde se llevaron a cabo los cultivos celulares en los estudios de estimulación con el EMFGS (figura 24). La separación entre los ejes centrales de los tubos de microcentrífuga contiguos fue de aproximadamente 100 mm.

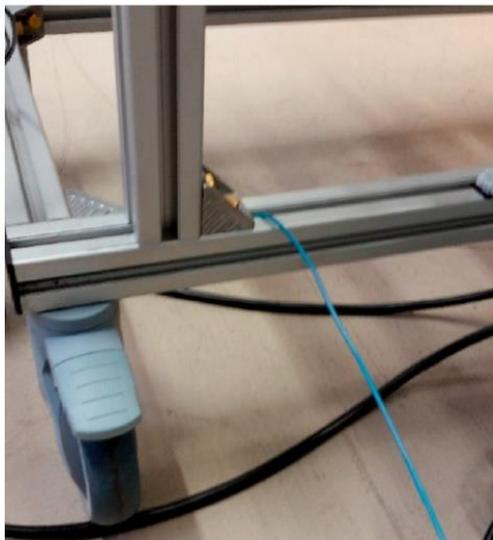
Como puede observarse, el dispositivo puede utilizarse para un máximo de 3 muestras en cada serie de irradiación.



*Figura 24. Dispositivo de cultivo, con tres tubos de microcentrifuga con microtejidos en ellos.*

### Toma de tierra

Por seguridad del sistema, se incluyó una toma de tierra a través de la regleta de conexiones (figura 25).



*Figura 25. Toma de tierra.*

#### 5.1.4.2. Programación de las curvas de corriente

La programación de la curva de corriente se realizó a través de la interfaz del generador de señales. Cabe destacar las especificaciones siguientes:

- La señal generada es de tipo cuadrada, entre -10 y +10 V.
- Dado que las fuentes de alimentación solo aceptan señales positivas, se ajustaron los parámetros para que el valor inferior fuera 0 V. Para ello, se configuró el *offset* y el valor de pico a pico. La figura 26 muestra la pantalla de configuración para generar una señal de 1,8 V – 0 V a una frecuencia de 1 Hz.



Figura 26. Pantalla de configuración en el generador de señales.

- El valor de 10 V de consigna se corresponde con los 80 A máximos que es capaz de proporcionar cada fuente de alimentación. Por ese motivo, para lograr la corriente de 30 A, se configuró la señal de salida a 3,75 V.
- Para lograr que las señales en cada salida sean alternas, se activó la opción de sincronización invertida (figura 27).



Figura 27. Sincronización invertida de las salidas del generador de señales para lograr un comportamiento alterno en cada uno de los módulos magnéticos.

Además del generador de señales, fue necesario configurar las fuentes de alimentación para que siguieran la señal de referencia generada por el generador. Para ello, se accedió a través del menú a la opción “6.AnA” que aparece en la figura 28.



Figura 28. Opción del menú para que las fuentes de alimentación sigan la consigna del generador de señales.

Una vez que se tenía este menú seleccionado, se pulsó “ENTER” para ir accediendo a las distintas opciones de configuración. La ruleta permite ajustar el valor requerido para cada una de las diferentes configuraciones.

Así pues, la opción “6.AnA” se activó accionando la ruleta hasta que aparece en pantalla “E-cU”. Esta opción significa que el sistema recibe la señal de la referencia externamente en voltaje (figura 29).



Figura 29. Opción del menú para que las fuentes de alimentación sigan la consigna del generador de señales como una señal en voltaje.

A continuación, se indicó al dispositivo que el control de voltaje se realizaba internamente (“cU in”; figura 30A) y la referencia en corriente venía externamente (“cc out”; figura 30B).



Figura 30. Configuración del control de voltaje en el amplificador para seguir la señal de referencia en corriente, y B: configuración de la señal de referencia en corriente en el amplificador.

#### 5.1.4.3. Programación para la ejecución del motor

El modelo de motor utilizado para desplazar el porta-muestras fue el *MDrive linear actuator, Programmable Motion Control Version, NEMA* tamaño 17 (tabla 5). Para su control, se empleó el controlador *MD-CC402-001 (USB to RS-4222/485), 10-Pin Friction Lock Wire Crimp*. La comunicación con el controlador, así como la programación de los movimientos, se realizó a través del software *SEM Terminal*, que puede descargarse de la empresa Schneider Electric Motion (<http://motion.schneider-electric.com/lmb/lexium-mdrive-software.php>).

Una vez instalado el software, este se configuró atendiendo a las características del actuador seleccionado:

- *MDrive/MForce* en la columna *Product Family*.
- *Motion Control* en la columna *Control Type*.

Como ya se explicó anteriormente, la comunicación física entre el ordenador y el propio motor se realizó a través de un convertidor (figura 24).

#### Desarrollo del programa ejecutable

El programa ejecutable que hace funcionar el motor se creó utilizando el software *SEM Terminal*. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se creó un nuevo editor de programa: *View>New Editor>OK*.
2. Una vez creado, se cambió el modelo del motor que aparece por defecto en el software por el modelo MDI empleado en el proyecto. Para ello, en la parte inferior de la ventana del editor del programa aparece *LMDCM57* donde se escogió el modelo *MDI*. Seleccionando *SET*, se guardaron los cambios.
3. El siguiente paso consistió en crear un nuevo terminal, ventana desde la cual se ejecuta el programa y se envía al motor: *View>New Terminal*.
4. Con el nuevo terminal creado, se modificó su configuración. Para ello, se abrió la ventana *Terminal Settings*. Con la ventana abierta, se modificaron los valores siguientes:

- Port: *COMXX* (se debe averiguar a qué puerto COM está conectado el motor consultando el Administrador de dispositivos de Windows, en el caso de utilizar este Sistema Operativo, como es el caso en este proyecto).
- Baudrate: *9600*.
- Line Delay: *60*.
- Device: *MDI*.

Se aplicaron los cambios seleccionando *SET*.

5. Con la fuente de 12 V alimentando el motor (figura 24), se pulsa en *Port Closed* en la ventana del terminal y este pasa a *Port Open*.
6. Para comprobar que todos los pasos anteriores se han realizado correctamente, se pulsó *Control+C*, apareciendo en la pantalla del terminal el mensaje *Copyright 2010 Schneider Electric Motion USA*.

Una vez se llevaron a cabo los pasos anteriores y apareció el mensaje (*Copyright 2010 Schneider Electric Motion USA*) en la pantalla del terminal, se procedió a desarrollar el programa ejecutable en sí. A modo de explicación sencilla, se expondrá a continuación un programa sencillo y corto, con el que se definirá cada variable y función. En el anexo de *Programa para la ejecución del motor del EMFGS* se encuentra el programa entero desarrollado y empleado en el proyecto.

Una vez establecido el programa desarrollado en el editor, se envió al terminal para ejecutarlo. Para ello, teniendo seleccionada la ventana del terminal: *View>Download>From: PROGRAM.mxt* (las casillas *Variables* o *Programs* de la ventana emergente no debían estar seleccionadas). A continuación, se seleccionó *Download*, con lo que se cargó el programa en el terminal y lo ejecutó.

Ejemplo de programa ejecutable y explicación

‘ PROGRAMA

‘ -----

PG 100 ‘ El programa empezará en la línea 100.  
 LB G1 ‘ Nombre del programa “G1” (siempre LETRA + número).  
 P=0 ‘ Se determina la posición inicial o posición cero.  
 MR 2140000  
 H  
 SL 0  
 H 2000  
 MR -710000  
 H  
 SL 0  
 H 60000  
 MA  
 H  
 PR P ‘ Muestra en la pantalla del terminal la posición final.  
 E ‘ Se finaliza el programa G1.  
 PG ‘ Se sale del programa G1.  
 EX G1 ‘ Se ejecuta el programa G1.

El editor permite la ejecución del propio motor de diferentes formas. La que se escogió en este proyecto es la de los movimientos relativos (*MR*) y absolutos (*MA*). En el primer caso, el motor se ejecutó haciendo mover el portamuestras hasta llegar a la posición deseada respecto del punto en el que estaba anteriormente (figura 31).

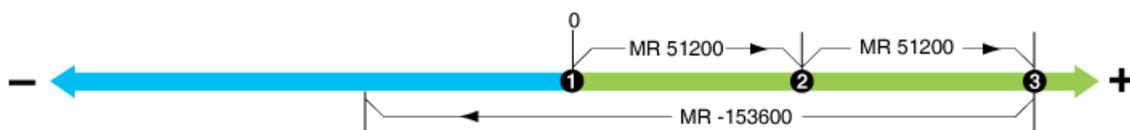


Figura 31. Explicación gráfica de los movimientos relativos que permite realizar el motor.

Por lo que respecta a los movimientos absolutos, el motor movió el porta-muestras hasta la posición deseada respecto del punto determinado como inicial o punto cero (figura 32).

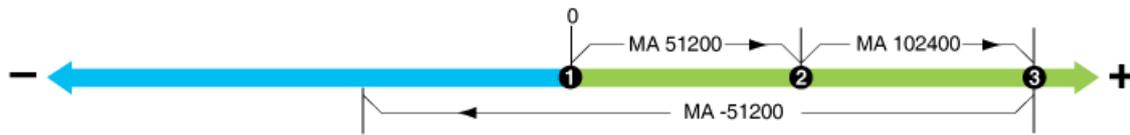


Figura 32. Explicación gráfica de los movimientos absolutos que permite realizar el motor.

Así pues:

MR 2140000 ' El motor procederá moviendo el porta-muestras desde la posición en la que está (posición inicial en este primer caso) hasta llegar a la posición deseada (en este caso, a unos 130 mm aproximadamente).

H ' La función anterior se llevará a cabo durante el tiempo requerido hasta completarse (o en este caso, llegar a los 130 mm desde la posición inicial).

SL 0 ' Esta función determina la velocidad; en este caso, la velocidad es cero, por lo que el motor estará parado.

H 2000 ' La función anterior se llevará a cabo durante 2000 ms, es decir, el motor estará parado durante 2 s.

MR -710000 ' El porta-muestras se moverá desde la posición de 130 mm anterior hasta llegar a los 44 mm respecto de este punto anterior pero en sentido contrario al movimiento del caso MR 2140000.

H

SL 0

H 60000 ' El motor estará parado 60 s (1 min) esta vez en la posición anterior.

MA ' En este caso, el motor se ejecutará moviendo el porta-muestras desde donde está hasta llegar a la posición absoluta o posición establecida como inicial.

H ' Como en los casos anteriores, el programa se ejecutará haciendo volver el porta-muestras a la posición absoluta o inicial durante el tiempo que lo requiera.

Es importante destacar que la correspondencia entre los pasos del motor y el desplazamiento longitudinal del porta-muestras es 0,0158 mm/paso.

### Funcionamiento del programa desarrollado para el proyecto

El siguiente paso fue determinar el tiempo de exposición de las muestras cada día. Para ello, se consultó la bibliografía con tal de realizar un estudio de los diferentes tiempos empleados en ensayos ya realizados y publicados<sup>117-122</sup>.

Finalmente se optó por un tratamiento de doble estimulación de 20 min por muestra, estando en reposo 40 min entre las siguientes muestras. Este tratamiento se repitió el mismo día, con un descanso entre ambos de 2 h, dejando las muestras en el incubador celular durante este periodo de tiempo.

En el anexo de *Programa para la ejecución del motor del EMFGS* se encuentra el programa entero desarrollado y empleado en el proyecto.

Como ya se ha explicado en puntos anteriores, las muestras se introdujeron en tubos de microcentrífuga, los cuales se pusieron en el dispositivo de cultivo (figura 24). Durante los periodos de estimulación, los tubos con las muestras se cerraban, con tal de mantener las condiciones de asepsia.

El programa diseñado llevó a cabo los siguientes pasos por cada tanda de estimulaciones efectuadas sobre las muestras:

1. El dispositivo de cultivo se situó fuera de la zona central de estimulación sobre el porta-muestras (figura 18). Es por ello, que el primer movimiento que realizaba el motor consistía en acercar la primera muestra (su eje central) al centro de estimulación.
2. Transcurridos los 20 min de exposición de la primera muestra, el motor volvía a conectarse, desplazando la segunda muestra a la zona de estimulación.
3. Finalizada la primera estimulación de la segunda muestra, el motor volvía a actuar, desplazando esta vez la tercera muestra.

4. Estimulada la tercera muestra, el dispositivo de cultivo se movía en sentido contrario, acercando nuevamente la primera muestra al centro de máxima exposición electromagnética. Esto permitía empezar la segunda estimulación de las muestras.
5. Los pasos 2 al 4 se repetían una vez más, habiendo una variación en el paso 4 de esta segunda estimulación, en la que el motor se ejecutaba haciendo que el dispositivo de cultivo volviera a la posición inicial al principio del estudio.
6. Los tubos de microcentrífuga se abrían nuevamente en condiciones estériles, y se guardaban durante 2 h en el incubador celular.
7. Finalmente, los pasos 1 a 5 se repetían una segunda vez el mismo día.

#### 5.1.4.4. *Protocolo de uso*

En el anexo de *Protocolo de uso del Sistema Generador de campos electromagnéticos* se encuentra el procedimiento de uso del dispositivo desarrollado. En él se explica detalladamente el modo de encendido/apagado del generador del campo magnético y de la ejecución del motor para el movimiento del porta-muestras.

#### 5.1.5. Listado de riesgos

La tabla 7 expone los principales riesgos para tener en cuenta durante el manejo y el uso del dispositivo.

<b>Peligro</b>	<b>Riesgo</b>	<b>Acción</b>
Peligro de explosión	<b>Montaje incorrecto de los condensadores de estabilización y explosión de estos</b>	Al ser condensadores electrolíticos, es necesario considerar la polaridad de estos durante su instalación. Para evitar posibles daños, se recomienda el uso de gafas de seguridad
Incendio	<b>Sobrecalentamiento de las bobinas en ensayos de larga duración y cortocircuito</b>	Se debe monitorizar regularmente que la temperatura de las bobinas no alcanza valores excesivamente elevados (inferiores a 120 – 130 °C, aunque el límite de aislamiento es de 200 °C)
Contacto eléctrico	<b>Contacto de un operario/a con un cable activo</b>	No manipular ningún cable sin desconectar la alimentación del sistema Se recomienda que una única persona utilice el dispositivo a la vez para evitar contacto con las bobinas encendidas
Corte	<b>Corte de un operario/a al instalar el dispositivo de cultivo en el porta-muestras</b>	Utilizar guantes que protejan de los cortes al realizar operaciones cerca de la chapa magnética en la zona de trabajo
Quemadura	<b>Quemadura al tocar una bobina</b>	No desinstalar las cubiertas de protección de las bobinas y evitar tocar la máquina. Se recomienda usar guantes siempre
Atrapamiento	<b>Atrapamiento durante el movimiento del motor</b>	No acercarse a la máquina cuando se encuentre en funcionamiento, y no manipular el dispositivo sin desconectar la alimentación de la máquina
Daño sobre la máquina	<b>Bloqueo del motor al intentar movimientos que superen la guía</b>	Durante la programación, tener en cuenta la posición de partida del elemento porta-muestras
Campos electromagnéticos	<b>Atrapamiento de piezas metálicas</b>	Evitar acercarse a la zona con elementos metálicos que puedan provocar atrapamientos o accidentes
	<b>Riesgo de interferencia magnética en personas con marcapasos</b>	Se recomienda no usar el dispositivo a personas con marcapasos

Tabla 7. Riesgos del Sistema Generador de campos magnéticos.



En primer lugar, se realizaron microtejidos para los diferentes tiempos analizados, siguiendo el protocolo detallado en un apartado posterior: tiempo inicial (sin medio de diferenciación condrogénica), 1, 6, 24 y 72 h, y 7 y 14 días. Se analizaron 3 microtejidos por cada tiempo experimental.

El tercer día de formación del microtejido celular se consideró tiempo inicial ( $t = 0$ ). Una tanda de 3 microtejidos a este tiempo, tomados como control, se procesaron para la extracción de ARN. Por lo que respecta a las otras muestras, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio de diferenciación condrogénica. El medio de diferenciación se cambió cada 2-3 días en las muestras requeridas. Pasadas las horas y días establecidas por tiempo experimental, las muestras se procesaron para la extracción de ARN.

Después del análisis de la expresión génica de estas muestras, se determinaron 2 tiempos diferentes para la exposición de las muestras de estudio al campo electromagnético, que fueron 72 h y 14 días.

### 5.3. Estudio de la viabilidad de hDPSC expuestas al EMF

Una vez puesto a punto el sistema generador de EMF, el primer punto consistió en estudiar la afectación de estos campos electromagnéticos en la viabilidad de las células empleadas.

Así pues, se elaboraron microtejidos de células pulpares siguiendo el protocolo que se explicará en un punto posterior, y se expusieron a los EMF. El protocolo de tratamiento empleado fue de campos electromagnéticos de 245 mT en 2 exposiciones de 20 min, con descanso de 40 min entre ambas, y repetición de estos pasos una segunda vez al día, con un descanso en el incubador celular de 2 h entre ambos tratamientos. Todo ello se llevó a cabo durante 72 h (3 sesiones).

Por lo que respecta a las muestras, se elaboraron 3 por cada condición, siendo las condiciones las expuestas en la tabla 8, manteniéndose las células en medio de proliferación.

<b>Muestras</b>	<b>Condición</b>
<b>A</b>	Exposición al tratamiento de EMF
<b>B</b>	Sin exposición, fuera del incubador celular a 37 °C
<b>C</b>	Sin exposición, fuera del incubador a temperatura ambiente
<b>D</b>	Sin exposición, dentro del incubador celular

*Tabla 8. Listado de muestras elaboradas para este estudio de viabilidad de hDPSC expuestas al campo electromagnético empleado.*

Durante el tratamiento de exposición electromagnética, los tubos de microcentrífuga de todos los grupos de muestras se mantuvieron cerrados, y cuando el tratamiento de exposición hubo acabado, y en el caso de las muestras A-C volvían al incubador celular, estos tubos se abrían para facilitar el reequilibrio de CO<sub>2</sub> hasta el siguiente periodo de exposición.

Una vez terminaron los 3 días de tratamiento, se estudió la viabilidad celular, mediante el ensayo de citotoxicidad MTS (Promega). Los microtejidos se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min a 4 °C y se resuspendieron en 100 µL de medio de cultivo sin rojo fenol (Gibco). Se transfirieron a una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron con 20 µL de la solución reactiva de MTS durante 2 h a 37 °C en oscuridad. Finalmente, la placa de cultivo se llevó al lector Victor X3 2030 Multilabel Reader (PekinElmer) y se leyó la absorbancia a 490 nm.

El valor obtenido de absorbancia se determinó como directamente proporcional al número de células en la muestra analizada. El grupo de muestras D se tomó como referencia o control absoluto (viabilidad del 100 %).

## 6. Elaboración de las partículas electromagnéticas

Una novedad que aporta este trabajo de Tesis Doctoral es la exposición de microtejidos a campos electromagnéticos con tal de recrear un entorno fisiológico para las células. En este entorno se intentaron recrear las fuerzas que reciben las células condrales en el cartílago articular de la rodilla durante el movimiento de la persona. La hipótesis de trabajo es que esta estimulación electromagnética de las células induce la diferenciación condrogénica de las mismas.

Como se ha comentado anteriormente, la recreación de estas fuerzas dinámicas sobre los microtejidos necesitó del empleo de partículas electromagnéticas que se desplazaran hacia las células creando presiones sobre estas. Este desplazamiento se logró al exponer el conjunto de células y partículas a los EMF.

En el diseño del EMFGS se tuvo en cuenta esta consideración, y es por ello que se incorporaron dos pares de bobinas que se encendían de forma alternante. Esto permitió que las partículas se desplazaran hacia cada par de bobinas cada 3 s. De manera simplificada, se esquematiza en la figura 34.

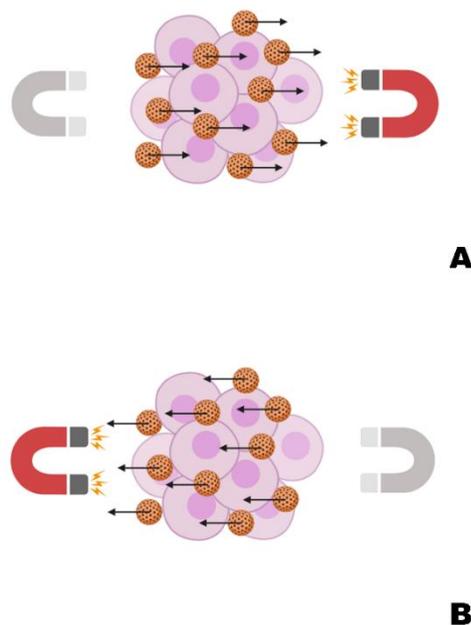


Figura 34. Esquema del movimiento de las partículas electromagnéticas al verse sometidas a los EMF; A: activación del par derecho, y B: activación del izquierdo.

Las partículas electromagnéticas empleadas estaban constituidas por una parte polimérica, que constituyó la estructura de la partícula, y otra parte metálica, la cual era susceptible a los campos electromagnéticos.

Así pues, el protocolo que se empleó para la elaboración de las partículas electromagnéticas fue el establecido por Vikingsson *et al.* (2016) y Clara-Trujillo *et al.* (2019). Este protocolo se basó en el principio de emulsión-evaporación<sup>128,129</sup>.

Por una parte, la fase orgánica no acuosa empleada consistió en una disolución de ácido poli(L-láctico) (PLLA, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich) en cloroformo (Scharlab, España) al 2 %. Esta fase contenía la parte férrica, que fueron nanopartículas de ferrita EMG330 (Ferrotec Ferrofluids, EE.UU.), cuyo diámetro nominal era de 10 nm. La concentración de la ferrita fue de 5 % en volumen respecto a la masa de PLLA (figura 35A).

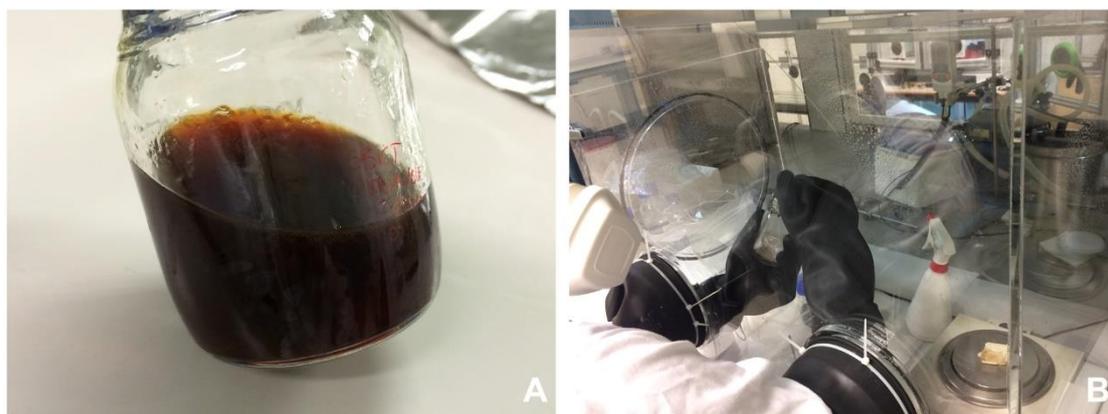


Figura 35. A: fase orgánica elaborada con PLLA y nanopartículas de ferrita disueltas en cloroformo, y B: cabina de extracción de gases donde se realizan las manipulaciones.

El proceso de carga de la disolución con las nanopartículas férricas se llevó a cabo en una cabina hermética de metacrilato, con tal de asegurar que no se producían escapes de nanopartículas al ambiente (figura 35B). Todo el proceso de fabricación se llevó a cabo bajo campana de extracción y acondicionando la zona con papel húmedo para favorecer que posibles restos de nanopartículas se pegaran a él; además, se trabajó en todo momento con máscara adaptada para trabajos con partículas.

La fase acuosa o emulsificante fue una solución poli(vinil-alcohol) (PVA) (Sigma-Aldrich) al 4 % en agua desionizada.

Una vez homogeneizadas las disoluciones, se obtuvieron las partículas. Para ello, se procedió al montaje del equipo de agitación por emulsión (Ika Eurostar, Deutschland) y de la bomba de inyección de disoluciones Syringe-Pump NE-1000 (New Era Pump Systems Inc., USA). Dicha instalación se puede observar en la figura 36A.

Para este estudio se prepararon 20 mL de la solución orgánica con las partículas. Esta mezcla se añadió gota a gota a 200 mL de fase acuosa, en constante agitación a 750 rpm en el momento del goteo. Para este proceso se empleó la bomba de inyección a un flujo de 1 mL/min (figura 36B).



*Figura 36. Montaje del sistema e inyección de la fase orgánica en la solución acuosa para la formación de las microesferas con partículas férricas. A: bomba de inyección y agitador, y B: inyección de la fase orgánica en la solución acuosa de PVA, donde se observa una gota de la de PLLA + partículas férricas a punto de caer en la fase acuosa.*

Una vez goteada toda la disolución orgánica, se añadieron 150 mL de agua desionizada a fin de favorecer la evaporación del PVA. La mezcla permaneció durante 24 h a temperatura ambiente y en agitación constante a la misma velocidad indicada anteriormente.

Pasado este tiempo, las microesferas de PLLA con ferrita se sometieron a 4 lavados consecutivos con agua desionizada en agitador de vaivén.

Finalmente, las partículas férricas se resuspendieron en etanol puro y se tamizaron para descartar aquéllas de diámetro superior a 70  $\mu\text{m}$ . Se dejaron sedimentar, se sustituyó el etanol por agua desionizada y, finalmente, esta se retiró.

El siguiente paso fue congelar las partículas para poder liofilizarlas. Se realizó un proceso de congelación por fases, evitando de esta manera la

aglomeración de las microesferas. Así pues, las partículas se depositaron en una placa Petri de 60 mm de diámetro, se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h y a continuación se mantuvieron durante 16 h a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se liofilizaron durante 48 h para eliminar restos de agua, empleando la liofilizadora LyoQuest 85 (Telstar, España).

Una vez las partículas férricas se liofilizaron, se trasladaron a una nueva placa Petri; aquellas adheridas al recipiente inicial se rascaron cuidadosamente utilizando una espátula metálica.

Debido a que las partículas férricas se iban a utilizar en un ambiente estéril, se esterilizaron mediante irradiación con luz ultravioleta durante 2 h. Tras ello se lavaron 3 veces con PBS estéril. Finalmente, se resuspendieron en PBS a una concentración de 10 mg/mL.

### 6.1. Determinación de la densidad de partículas por muestra

Con el fin de determinar la densidad de partículas férricas que se emplearían en las muestras, se realizó un estudio preliminar empleando diferentes concentraciones de microesferas. Para ello, se elaboraron 3 microtejidos siguiendo la metodología descrita en el siguiente apartado. A los 3 días de cultivo (tiempo inicial de exposición), se añadieron las partículas férricas. Las concentraciones por muestra fueron: 2 mg, 1 mg y 200  $\mu\text{g}$ . Una vez las partículas sedimentaron, se retiró el sobrenadante y se añadió nuevo medio de cultivo. Tras ello, las muestras se expusieron al EMF.

El tratamiento empleado para este estudio previo fue de 20 min de exposición por muestra, seguido de 40 min de reposo. Esto se repitió una segunda vez a continuación.

La evaluación de la densidad de partículas a emplear finalmente en las muestras se llevó a cabo visualmente. Los parámetros analizados fueron:

- Movimiento de las partículas férricas
- Deformabilidad del microtejido durante el movimiento de las partículas
- Rotura del microtejido
- Reformación del microtejido en caso de rotura

## 7. Elaboración de microtejidos para la exposición electromagnética-mecánica

Finalmente, el tercer bloque del trabajo de esta Tesis Doctoral consistió en exponer una serie de muestras al campo electromagnético generado por el dispositivo, para determinar el efecto de esta estimulación sobre la capacidad de diferenciación condrogénica de las células madre de pulpa dental. Además, también se estudió el efecto generado por las presiones que recibían las células en cultivo por parte de partículas magnéticas en presencia de dicho campo electromagnético.

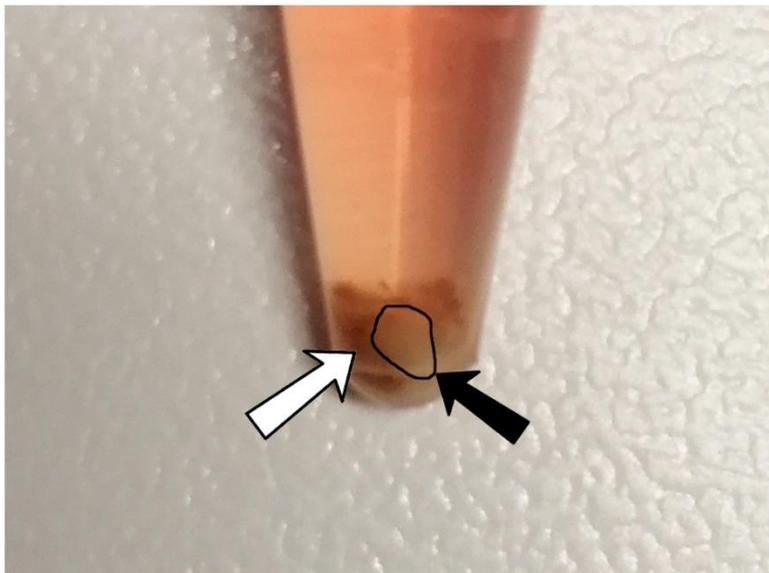
En estos estudios también se elaboraron microtejidos, aunque siguiendo un procedimiento diferente al del punto 3.

En este caso, las células pulpares, una vez despegadas de la superficie de cultivo, se contaron y se resuspendieron  $6 \times 10^5$  células en 300  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Esta suspensión celular se introdujo en un tubo de microcentrífuga de 500  $\mu\text{L}$ , y se centrifugó a 1.500 rpm a 4 °C durante 5 min, lo que permitió sedimentar las células en el fondo del tubo. Las muestras se dejaron dentro del incubador celular durante 3 días en su propio medio de cultivo, con el fin de favorecer que contactaran entre ellas y formaran un microtejido.

Pasado este tiempo ( $t = 0$ ), se sustituyó el medio de cultivo de las muestras por medio de diferenciación condrogénica y se expusieron al EMFGS.

En el caso de las muestras en presencia de partículas magnéticas (estimulación electromagneto-mecánica), estas se elaboraron siguiendo el protocolo anterior; a los 3 días de formación del microtejido, se añadió 1 mg de partículas a cada muestra y se permitió que sedimentasen durante 5 min dentro de la campana de flujo laminar. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por medio de diferenciación condrogénica y se iniciaron los tratamientos de estimulación, explicados en los apartados siguientes. En la figura 37 se observa en la zona central un microtejido rodeado por partículas magnéticas.

Los medios de cultivo se sustituyeron cada 2-3 días en las muestras de más de 72 h de tratamiento.



*Figura 37. Formación de un microtejido (flecha negra) rodeado de partículas magnéticas (flecha blanca).*

### 7.1. Estudio de la estimulación electromagneto-mecánica durante 72 h y 14 días

En primer lugar, las muestras se estimularon electromagnética y magneto-mecánicamente microtejidos de células pulpares durante 72 h, otros durante 72 h con un cultivo posterior en medio de diferenciación de 11 días, y finalmente otra tanda de microtejidos durante 14 días. Estos tiempos de estimulación fueron los establecidos en el punto 5.2. Así pues, se elaboraron 3 microtejidos por cada condición de estudio, siendo las muestras A: estimulación electromagnética de 72 h, B: estimulación electromagneto-mecánica de 72 h, C: estimulación electromagnética de 72 h + cultivo posterior de 11 días, D: estimulación electromagneto-mecánica de 72 h + cultivo posterior de 11 días, H: estimulación electromagnética de 14 días e I: estimulación electromagneto-mecánica de 14 días.

Con este diseño experimental se pretendió determinar, primero, la afectación de estos tratamientos en la diferenciación condrogénica de las células empleadas. Y, segundo, la diferencia entre los tratamientos usados, es decir, si la estimulación electromagneto-mecánica favorecía la diferenciación condrogénica en comparación con la estimulación electromagnética sola.

Una vez terminaron los tratamientos descritos se extrajo el ARN total de las muestras, siguiendo el procedimiento descrito en un apartado posterior.

Se establecieron como muestras control aquellas que no habían sido sometidas a ninguna estimulación ni cultivadas una vez generado el microtejido, ello es, microtejidos a tiempo cero del estudio. Así pues, los valores de expresión génica relativa se obtuvieron al compararlos con los valores obtenidos en las muestras a  $t=0$  (muestras O).

Además, también se elaboraron microtejidos a modo de control, sin partículas magnéticas en este caso, de cada estudio de estimulación. Así pues, se dejaron en el incubador celular 3 microtejidos durante todos los estudios de estimulación, siendo las muestras J: cultivo de 72 h y K: cultivo de 14 días.

## 7.2. Estudio morfológico de microtejidos estimulados 72 h con posterior cultivo

Este estudio final del trabajo consistió en estimular electromagneto-mecánicamente microtejidos de células pulpares durante 72 h y cultivar posteriormente estas muestras durante 14, 28 y 42 días en medio de diferenciación condrogénica. Con ello, se pretendió analizar la síntesis de proteínas y proteoglicanos y su secreción a la matriz extracelular formada por el microtejido en sí. Este análisis se llevó a cabo mediante técnicas histológicas, como es la tinción con H-E, y por inmunofluorescencia, siguiendo los protocolos establecidos en el punto 4.

Así pues, cabe destacar que, al término del último tratamiento de estimulación, todos los microtejidos se trasladaron a pocillos de agarosa. Para ello, los tubos de microcentrífuga con las muestras en ellos se centrifugaron durante 10 s a 1.500 rpm y se retiró el medio de cultivo. El sedimento celular se resuspendió en 10  $\mu$ L de nuevo medio de diferenciación y se trasladó a un pocillo realizado en un bloque de agarosa al 3 %, siguiendo la metodología descrita en el punto 3.

Se elaboraron 3 microtejidos para cada condición, siendo las muestras E: estimulación de 72 h + cultivo posterior de 14 días, F: estimulación de 72 h +

cultivo posterior de 28 días y G: estimulación de 72 h + cultivo posterior de 42 días. Además, a modo de control se elaboraron otros microtejidos que estuvieron en el incubador celular durante todo el estudio. Como en el caso anterior, también se elaboraron 3 microtejidos por cada condición, siendo las muestras L: cultivo de 72 h + 14 días, M: cultivo de 72 h + 28 días y N: cultivo de 72 h + 42 días.

Una vez alcanzado el tiempo final de cada estudio, las muestras se incluyeron en parafina siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4, y se realizó el estudio morfológico a partir de la tinción con H-E y la inmunodetección de las proteínas y proteoglicano analizados.

### 7.3. Listado final de muestras elaboradas para los estudios

Muestra	Partículas	Exposición EMF	Tiempo (días)	Cultivo post-exposición (días)
A	-	+	3	-
B	+	+	3	-
C	-	+	3	11
D	+	+	3	11
E	+	+	3	14
F	+	+	3	28
G	+	+	3	42
H	-	+	14	-
I	+	+	14	-
J	-	-	3	-
K	-	-	14	-
L	-	-	3	14
M	-	-	3	28
N	-	-	3	42
O	-	-	0	-

*Tabla 9. Listado de las muestras con las diferentes condiciones estudiadas en los tratamientos de estimulación electromagneto-mecánica.*

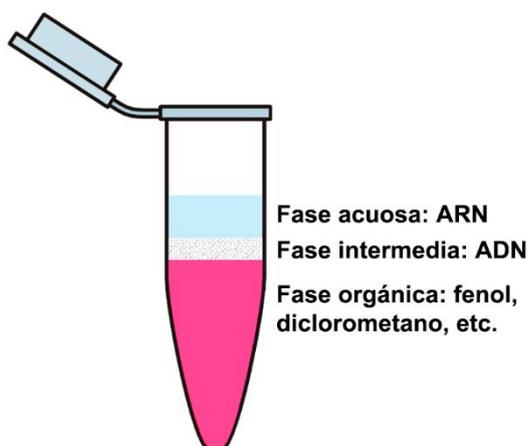
## 8. Caracterización de la expresión génica

### 8.1. Extracción de ARN total

Una vez finalizados los cultivos y/o tratamientos descritos, se retiró el medio de cultivo de las muestras. Sin lavar, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo lisador Trizol LS Reagent (Ambion, EE.UU.), el cual lisa las membranas celulares y solubiliza los componentes celulares.

#### 8.1.1. Separación de fases

En primer lugar, se llevó a cabo una separación de fases de la solución celular. Para ello, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de diclorometano (Sigma-Aldrich), se homogeneizó la mezcla y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se centrifugó la muestra a  $1,2 \times 10^4$  g durante 15 min, a  $4^\circ\text{C}$ . Este proceso ayuda a separar en 3 fases el extracto celular, como se esquematiza en la figura 38.



*Figura 38. Representación esquemática de las 3 fases obtenidas en el proceso de extracción de ARN.*

Finalmente, se transfirió la parte acuosa a un nuevo tubo de microcentrifugación. Es en esta fase donde se encuentra el ARN de la muestra.

### 8.1.2. Precipitado del ARN

El siguiente paso fue precipitar el ARN. Para ello, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de glucógeno a la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para favorecer la precipitación del ARN. Tras ello se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Sigma-Aldrich) y se homogeneizó la solución. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min y posteriormente otros 15 min a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se centrifugó a 12.000 g durante 10 min, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante, obteniendo un precipitado con el ARN de la muestra.

### 8.1.3. Lavado del ARN y conservación

El último paso consistió en realizar diversos lavados al precipitado de ARN obtenido en el paso anterior. Para ello, se resuspendió el precipitado en 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 75 % en agua, estéril o doblemente autoclavada. Se homogeneizó y se centrifugó a  $7,5 \times 10^3\text{ G}$  durante 5 min, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y se añadió nuevo etanol, repitiendo el paso anterior.

Una vez retirado el nuevo etanol, se dejó evaporar a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Finalmente, el precipitado de ARN se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de agua, estéril o doblemente autoclavada. La disolución de ARN se mantuvo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 8.1.4. Cuantificación del ARN total

Para determinar la cantidad de ARN que había en la muestra, se empleó el dispositivo NanoDrop One (Thermo Scientific, EE.UU.). Este dispositivo determina la concentración de ARN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Además, muestra la pureza del ARN a partir de la relación entre las absorbancias de la muestra a 260 nm y 280 nm; valores cercanos a 2 indican que el ARN es puro.

Primero, se lavaron los cabezales del NanoDrop con agua estéril y, tras ello, se calibró el sistema utilizando un blanco, en este caso agua estéril a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Una vez registrada la medida base, se procedió a cuantificar las muestras, introduciendo 1  $\mu\text{L}$  de la disolución de ARN. Durante todo el proceso de cuantificación, las muestras se mantuvieron a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

## 8.2. Retrotranscripción (RT-PCR)

La retrotranscripción, o transcripción inversa, consiste en el paso de ARNm a ADNc. Este fue el paso previo a la cuantificación de la expresión de los diferentes genes estudiados.

El primer paso fue determinar la concentración final de ADNc que se necesitaba en el estudio. Se determinó utilizar una concentración de 4  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

Se optó por preparar un volumen final de muestra de 120  $\text{ng}$  de ADNc en 30  $\mu\text{L}$ . En la siguiente tabla se muestra el volumen de ARN de la muestra utilizado y de los reactivos empleados, siguiendo las recomendaciones de la empresa distribuidora de los mismos (tabla 10).

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Muestra de ARN	120 $\text{ng}$ (depende de la cuantificación de ARN total en la muestra)
Agua estéril o doblemente autoclavada	(34,8 - volumen de muestra de ARN tomada)
Tampón RT (Applied Biosystems)	3
Random primers (Applied Biosystems)	3
dNTPs (Applied Biosystems)	1,2
Inhibidor de ARNasas (Applied Biosystems)	1,5
Transcriptasa inversa (Applied Biosystems)	1,5

Tabla 10. Volúmenes de muestra y reactivos empleados para la RT-PCR.

Una vez realizada la mezcla de muestra y reactivos, se llevó a cabo la PCR en un termociclador 2720 (Applied Biosystems). El protocolo empleado se muestra en la tabla 11, siguiendo las recomendaciones de la empresa distribuidora.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

Tabla 11. Temperatura y tiempo seguidos en cada paso de la PCR.

Finalizada la retrotranscripción, las muestras se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

### 8.3. PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real

La PCR cuantitativa, PCR a tiempo real o qPCR es una técnica variante de la PCR convencional, en la que se amplifica y cuantifica simultáneamente de manera absoluta el producto de la amplificación, en este caso de ADNc. Para ello, se utilizan 2 cebadores y una mezcla compuesta por dNTPs, un tampón de reacción y una polimerasa de ADN termoestable. A este conjunto se le añade una sonda marcada con un fluorocromo, permitiendo medir la tasa de generación del producto.

Así pues, se realizó una mezcla de la muestra de ADNc con una mezcla de reactivos para la qPCR. En la siguiente tabla se muestran los volúmenes de cada elemento (tabla 12), siguiendo las consideraciones de la empresa comercial. Se prepararon 10 µL de cada muestra para cada gen a analizar, y se dispusieron en placas de 384 pocillos.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Muestra de ADNc	1
Agua estéril o doblemente autoclavada	3,5
Gene Expression MasterMix (dNTPs, tampón de reacción, polimerasa de ADN termoestable y sonda marcada con fluorocromo) (Applied Biosystems)	5
Cebadores (Applied Biosystems)	0,5

Tabla 12. Volúmenes de muestra y reactivos empleados para la PCR cuantitativa.

A continuación, se realizó la PCR cuantitativa utilizando un termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems). El protocolo utilizado en este caso fue el indicado por la empresa distribuidora de los reactivos, según se indica en la tabla 13. El programa informático que se empleó para llevar a cabo esta PCR fue el QuantStudio Design & Analysis (Applied Biosystems).

	Paso 1	Paso 2	Paso 3 (x 40 ciclos)	
			Paso 3.1	Paso 3.2
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	50	95	95	60
Tiempo	2 min	10 min	15 s	1 min

Tabla 13. Temperatura y tiempo seguidos en cada paso de la qPCR.

Una vez terminó la qPCR, los datos se analizaron con el programa informático ExpressionSuite v1.1 (ThermoFisher Scientific, EE.UU.). Finalmente, los datos obtenidos se representaron con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, EE.UU.).

### 8.3.1. Genes analizados

A continuación, se enumerarán todos los genes analizados en este trabajo de Tesis Doctoral, junto con una breve explicación de su significado e importancia para el estudio (tabla 14).

Gen	Significancia
<b>ACAN</b>	Agrecano. Es el gen encargado de la formación del proteoglicano agrecano que se encuentra en la matriz extracelular condral
<b>COL1A1</b>	Cadena 1 $\alpha$ del colágeno tipo I. Es el gen encargado de la formación de una de las cadenas del tipo de colágeno característico del cartílago fibroso, de la dermis, del hueso y de los ligamentos, entre otros tejidos
<b>COL2A1</b>	Cadena 1 $\alpha$ del colágeno tipo II. Es el gen encargado de la formación de una de las cadenas del tipo de colágeno característico del cartílago hialino
<b>COL10A1</b>	Cadena 1 $\alpha$ del colágeno tipo X. Es el gen encargado de la formación de una de las cadenas del tipo de colágeno típico de los condrocitos hipertróficos
<b>HIF1A</b>	Factor 1 $\alpha$ de inducción de hipoxia. Regula la respuesta homeostática celular y sistémica en condiciones de hipoxia. Se analizó debido a que los condrocitos en estado fisiológico trabajan en estado de hipoxia continuada
<b>SOX9</b>	Factor de transcripción SRY 9. Es un gen fundamental en el proceso de la diferenciación de los condrocitos
<b>VEGFA</b>	Factor $\alpha$ del crecimiento endotelial vascular. Es una proteína relacionada con el crecimiento de vasos sanguíneos en los tejidos
<b><u>GAPDH</u></b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Es un gen relacionado en el metabolismo celular Se tomó como control interno (o <i>housekeeping</i> )

Tabla 14. Listado de genes con su significancia.

#### 8.4. Análisis bioestadístico mediante R

Una vez obtenidos los resultados mediante las técnicas de biología molecular, se procedió a su análisis estadístico. La finalidad era determinar si las diferencias observadas en la expresión de los diferentes genes analizados eran estadísticamente significativas. Este estudio se realizó mediante el lenguaje de programación R. En Anexos se presentarán las líneas de programación desarrolladas para tal efecto.

En primer lugar, fue imprescindible determinar de qué tipo son las variables de las que se dispuso en el estudio; esto permite escoger qué prueba estadística se debe realizar. A continuación, se expone en la tabla 15 el listado de variables por estudio realizado, especificando el tipo (cualitativa o cuantitativa) de cada una de ellas.

Estudios	Variable 1	Variable 2	Variable 3
Determinación tiempos exposición EMF	Tiempo (cualitativa)	-	Expresión génica (cuantitativa)
Estimulación EMFmicrotejidos	Tiempo (cualitativa)	Tratamiento (cualitativa)	Expresión génica (cuantitativa)

Tabla 15. Determinación de variables por estudio realizado y analizado mediante expresión génica.

En el primer caso (Determinación tiempos EMF), el estudio contempló una variable cualitativa y otra cuantitativa. Por ello, se optó por llevar a cabo un ANOVA *one-way*. En el segundo caso (Estimulación EMF microtejidos), el estudio estuvo compuesto por dos variables cualitativas y una cuantitativa, por lo que se realizó un ANOVA *two-way*.

Cabe destacar que el anova (o análisis de varianza) permite estudiar el comportamiento de la varianza de los datos obtenidos, evaluando el efecto de los tratamientos (variables cualitativas en este caso) en la variabilidad de la variable respuesta (expresión relativa de los genes analizados; variable cuantitativa).

Para realizar la prueba del ANOVA, los datos que se analizan deben cumplir 2 requisitos previos: normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas u homocedasticidad. Por un lado, la normalidad de datos se analizó mediante la prueba o test de Shapiro, en el que si el valor de  $p$  obtenido por cada gen era mayor a 0,05 no se rechazaba la hipótesis nula ( $H_0$ : normalidad de los datos). Por otro lado, la homocedasticidad se analizó mediante el test de Bartlett, en el caso del ANOVA *one-way*, o de Levene, para el ANOVA *two-way*; si el valor de  $p$  obtenido de todo el conjunto de datos de la expresión relativa de los genes estudiados era mayor a 0,05 no se rechazaba la hipótesis nula ( $H_0$ : homogeneidad de varianzas).

Si ambas condiciones se cumplían se podía realizar la prueba del ANOVA por cada gen estudiado.

En el caso del ANOVA *one-way*, el valor F obtenido debía ser mayor al valor de distribución F (valor de F normalizado), con lo que se rechazaba la hipótesis nula ( $H_0$ : igualdad de medias). A continuación, se validaron los datos obtenidos mediante el análisis de normalidad y homocedasticidad de los residuos, siguiendo el mismo protocolo expuesto anteriormente. En el caso de que para los residuos se cumplieran ambos requisitos, se realizó la prueba de Tukey para cada gen; esta prueba permite hacer comparaciones múltiples de las medias de cada grupo de muestras, teniendo un control de la tasa de error por grupo. Así pues, aquellos valores de  $p$  obtenidos inferiores a 0,05 mostraron una diferencia estadísticamente significativa en la comparación realizada entre los dos grupos de muestras, es decir, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ : igualdad de medias).

Para el caso del ANOVA *two-way*, se observó la significancia del valor  $p$  obtenido (valor de  $p$  inferior a 0,05). A continuación, se analizaron las varianzas, donde si el valor  $p$  obtenido era mayor a 0,05 se determinó que al menos una de las diferencias entre las medias de los valores era significativa. Para los diferentes genes de estas muestras se estudió mediante la comparación múltiple de la prueba de Emmeans si la diferencia de medias entre dos muestras era estadísticamente significativa (valor de  $p$  inferior a 0,05).

Finalmente, de no cumplirse las condiciones del ANOVA *one-way*, se realizó la prueba de Kruskal para dichos datos. Si el valor de  $\chi^2$  que devolvió la prueba por cada gen era mayor al valor de  $\chi^2$  normalizado, se rechazó la hipótesis nula ( $H_0$ : igualdad de medias), por lo que, a continuación, se llevó a cabo el test post-hoc de Kruskal-Nemenyi, el cual tiene la misma función que la prueba de Tukey. Así pues, aquellos valores de  $p$  obtenidos inferiores a 0,05 mostraron una diferencia estadísticamente significativa en la comparación realizada entre los dos grupos de muestras, es decir, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ : igualdad de medias).

Si las condiciones para realizar el ANOVA *two-way* no se cumplían se procedió a realizar igualmente este estudio de análisis de varianza. Si el valor

de  $p$  para cada gen y variable era significativo (valor de  $p$  inferior a 0,05), se realizó de igual manera un test de Emmeans para cada gen teniendo en cuenta cada variable cualitativa por separado; valores de  $p$  inferiores a 0,05 significaron que al menos uno de los grupos de muestras presentaba diferencias estadísticamente significativas en la media muestral con respecto a otra del mismo grupo.

A continuación, se muestran dos figuras (figura 39 y 40) en las que se representa de manera esquemática todo el proceso de análisis estadístico desarrollado para los dos estudios de biología molecular realizados.

### **Estudio: determinación de tiempos de EMFs**

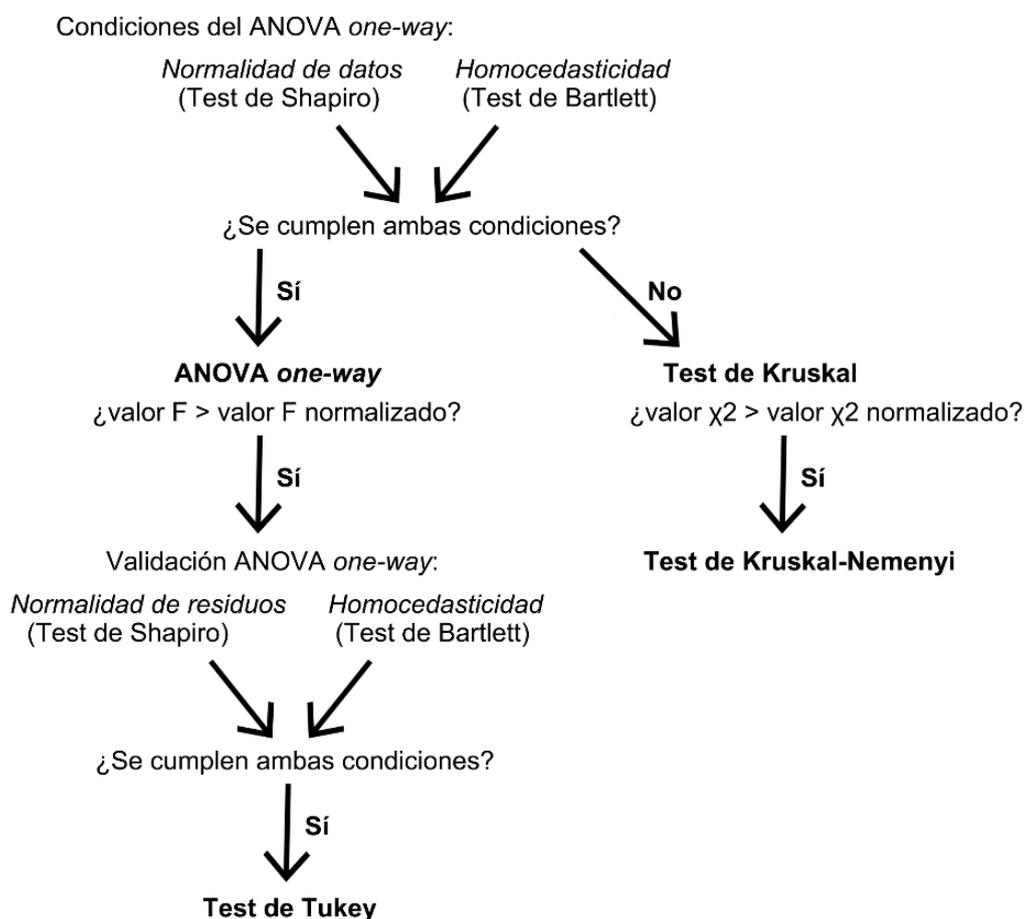


Figura 39. Análisis bioestadístico del estudio "Determinación tiempos exposición EMF".

**Estudio: estimulación microtejidos**

Condiciones del ANOVA *two-way*:

*Normalidad de datos*  
(Test de Shapiro)

*Homocedasticidad*  
(Test de Levene)

¿Se cumplen ambas condiciones?

Sí

**ANOVA *two-way***

Análisis de varianza: significancias

¿Se cumple?

Sí

**Test de Emmeans**

No

**ANOVA *two-way***

¿Hay significancia?

Sí

**Test de Emmeans**  
(por variable cualitativa)

Figura 40. Análisis bioestadístico del estudio "Estimulación EMF microtejidos".

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo de Tesis Doctoral está organizado en 3 bloques, por lo que los resultados de cada uno de ellos se presentarán a continuación por separado, con su correspondiente discusión a continuación.

**RESULTADOS: bloque preliminar**

## 1. Estudio preliminar de la proliferación y viabilidad celular

En este trabajo se emplearon dos tipos diferentes de células madre mesenquimales, como son las células madre de tejido adiposo humano (hADSC) y las de pulpa dental humana (hDPSC).

En primera instancia, se realizó un estudio preliminar de la viabilidad de ambos tipos celulares, con tal de determinar tiempos de expansión y cultivo celular, para el diseño de estudios posteriores.

### 1.1. Células mesenquimales de tejido adiposo humano (hADSC)

En primer lugar, se descongelaron células madre de tejido adiposo, en diferentes pases (4-5), y se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con medio de proliferación. Después de diferentes días de cultivo, las células se despegaron del frasco siguiendo la metodología descrita en Material y Métodos. Estas células se contaron en el hemocitómetro automático, determinando la cantidad de células y la viabilidad celular.

Pase celular	Siembra inicial	Días de cultivo	Células totales	Viabilidad (%)
4	0,5 x 10 <sup>6</sup>	5	2,9 x 10 <sup>6</sup>	72
	0,5 x 10 <sup>6</sup>	6	1,8 x 10 <sup>6</sup>	81
5	0,5 x 10 <sup>6</sup>	6	1,2 x 10 <sup>6</sup>	76
	0,5 x 10 <sup>6</sup>	8	1,3 x 10 <sup>6</sup>	89

Tabla 16. Siembra de hADSC, cultivadas durante varios días y determinación de la viabilidad celular.

La tabla 16 muestra que células en pase 4 llegaron a crecer entre 4 y 6 veces en número respecto a las sembradas inicialmente, mientras que en pase 5 esta multiplicación celular decayó en 2 a los 6 días de cultivo y creció mínimamente a los 8 días, posiblemente debido al envejecimiento celular. En ambos pases celulares, la viabilidad se encontró entorno al 80 %.

## 1.2. Células mesenquimales de pupa dental humana (hDPSC)

A continuación, se repitió este estudio con células madre de pulpa dental humana. Se siguió el mismo procedimiento que en el punto anterior, sembrando células en pases 3 a 6.

Pase celular	Siembra inicial	Días de cultivo	Células totales	Viabilidad (%)
3	$0,5 \times 10^6$	5	$2,1 \times 10^6$	98
4	$0,5 \times 10^6$	6	$4,8 \times 10^6$	90
	$0,5 \times 10^6$	7	$5,2 \times 10^6$	96
5	$0,5 \times 10^6$	5	$3,3 \times 10^6$	91
	$0,5 \times 10^6$	7	$5,5 \times 10^6$	94
6	$0,5 \times 10^6$	8	$5,5 \times 10^6$	96

*Tabla 17. Siembra de hDPSC, cultivadas durante varios días y determinación de la viabilidad celular.*

Como se observa en la tabla 17, células en pase 3 cuatuplicaron su número a los 5 días de cultivo. En un pase superior, 4, llegaron a multiplicar su número por 10 a la semana de cultivo. En pase 5, a los 5 días de cultivo las células se multiplicaron por 6, mientras que, a la semana, estas mismas células alcanzaron valores de 10 veces el valor de siembra. Finalmente, las células pulpares en pase 6 también sobrepasaron el valor de 10 veces el número de siembra celular a los 8 días de cultivo. En todos los casos, en este estudio la viabilidad de las células pulpares en cultivo fue superior al 90 %.

Considerando los anteriores resultados, se optó por utilizar las células hDPSC para los siguientes experimentos de este trabajo de Tesis Doctoral.

DISCUSIÓN: bloque preliminar

## 1. Estudio preliminar de la viabilidad celular

En este trabajo se emplearon dos tipos diferentes de células madre mesenquimales, como son las células madre de tejido adiposo humano (hADSC) y las de pulpa dental humana (hDPSC). Ambos tipos celulares fueron suministrados por empresa Lonza.

En primer lugar, se realizó un estudio preliminar de la viabilidad de ambos tipos celulares, con la finalidad de determinar los tiempos de expansión y cultivo celular en que las células mantenían sus características. Este estudio permitió seleccionar el tipo celular idóneo que fue empleado en el resto de los estudios experimentales.

Por lo que respecta a las hADSC, se observó una capacidad proliferativa menor que en el caso de las hDPSC. En el caso del primer tipo celular, a la semana de cultivo el recuento celular apenas mostró una duplicación respecto al número células sembradas (tras sembrar  $0,5 \times 10^6$  y a los 7 días se contaron  $1 \times 10^6$  células en el frasco de cultivo), teniendo una viabilidad de al rededor del 75 %. Por el contrario, las células pulpares, tras una semana de cultivo celular, proliferaron activamente, multiplicado por 10 el número de células sembrado (se sembraron  $0,5 \times 10^6$  células y a los 7 días se contaron  $5 \times 10^6$  células), siendo la viabilidad superior al 90 % en los pases celulares empleados.

La capacidad proliferativa de las hDPSC que se ha observado en este estudio coincide con la de otros estudios publicados<sup>52,54,56,60,130-132</sup>, donde también se comparó con la capacidad de otras células madre mesenquimales. Además, Gronthos *et al.* ya destacó su multipotencialidad (condrogénica y osteogénica, entre otras) como característica fundamental para su empleo en la ingeniería tisular<sup>58</sup>.

Cabe destacar que muchos autores consideran el uso de células mesenquimales por su capacidad proliferativa. Esto permite elaborar muestras con un alto número de células, superando los  $2 \times 10^6$  células por muestra<sup>133-135</sup>. Y es que se ha observado que cultivos de altas densidades celulares presentan mejores resultados en diferenciación condrogénica.

Así pues, se decidió emplear las células madre mesenquimales de pulpa dental humana para llevar a cabo los experimentos de esta Tesis Doctoral por su mayor tasa de proliferación. Esta alta capacidad proliferativa facilitó poseer un número elevado de alícuotas de células criopreservadas para poder elaborar las muestras empleadas en los diferentes experimentos. Además, su alta multipotencialidad, en concreto de diferenciación condrogénica, hace que haya mostrado su eficacia en la reparación de lesiones condrales<sup>136</sup>.

RESULTADOS: bloque 1

## 1. Estudio de la citotoxicidad de los hidrogeles

Una vez preparados los diferentes componentes que formaron los hidrogeles utilizados en el trabajo, y antes de realizar los cultivos celulares, se analizó su citotoxicidad. Así pues, se condicionó medio durante 24 y 72 h y 7 días con: C) alginato 3 %-agarosa 1 %, D) alginato 3 %, E) agarosa 1 % + 10 % de CaCl<sub>2</sub> y F) agarosa 1 % sin CaCl<sub>2</sub>. Además, se condicionó medio con látex al 10 % en peso como control positivo de citotoxicidad (B).

Los medios condicionados se utilizaron para cultivar hDPSC durante 24 h, como se describe en Material y Métodos y, a continuación, se determinó la viabilidad celular con el ensayo de MTS.

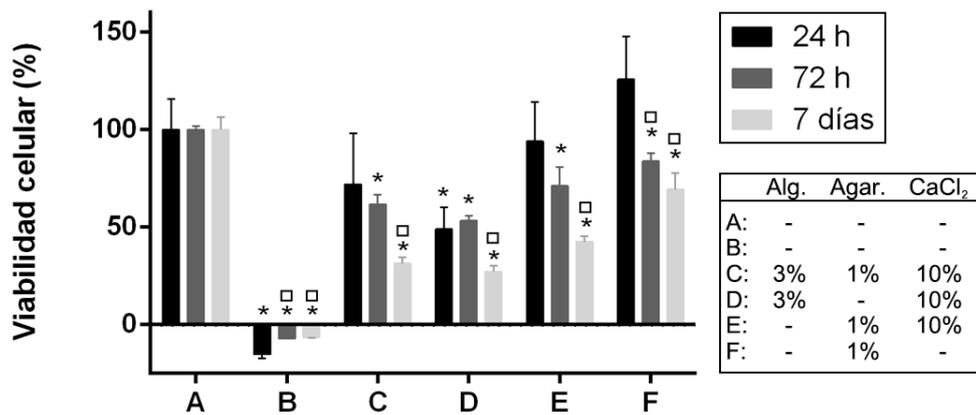


Figura 41. Viabilidad celular de hDPSC cuando han sido expuestas a medios condicionados, durante 24 y 72 h y 7 días, con A: medio control (control negativo); B: látex (control positivo); C: alginato 3 %-agarosa 1 %; D: alginato 3 %; E: agarosa 1 % + 10 % CaCl<sub>2</sub>, y F: agarosa 1 % sin CaCl<sub>2</sub>. Promedio ± desviación estándar; \*p ≤ 0,05 respecto al control negativo/tiempo, y □p ≤ 0,05 respecto al valor de 24 h/condición.

La figura 41 muestra los valores de viabilidad celular en porcentaje de los diferentes componentes estudiados en los tiempos analizados.

Como cabía esperar, el látex (B) fue citotóxico para los diferentes tiempos de condicionamiento de los medios (24 o 72 h o 7 días).

Se observó que, a las 24 h de condicionamiento de los medios, no hubo diferencias significativas entre los distintos hidrogeles, salvo para el medio

condicionado con alginato al 3 % (D), donde se apreció una disminución del 51 % respecto del control negativo.

A las 72 h de condicionamiento del medio, se observó una disminución en la viabilidad celular en todas las condiciones respecto al control negativo, siendo esta disminución del 38 % en el caso del medio condicionado con alginato-agarosa (C), del 46 % en el caso del alginato solo (D), del 29 % en el caso de la agarosa con el agente polimerizador  $\text{CaCl}_2$  (E) y, finalmente, del 16 % en el caso de la agarosa sola (F).

Finalmente, en el caso de los medios condicionados durante 7 días, también se observó una disminución significativa en todos los casos, siendo para este punto experimental una disminución más importante respecto del control negativo que en el caso de las 72 h. Así pues, se observó una disminución del 68 % en el caso de la combinación de alginato y agarosa (C), del 72 % en el caso del alginato 3 % (D), del 57 % en el caso de la agarosa 1 % + 10 % de  $\text{CaCl}_2$  (E) y, por último, una disminución del 30 % en el caso de la agarosa al 1 % sin el agente polimerizador (F).

Por lo que respecta a las diferencias significativas entre las condiciones de cada tiempo experimental analizado, en el caso del medio condicionado con alginato 3 %-agarosa 1 % (C), cabe destacar la disminución del 40 % de la viabilidad celular empleando medio condicionado 7 días con respecto al medio condicionado durante 24 h. Por lo que respecta al medio condicionado con alginato al 3 % (D), se apreció una disminución del 21 % del medio condicionado durante 7 días respecto al de 24 h. En el caso del medio condicionado con agarosa 1 % + 10 % de  $\text{CaCl}_2$  (E), se observó una disminución en un 53 % de la viabilidad cuando se empleó el medio condicionado durante 7 días respecto al condicionado 24 h. Finalmente, se observó que, tanto empleando medio condicionado con agarosa sola (F) 72 h como 7 días, la viabilidad de las células disminuyó respecto al uso del medio condicionado 24 h, siendo la disminución del 42 % para el primer caso y del 56 % para el segundo caso.

## 2. Estudio de la citotoxicidad del CaCl<sub>2</sub>

De igual manera que en el punto anterior, se analizó la citotoxicidad de la disolución polimerizadora del alginato, compuesta por CaCl<sub>2</sub>, debido a que las células en medio condicionado con los [hidrogeles + CaCl<sub>2</sub>] mostraron una viabilidad menor que en el caso de la agarosa sin CaCl<sub>2</sub>. Así pues, se realizaron tres experimentos, siguiendo la misma metodología, empleando diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub>. Finalmente, se consideró la media de los valores obtenidos en los tres estudios, como se observa en la figura 42.

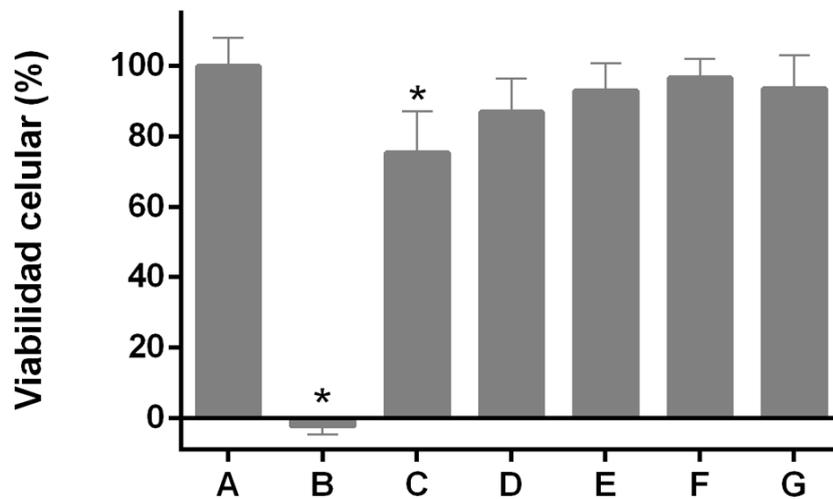


Figura 42. Viabilidad celular de hDPSC cuando han sido expuestas a medios con CaCl<sub>2</sub>, a las concentraciones A: medio control (control negativo); B: látex (control positivo); C: 10 %; D: 5 %; E: 2,50 %; F: 1,24 %, y G: 0,63 %. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \* $p \leq 0,05$  respecto al control negativo.

La figura 42 muestra una disminución significativa en la viabilidad de células madre de pulpa dental, respecto al control negativo, cuando estas fueron expuestas a medio con 10 % de CaCl<sub>2</sub> (C). En las diluciones menores al 10 % (D-G) no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo. Como cabía esperar, la citotoxicidad del medio condicionado con látex (B) fue máxima.

### 3. Cultivo de hDPSC en hidrogeles de alginato-agarosa con medio de proliferación o de diferenciación condrogénica

Una vez analizada la citotoxicidad de las sustancias que componían el hidrogel, se realizaron cultivos de células madre mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC) en ellos. Se siguió con el protocolo establecido en Material y Métodos, embebiendo las células en el hidrogel de alginato al 3 % y agarosa al 1 %. El cultivo celular se llevó a cabo durante diferentes tiempos: 3 días y 2, 4 y 6 semanas. Además, se realizó un estudio comparativo entre dos medios de cultivo diferentes, medio de proliferación (propio de las hDPSC) y medio de diferenciación condrogénica.

En este estudio se determinó la presencia y distribución de constituyentes tanto inespecíficos de las células (como la actina) como de otros específicos (agrecano y colágenos tipo I y tipo II).

El estudio se llevó a cabo con hDPSC, en pasajes entre 4 y 6, a una densidad de siembra de  $0,6 \times 10^6$  células en 300  $\mu\text{L}$  hidrogel. Las células se mantuvieron en cultivo durante un máximo de 6 semanas, obteniéndose diferentes muestras cultivadas con medio de proliferación o de diferenciación a tiempo inicial (inicio del cultivo celular), a los 3 días del inicio, y en las semanas pares (semanas 2, 4 y finalmente 6). Se realizaron cuatro experimentos diferentes, siguiendo el mismo protocolo y condiciones de estudio.

Pasado el tiempo correspondiente, las muestras se fijaron y se determinó mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos primarios específicos, la presencia de agrecano y de los colágenos tipo I y tipo II. Además, se marcaron los núcleos con DAPI y los filamentos de actina del citoplasma con el conjugado rodamina-faloidina.

3.1. Inmunofluorescencia

3.1.1. Tiempo cero y 3 días de cultivo en medio de cultivo de proliferación o de diferenciación condrogénica

Se observaron células aisladas o *single-cells* de morfología redondeada, con núcleo redondeado central, en las 3 condiciones estudiadas excepto en las muestras con medio de diferenciación condrogénica, en las que el núcleo era ligeramente excéntrico (figura 43).

La figura 43A-C muestra la ausencia de las sustancias analizadas en el momento posterior a la siembra de las células en el hidrogel (t=0).

A los 3 días de cultivo, tanto en medio de proliferación como de diferenciación condrogénica, tampoco se observó expresión de las proteínas analizadas (figura 43E-G, I-K).

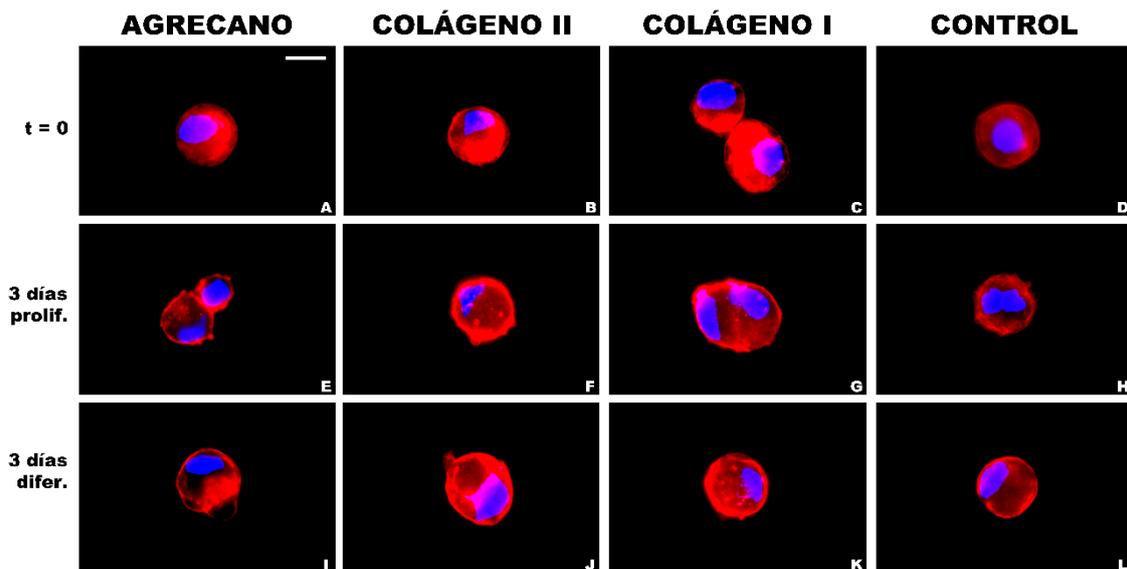


Figura 43. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en hidrogeles de alginato 3 %-agarosa 1 % a A-D: tiempo cero; E-H: 3 días con medio de proliferación, e I-L: 3 días con medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares, en rojo se muestra la distribución de filamentos de actina y en verde, la presencia de las proteínas analizadas que en este caso no se inmunodetectó ninguna de ellas. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

### 3.1.2. Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de proliferación

La figura 44 muestra las características de las células cultivadas durante 2, 4 y 6 semanas con medio de proliferación.

En todos los tiempos analizados, las células mostraron un aspecto esferoide, con una distribución homogénea de las fibras de actina por todo el citoplasma celular, otorgándolas redondez. El núcleo celular se mostró redondeado y excéntrico (figura 44D).

Por lo que respecta a la presencia de agregano no se detectó hasta la sexta semana en las muestras cultivadas en medio de proliferación (figura 44I). En estas muestras, se distinguió la presencia de este proteoglicano en el interior del citoplasma celular, con una distribución perinuclear.

La presencia de los colágenos tipo II y tipo I es más temprana, ya que se observaron a partir de las 4 semanas del cultivo celular con este mismo medio (figura 44F, J y G, K, respectivamente). Respecto al colágeno de tipo II, este se observó en células aisladas, de la misma manera que el agregano. Este colágeno se distribuye homogéneamente por el citoplasma de las células analizadas (figura 44F, J).

Por otro lado, la presencia de colágeno tipo I resultó evidente en las células que formaban agregados celulares en el hidrogel, también llamados organoides celulares. Este colágeno se distribuyó principalmente en las células de la zona central del organoide, más que en las localizadas en la zona periférica del mismo (figura 44G, K).

En ninguno de los casos anteriores se observó secreción de estas moléculas al exterior celular.

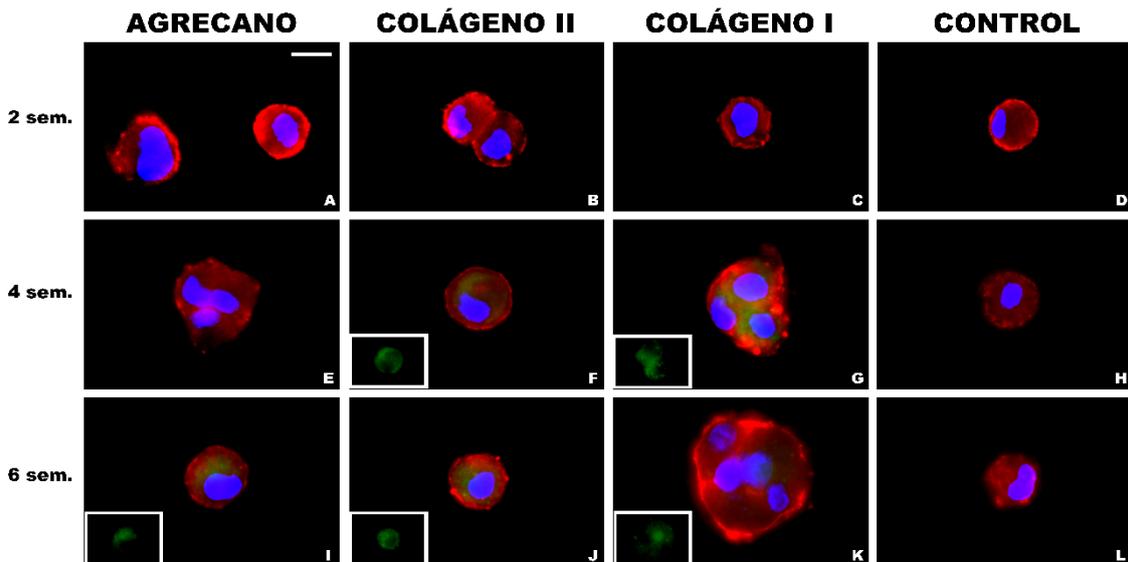


Figura 44. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en hidrogel de alginato 3 %-agarosa 1 % con medio de proliferación durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares, en rojo se muestra la distribución de filamentos de actina y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. En la esquina inferior izquierda de aquellas muestras en que se inmunodetectó alguna de las proteínas aparece la imagen correspondiente al canal verde, para facilitar su visualización. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

### 3.1.3. Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de diferenciación condrogénica

En contraposición a lo descrito anteriormente, cuando las células hDPSC se sembraron y cultivaron con medio de diferenciación condrogénica, el comportamiento de estas cambió, como se refleja en la figura 45.

Su morfología no distó de la de las muestras cultivadas en medio de proliferación, observándose un citoplasma redondeado, con distribución homogénea de las fibras de actina. Por lo que respecta al núcleo celular, este también se presentó redondeado, ligeramente aplanado en algunos casos y localizado de manera excéntrica (figura 45D).

En este caso, la presencia de las proteínas analizadas se observó a un tiempo más temprano. Por lo que respecta al agrecano, su síntesis fue progresiva ya que se detectó desde la segunda semana, hasta llegar a una producción importante en la última semana del estudio (figura 45A, E, I). De

igual manera a lo observado en las células cultivadas con medio de proliferación, este proteoglicano se localizó en el interior de las células.

La síntesis de colágeno tipo II fue evidente desde la segunda semana del cultivo celular (figura 45B). Como se observa en la figura 45F, la distribución de este colágeno fue homogénea por todas las células de los organoides formados en la semana 4. La presencia de colágeno tipo II, distribuyéndose por todo el citoplasma celular, se mantuvo en las muestras cultivadas durante 6 semanas (figura 45J).

Finalmente, la presencia de colágeno tipo I se hizo evidente a partir de la segunda semana de cultivo celular, y aumentó en organoides celulares observados en la semana 6, donde la síntesis de este colágeno fue muy importante (figura 45C, G, K). Además, en ocasiones se observó la presencia de colágeno tipo I en el espacio extracelular (figura 45G).

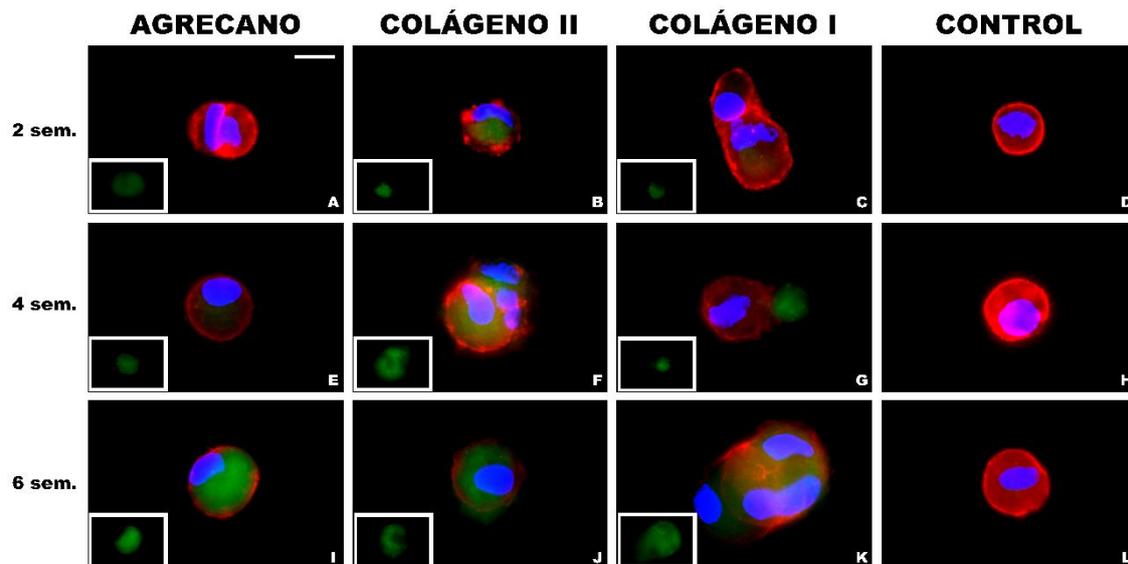


Figura 45. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en hidrogel de alginato 3 %-agarosa 1 % con medio de diferenciación condrogénica durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares, en rojo se muestra la distribución de filamentos de actina y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. En la esquina inferior izquierda de aquellas muestras en que se inmunodetectó alguna de las proteínas aparece la imagen correspondiente al canal verde, para facilitar su visualización. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

DISCUSIÓN: bloque 1

## 1. Estudios de citotoxicidad

En primer lugar, se analizó la posible citotoxicidad de los hidrogeles elaborados en el trabajo. Para ello, se prepararon los diferentes hidrogeles empleados y se condicionó medio de cultivo con ellos, durante 24 y 72 h y 7 días. Transcurridos estos tiempos, se llevó a cabo el ensayo de toxicidad sobre células pulpares.

Los medios condicionados durante 24 h con los hidrogeles no dieron diferencias respecto a las muestras control, salvo para el caso de aquel condicionado con alginato al 3 %, donde se observó una disminución de la viabilidad celular de en torno al 50 %.

A las 72 h de condicionamiento, se observó una disminución en la viabilidad de las hDPSC en todos los casos respecto al control, que fue aun mayor para el caso de los medios condicionados durante 7 días.

Los valores obtenidos fueron los esperados, es decir, a mayor tiempo de condicionamiento menor viabilidad celular. Una explicación razonable a esta observación es que los hidrogeles se van disolviendo con el tiempo, liberando sustancias al medio acuoso. A mayor tiempo de condicionamiento, mayor concentración de dichas sustancias en el medio de cultivo. Finalmente, al poner en contacto las células con estos medios con alta concentración de sustancias ajenas al medio de cultivo, es razonable que las células tengan una respuesta, en este caso, negativa (disminución de su viabilidad).

No obstante, cabe destacar que estos son resultados relacionados con cómo se realiza el estudio de citotoxicidad. En un cultivo habitual *in vitro*, donde el cambio de medio se realiza cada 2-3 días, la presencia de sustancias liberadas de los hidrogeles no llega a alcanzar concentraciones tan elevadas como las presentes en los medios condicionados durante 3 o 7 días. Considerando todo lo anterior, se puede afirmar que la presencia del hidrogel estudiado, alginato 3 %-agarosa 1 %, no afectó significativamente a la viabilidad celular (no se observaron diferencias con el medio condicionado durante 24 y 72 h con respecto al control). Se ha evaluado y contrastado en diferentes trabajos, como el de Koh *et al.*<sup>137</sup>, que el alginato *per se* no es citotóxico. No obstante, lo novedoso del estudio realizado en esta parte del

trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la toxicidad de diferentes porcentajes de alginato en el hidrogel y en conjunto con agarosa, algo, según nuestro conocimiento, no descrito anteriormente, destacando que los resultados obtenidos muestran que estos hidrogeles afectan poco a la viabilidad de las hDPSC.

Por otro lado, también se analizó la citotoxicidad del agente polimerizador del alginato ( $\text{CaCl}_2$ ), ya que se observó una disminución en la viabilidad celular a las 24 h de condicionamiento con el hidrogel compuesto por alginato solo combinado con el agente polimerizador. Se llevó a cabo el ensayo descrito en Material y Métodos, con concentraciones decrecientes de este agente polimerizador en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron una disminución del 20 % en la viabilidad de las hDPSC cuando estas se expusieron a medio con 10 % de  $\text{CaCl}_2$ . Cuando se emplearon concentraciones inferiores a la anterior no se observaron diferencias respecto al control sin agente polimerizador.

Como se ha explicado anteriormente, una alta concentración de  $\text{CaCl}_2$  puede llegar a afectar al cultivo, aunque de manera poco significativa. Además, cuando el alginato con el agente polimerizador se combinaron con la agarosa, este efecto negativo fue menor.

Así pues, para los siguientes experimentos se estableció el uso de alginato 3 %-agarosa 1 %, ya que a tiempos cortos de condicionamiento (24 y 72 h) estos componentes del hidrogel, así como la presencia de  $\text{CaCl}_2$ , no afectaron al cultivo celular.

## 2. Cultivo de hDPSC en hidrogel alginato 3 %-agarosa 1 %

Una vez analizada la citotoxicidad de las sustancias que componían el hidrogel, se realizaron cultivos de células madre mesenquimales de pulpa dental humana en ellos. El cultivo celular se llevó a cabo durante diferentes tiempos: 3 días y 2, 4 y 6 semanas, tanto con medio de proliferación como con medio de diferenciación condrogénica, ambos de la empresa Lonza.

El estudio se llevó a cabo con células mesenquimales de pulpa dental humana, a una densidad de siembra de  $6,0 \times 10^5$  células en 300  $\mu$ L de hidrogel alginato 3 %-agarosa 1 %. El cultivo duró hasta 6 semanas, obteniendo diferentes muestras, cultivadas en medio de proliferación o diferenciación, a tiempo inicial (inicio del cultivo celular), a los 3 días del inicio y a las semanas 2, 4 y 6. Se realizaron cuatro experimentos diferentes, siguiendo el mismo protocolo y condiciones de estudio.

Transcurrido el tiempo indicado, las muestras se fijaron y se estudiaron mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos que determinaron la presencia o ausencia de agregano y colágeno tipo II, proteínas características del tejido cartilaginoso hialino, y de colágeno tipo I, característico del cartílago fibroso y otros tejidos conjuntivos como el hueso o el tejido conjuntivo de la dermis. Además, se marcaron los núcleos con DAPI y los filamentos de actina del citoplasma con el conjugado rodamina-faloidina.

Al tiempo inicial de cultivo y a tiempos cortos del mismo, tanto en proliferación como en diferenciación, no se observó la presencia de agregano ni de los colágenos tipo I y II en las muestras. Este resultado puede atribuirse a que a estos tiempos de cultivo las hDPSC se mantenían indiferenciadas, como cabría esperar.

No obstante, a tiempos de cultivo más largos, sí se detectaron diferencias entre las muestras, tanto entre las de los diferentes tiempos estudiados como entre las cultivadas en los diferentes medios de cultivo (proliferación y diferenciación condrogénica).

A las dos semanas de cultivo con medio de proliferación, no se observó presencia de las proteínas analizadas. Por el contrario, las células cultivadas

con medio de diferenciación condrogénica ya mostraron a este tiempo de cultivo expresión intracelular de los dos tipos de colágeno y, en menor medida, de agrecano.

Con respecto a las muestras mantenidas cuatro semanas en cultivo, aquellas mantenidas en medio de proliferación mostraron la síntesis de los colágenos de tipo II y I, sobre todo en agrupaciones o *clusters* celulares, mientras que en las muestras cultivadas con medio de diferenciación se intensificó la síntesis de las tres proteínas. Además, en estas últimas muestras se pudo observar la presencia de colágeno tipo I no solo intracelularmente, sino también en el exterior celular.

Finalmente, a las 6 semanas de cultivo, las muestras mantenidas en medio de proliferación mostraron la presencia de las 3 proteínas analizadas; de la misma manera que en el caso anterior, sobre todo se observaron en agrupaciones celulares. Por lo que respecta a las muestras mantenidas en medio de diferenciación condrogénica, la presencia de estas moléculas fue muy importante, tanto dentro de células aisladas como en el interior de agrupaciones celulares.

Los resultados obtenidos mostraron que a tiempos de cultivo cortos hay diferencias entre los dos medios de cultivo en la síntesis de las proteínas analizadas. Sin embargo, estas diferencias se atenúan en los tiempos de cultivo más largos. Este hecho indicaría que el medio de diferenciación condrogénica aceleró la síntesis de proteínas características del cartílago, es decir, indujo la diferenciación condrogénica de las hDPSC, lo que coincide con otros estudios<sup>92-95,138</sup>. No obstante, por lo que se ha observado, el hecho de que las células estuvieran embebidas en un hidrogel, con propiedades descritas parecidas a la matriz extracelular del cartílago hialino<sup>49,79,81</sup>, también favoreció la síntesis de estas moléculas y, por consiguiente, la diferenciación condrogénica de las células<sup>49,75</sup>. Rogan *et al.* demostraron que células madre mesenquimales embebidas en hidrogel muestran una diferenciación más potente hacia células condrales, formando una matriz condral de mayor robustez y de mejores propiedades mecánicas<sup>139</sup>.

También nuestro grupo, en estudios previos, ha descrito una síntesis importante de agrecano y de colágeno tipo II por células pulpares embebidas en un gel de alginato, cultivadas durante 6 semanas con medio de diferenciación condrogénica<sup>140</sup>.

Por otra parte, la síntesis de colágeno tipo I es un indicador de formación de fibrocartílago, con propiedades no deseadas, diferentes a las del cartílago hialino. La formación de una matriz similar a la del fibrocartílago, observada en las muestras tanto cultivadas tanto con medio de proliferación como como de diferenciación condrogénica, ha sido descrita anteriormente en la literatura<sup>141</sup>.

Por lo que respecta a la morfología de los núcleos celulares, fue en las muestras con medio de diferenciación condrogénica donde se observaron sobre todo aplanados y dispuestos de manera excéntrica en el citoplasma. Por el contrario, solo en la sexta semana de cultivo se observaron de esta manera en las células mantenidas en medio de proliferación, mientras que en cultivos a tiempos más cortos en este medio los núcleos se observaron redondeados y centrados.

La disposición y morfología del núcleo celular, pues, puede correlacionarse con la capacidad de síntesis proteica de las hDPSC. Los núcleos se aplanaron y se situaron en la zona periférica del citoplasma cuando las células se diferenciaban hacia la estirpe condral, mientras que se mantuvieron centrados y redondeados en aquellas células más indiferenciadas en que la síntesis de proteínas de la matriz cartilaginosa era más baja<sup>142</sup>.

Por último, la morfología de las células se delimitó mediante el marcaje fluorescente de los filamentos de actina del citoplasma. No se apreciaron diferencias entre las diferentes condiciones de cultivo, ya que en todos los casos los citoplasmas se mostraron redondeados, probablemente debido a que las células se encontraban embebidas completamente en el hidrogel<sup>140</sup>.

RESULTADOS: bloque 2

## 1. Cultivo de microtejidos de hDPSC con medio de proliferación o de diferenciación condrogénica

De manera paralela al estudio de las células cultivadas en hidrogeles, se elaboraron microtejidos que se estudiaron a los mismos tiempos de cultivo que las células en hidrogeles, analizando el comportamiento de las células organizadas en forma de organoide o microtejido cuando se cultivaron en medio de proliferación o medio de diferenciación condrogénica. En este estudio se determinó cómo afectaba el contacto célula-célula a las propiedades celulares, en contraposición a la situación del apartado anterior, en la que las células se habían embebido homogéneamente en el hidrogel, sin que se favoreciese el contacto directo entre ellas.

Así pues, se elaboraron microtejidos de  $0,6 \times 10^6$  células, en pase 4 a 6, en pocillos de agarosa, siguiendo la metodología descrita en Material y Métodos. Al tercer día desde la siembra, y con el microtejido ya formado, se sustituyó el medio de cultivo por nuevo medio de proliferación o se cambió por medio de diferenciación condrogénica, momento que se consideró inicio del tratamiento ( $t=0$ ).

De la misma manera que en el apartado anterior, los puntos temporales analizados fueron 3 días y 2, 4 y 6 semanas, tomándose como control muestras a tiempo cero. Una vez terminó el periodo de cultivo correspondiente a cada punto experimental, las muestras se fijaron y se incluyeron en parafina, obteniéndose cortes de  $3 \mu\text{m}$  con los que se realizó el estudio histológico.

Por una parte, las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina, a fin de estudiar las características estructurales del microtejido formado. Por otra, se determinó mediante inmunofluorescencia la presencia de las mismas proteínas estudiadas en el apartado anterior: agrecano y colágenos tipo I y tipo II.

## 1.1. Tinción de H-E

### 1.1.1. Tiempo cero y 3 días de cultivo en medio de proliferación o de diferenciación condrogénica

A tiempo cero, las muestras mostraron un aspecto de organoide todavía no formado, con células cercanas entre sí en la superficie del microtejido y con espacio entre ellas en el interior de este (figura 46A). A mayor aumento, se apreció que las células tenían una morfología fusiforme, con núcleo grande, redondeado y centrado (figura 46D).

A los 3 días en medio de proliferación, se observó que el microtejido se había formado completamente, con distribución homogénea y compacta de las células por todo el organoide celular, con pocos espacios entre ellas (figura 46B). En las muestras observadas a 63x se observó escaso espacio entre células (figura 46E), siendo los núcleos de las células redondeados.

Finalmente, las muestras cultivadas durante 3 días en medio de diferenciación condrogénica mostraron un comportamiento diferente al anterior. En este caso, el microtejido mostró células unidas entre sí solamente en la zona periférica (corteza de unos 100  $\mu\text{m}$  de espesor), mientras que en la zona central del organoide se distinguieron células aisladas (figura 46C). De igual manera que en el caso de las muestras en proliferación, la zona externa de este microtejido mostró células con los citoplasmas próximos entre ellos, observándose también núcleos redondeados (figura 46F).

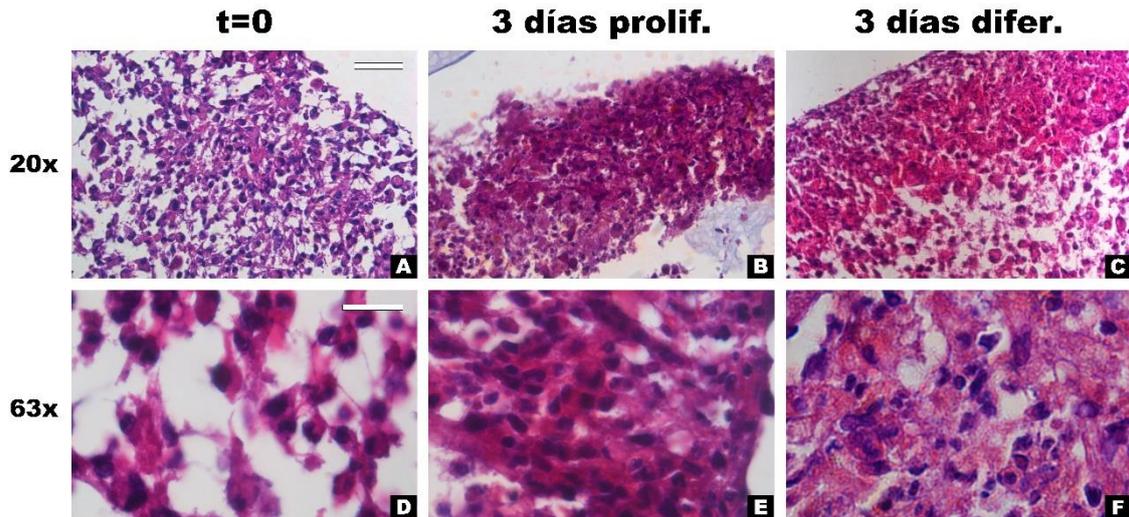


Figura 46. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido, teñidas con hematoxilina-eosina, a A y D: tiempo cero; B y E: 3 días con medio de proliferación, y C y F: 3 días con medio de diferenciación condrogénica. Barras de escala = A-C: 50  $\mu\text{m}$ , y D-F: 20  $\mu\text{m}$ .

#### 1.1.2. Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de proliferación o de diferenciación condrogénica

A las 2 semanas de cultivo no se observaron diferencias morfológicas entre los microtejidos, tanto con medio de proliferación o de diferenciación condrogénica (figura 47A, D). En ambos casos las células se dispusieron homogéneamente compactas por todo el organoide celular, sin espacios entre ellas tanto en la zona periférica como en el centro.

Las diferencias se observaron a partir de la cuarta semana, en la que las muestras en proliferación mostraron la presencia de células solo en la zona cortical del microtejido, mientras que en la zona central había escasa celularidad y abundante matriz extracelular (figura 47B, C).

Por el contrario, las muestras en diferenciación condrogénica cultivadas durante 4 y 6 semanas no se diferenciaron de las que se cultivaron durante 2 semanas con este mismo medio. Es decir, en todas las muestras se observaron células homogéneamente distribuidas por todo el microtejido, con citoplasmas celulares contactando y sin apenas espacios entre ellas (figura 47E, F).

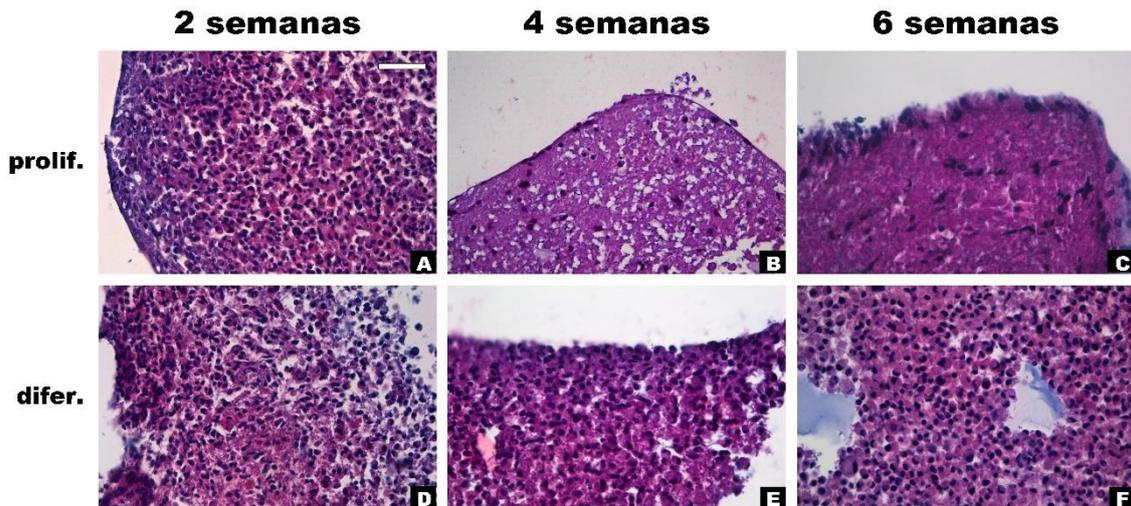


Figura 47. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido, teñidas con hematoxilina-eosina, o a A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas, y C y F: 6 semanas. Los medios de cultivo empleados fueron A-C: proliferación, y D-F: diferenciación condrogénica. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

En las imágenes a mayor aumento (figura 48), se pudo estudiar la morfología celular con más detalle.

Las muestras en proliferación mostraron núcleos redondeados a 2 semanas de cultivo (figura 48A). A partir de las 4 semanas las células se dispusieron mayoritariamente en hilera en la corteza del microtejido, mostrando una morfología aplanada (figura 48B, C). Por otro lado, las células situadas en la zona más cortical del microtejido presentaron un citoplasma basófilo, mientras que el de las escasas células interna y la matriz extracelular en el interior del microtejido mostraron eosinofilia.

En las muestras mantenidas en diferenciación condrogénica, los núcleos celulares también se distinguieron redondeados en las primeras 4 semanas de cultivo (figura 48D, E). Por el contrario, en la sexta semana se observaron núcleos menos redondeados, ligeramente aplanados y curvos, dispuestos de manera excéntrica (figura 48F). En general, las células presentaron un citoplasma eosinófilo por todo el organoide en todos los tiempos estudiados; sin embargo, se encontraron escasas células con citoplasma basófilo en la zona cortical de este.

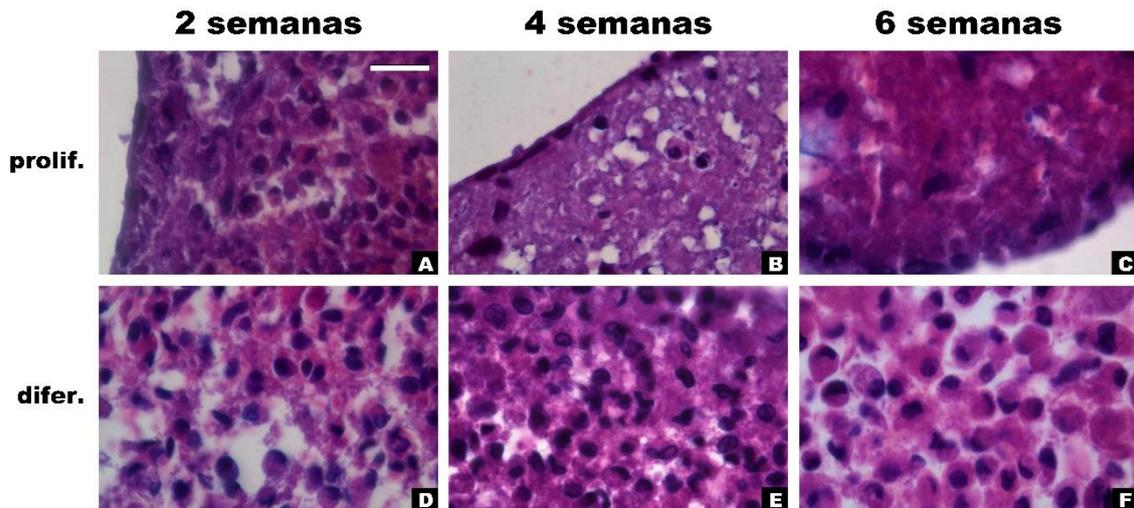


Figura 48. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido, teñidas con hematoxilina-eosina, a A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas, y C y F: 6 semanas. Los medios de cultivo empleados fueron A-C: proliferación, y D-F: diferenciación condrogénica. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

## 1.2. Densidad celular en los microtejidos

Con las muestras ya teñidas, se procedió a realizar un recuento celular en los microtejidos a los diferentes tiempos de estudio mediante el recuento de sus núcleos teñidos con hematoxilina en todo el microtejido. Los valores obtenidos por  $\text{mm}^2$  se muestran en la figura 49, especificando si se dieron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las diferentes condiciones. Este parámetro proporciona información del comportamiento proliferativo de las células o de la muerte celular en las diversas condiciones.

Las muestras a tiempo inicial o tiempo cero del estudio mostraron una densidad de  $9,4 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ . A los 3 días de cultivo en medio de proliferación y de diferenciación condrogénica, la densidad fue de 12,8 y  $12,2 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ , respectivamente, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones.

En los microtejidos a 2 semanas de cultivo en medio de proliferación se observó un aumento a  $14,1 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ , mientras que en las muestras cultivadas con diferenciación la densidad fue de  $10,5 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ , siendo estadísticamente significativas las diferencias entre ambas condiciones.

Por lo que respecta al estudio a 4 semanas, la densidad en las muestras en proliferación descendió a  $2,9 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup>. Por el contrario, los microtejidos cultivados con diferenciación condrogénica alcanzaron valores de  $11,6 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup>. De la misma manera que en el caso anterior, se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones.

Finalmente, las muestras mantenidas durante 6 semanas en cultivo en medio de proliferación mostraron valores de  $4,6 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup>, mientras que en las muestras cultivadas con medio de diferenciación la densidad fue de  $12,1 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup>. Como en el caso anterior, la diferencia entre ambas condiciones fue estadísticamente significativa.

Cabe indicar que se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos de las muestras a 3 días y 2, 4 y 6 semanas de cultivo, en ambos medios de cultivo, respecto a las muestras a tiempo cero.

Por lo que respecta a la evolución temporal de las muestras en medio de proliferación celular, se observó una disminución significativa en la densidad celular durante la cuarta y sexta semana de cultivo respecto a las muestras de 3 días y 2 semanas, no observándose diferencias significativas entre estas dos últimas.

Por último, los microtejidos mantenidos en medio de diferenciación condrogénica mantuvieron una densidad celular estable, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de cultivo celular.

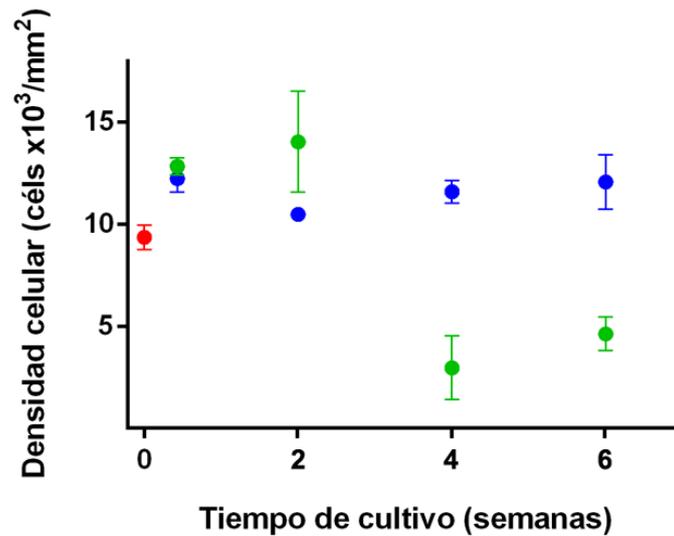


Figura 49. Densidad celular en los microtejidos en los diferentes tiempos (rojo: control a  $t = 0$ ) y medios de cultivo analizados (verde: proliferación; azul: diferenciación condrogénica). Promedio  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente significativas (ANOVA one-way,  $p \leq 0,05$ ) en las muestras a 3 días y 2, 4 y 6 semanas respecto al tiempo cero y entre ambos medios de cultivo en las muestras de 2, 4 y 6 semanas.

### 1.3. Inmunofluorescencia

#### 1.3.1. Tiempo cero y 3 días de cultivo en medio de proliferación o de diferenciación condrogénica

En las muestras correspondientes a los tiempos cero y 3 días de cultivo, en ambos medios de cultivo, analizadas mediante inmunofluorescencia, no se observó la presencia de agregano ni de los colágenos tipo I y tipo II en ninguna zona (periférica o central) de los microtejidos (figura 50).

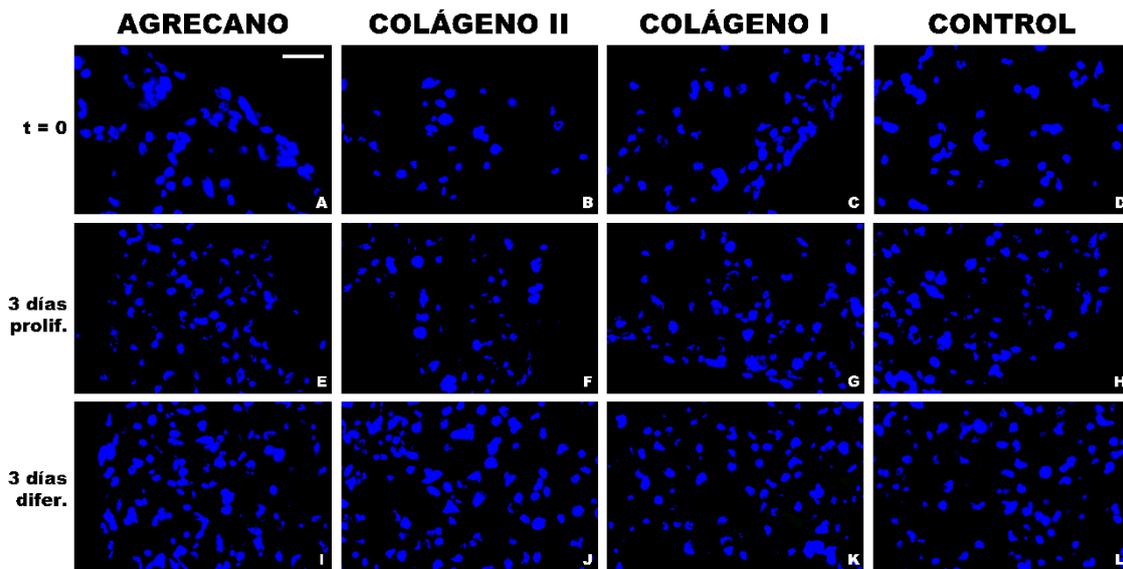


Figura 50. Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo de hDPSC en forma de microtejido a A-D: tiempo cero; E-H: 3 días en medio de proliferación, e I-L: 3 días en medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

### 1.3.2. Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de proliferación

En los cultivos celulares con medio de proliferación no se observó la presencia de agrecano hasta la cuarta semana, en la que se apreciaron regiones pequeñas de expresión, limitadas al entorno de algunos núcleos celulares de las muestras. Fue a partir de la sexta semana en la que la expresión de agrecano aumentó. Además, la expresión variaba notablemente entre las diferentes regiones del microtejido formado, siendo especialmente alta en la zona interna de este (figura 51A, E, I).

La formación de colágeno de tipo II se desencadenó a partir de la cuarta semana, observándose significativamente aumentado en la semana 6 (figura 51B, F, J). Mientras que en el primer caso se observaba sobre todo alrededor de los núcleos celulares, a las 6 semanas se distinguió distribuido de manera homogénea por todo el microtejido, formando una matriz compacta sobre todo en la zona interna (figura 51J).

Finalmente, por lo que respecta al colágeno de tipo I, a las 4 semanas se empezó a observar marcaje intracelular en las zonas contiguas a los núcleos,

mientras que a las 6 semanas se distribuyó por todo el microtejido formando parte, como en el caso del colágeno de tipo II, de la matriz extracelular (figura 51C, G, K).

Coincidiendo con la distribución celular observada en el estudio con H-E, a partir de la cuarta semana empezó a disminuir el número de células en la zona central de los microtejidos (figura 51E-H), observándose claramente a partir de la sexta semana, en la que los núcleos celulares se aplanaron y se mantuvieron casi exclusivamente en la superficie del microtejido (figura 51I-L). Además, se observó claramente la matriz extracelular formada en todo el microtejido.

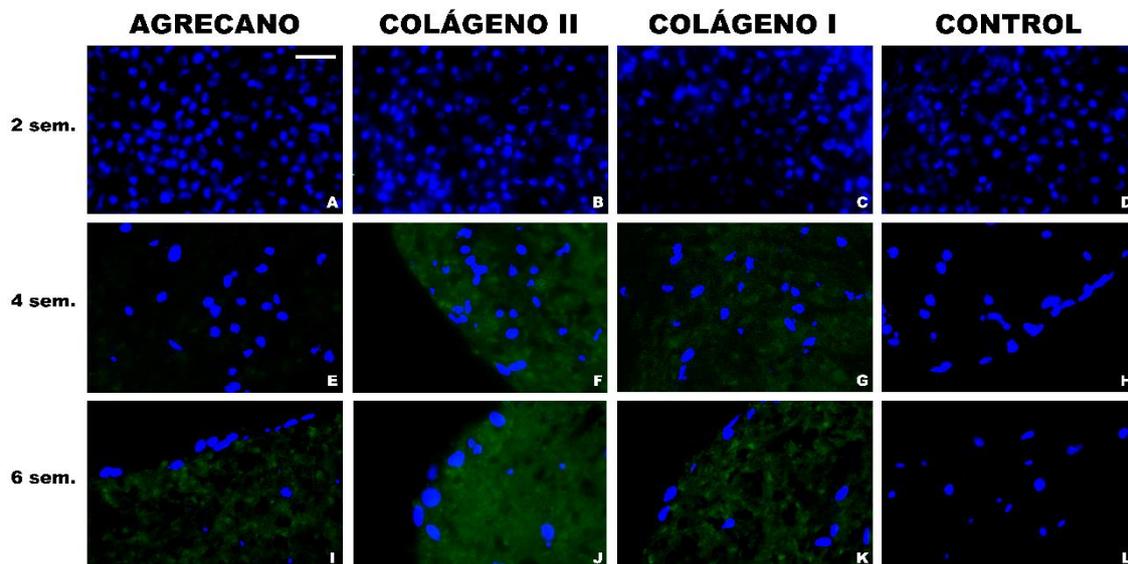


Figura 51. Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo de hDPSC en forma de microtejido con medio de proliferación a A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Para resaltar la emisión de fluorescencia en la longitud de onda del color verde, el canal verde de las imágenes de modificó mediante el programa PhotoShop: E y G (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y F (saturación +100 % y luminosidad +25 %). La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

### 1.3.3. Cultivo durante 2, 4 y 6 semanas en medio de diferenciación condrogénica

En el caso del cultivo en medio de diferenciación condrogénica, la síntesis de agrecano se observó a partir de la segunda semana del estudio, intensificándose a lo largo de las semanas, llegando a ser significativa a las

6 semanas (figura 52A, E, I). A partir de la cuarta semana de cultivo, este proteoglicano se observó distribuido extracelularmente por el microtejido.

La presencia de colágeno de tipo II se observó a partir de la semana 4 del estudio, intensificándose por todo el microtejido a la sexta semana (figura 52B, F, J). De igual manera que el agregano, esta proteína se observó por la matriz extracelular del microtejido.

Finalmente, el colágeno de tipo I también se detectó, levemente, a partir de la segunda semana, sobre todo alrededor de los núcleos celulares, aumentando ligeramente su síntesis con el tiempo (figura 52C, G, K). A las 4 y 6 semanas la presencia de esta proteína fue bastante similar, manteniendo una baja expresión, disponiéndose sobre todo cercana a los núcleos celulares.

Además, corroborando los estudios descritos en un apartado anterior, la visualización de los núcleos, de morfología redondeada, indicó que las células estaban distribuidas homogéneamente por todo el microtejido.

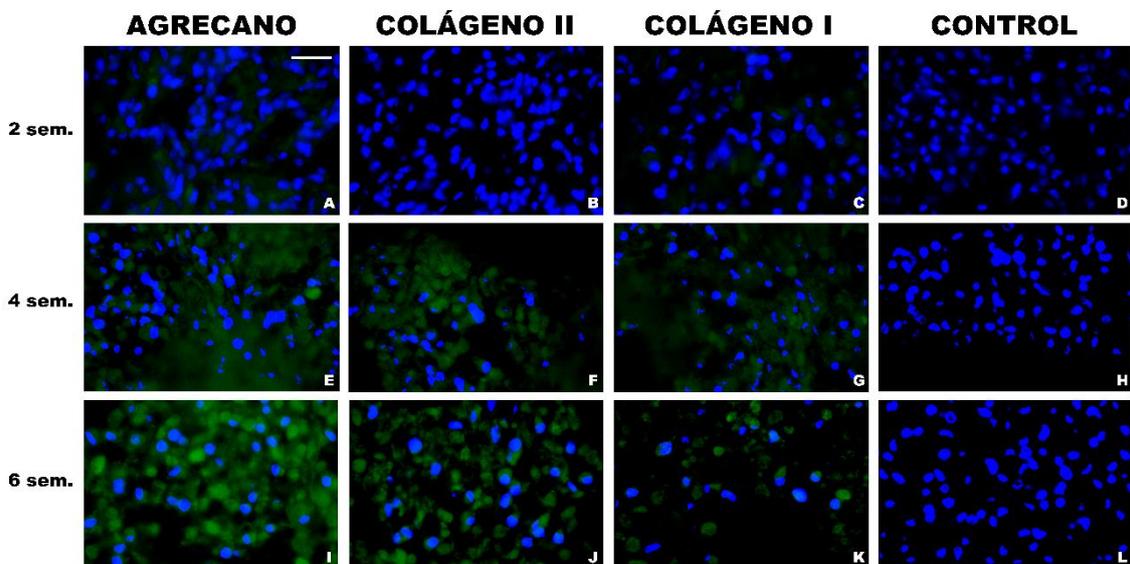


Figura 52. Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo de hDPSC en forma de microtejido con medio de diferenciación condrogénica a A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En azul se observan los núcleos celulares y en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Para resaltar la emisión de fluorescencia en la longitud de onda del color verde, el canal verde de las imágenes de modificó mediante el programa PhotoShop: A y C (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y E-G (saturación +100 % y luminosidad. +25 %). La columna control corresponde a muestras incubadas con el anticuerpo secundario solamente. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

DISCUSIÓN: bloque 2

## 1. Cultivo de microtejidos de hDPSC

Se elaboraron microtejidos de hDPSC y se siguió el mismo esquema temporal que en los cultivos del bloque primero (cultivo de hDPSC en hidrogel), analizando el comportamiento de las células cultivadas en microtejidos con medios de proliferación y de diferenciación condrogénica de la empresa Lonza. En estos experimentos se estudió cómo afectaba el contacto célula-célula respecto a la situación del bloque anterior, en el que las células se embebieron homogéneamente en el hidrogel, sin contacto directo entre ellas.

Así pues, se elaboraron microtejidos de  $0,6 \times 10^6$  células. Al tercer día desde la siembra, y con el microtejido formado, se continuó el cultivo con nuevo medio de proliferación o se sustituyó por medio de diferenciación condrogénica, considerándose este el punto temporal de inicio del estudio.

Los puntos temporales analizados fueron 3 días y 2, 4 y 6 semanas. También se tomaron como control muestras a tiempo cero, es decir, en el momento previo al inicio del estudio. Una vez finalizado cada punto experimental, las muestras se fijaron y se incluyeron en parafina, obteniéndose secciones de 3  $\mu\text{m}$  de grosor con los que se realizó el estudio histológico.

Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina con tal de estudiar la morfología estructural del microtejido formado. Además, se realizaron inmunofluorescencias, analizando la presencia de proteínas presentes en la matriz extracelular, como son el agregano y los colágenos tipo I y II.

### 1.1. Características histológicas y recuento celular

Al inicio del estudio se observó que el microtejido todavía no se había formado completamente, apreciándose espacios entre algunos grupos de células. No obstante, tras 3 días de cultivo en medio de proliferación, los organoides ya se encontraban formados, sin apenas espacios libres entre las células.

Por lo que respecta a aquellas cultivadas con medio de diferenciación condrogénica, mostraron un aspecto diferente a las anteriores. En este caso, las células dispuestas en la zona periférica del microtejido se observaron

próximas entre sí, sin espacios entre ellas, mientras que las situadas en la zona central del mismo se observaron ligeramente dispersas, sin uniones claras entre ellas y con espacios libres.

A las 2 semanas de cultivo, y con ambos medios de cultivo, los microtejidos se observaron completamente formados, sin diferencias entre los dos grupos de muestras. Fue a partir de la cuarta semana donde aparecieron diferencias entre las muestras cultivadas con uno u otro medio de cultivo. Por lo que respecta a los cultivos con medio de diferenciación condrogénica, las muestras mantuvieron su morfología, sin cambios aparentes. Sin embargo, en las muestras cultivadas con medio de proliferación durante 4 semanas se observaron células nucleadas sobre todo en la zona superficial, cortical, del microtejido y otras dispuestas de manera aislada, dispersas, por el centro. Esta misma distribución se observó en las células cultivadas durante 6 semanas.

Para analizar la densidad de células nucleadas en los microtejidos se realizó un recuento de los núcleos teñidos en las muestras de todos los tiempos de estudio y con ambos medios de cultivo.

A los 3 días desde el inicio del estudio, los microtejidos de ambos grupos experimentales presentaron el mismo aumento en la densidad celular con respecto a tiempo cero. Esta densidad celular no varió significativamente entre las muestras cultivadas con medio de diferenciación condrogénica comparado con aquellas cultivadas con medio de proliferación. De hecho, estas muestras en proliferación celular mostraron una disminución importante en el número de células a partir de la cuarta semana de cultivo.

Esta disminución de la densidad celular en los microtejidos cultivados con medio de proliferación pudo deberse a que el microtejido aumentó considerablemente su tamaño, es decir, hubo un posible incremento en la tasa de proliferación durante las semanas 2 y 3 de cultivo, dificultando la difusión de nutrientes al interior de este y produciendo la necrosis del núcleo del organoide<sup>143,144</sup>.

Cuando se observaron los microtejidos con más detalle (objetivo de 63 aumentos) se pudo apreciar tanto la morfología del núcleo celular como también los límites de los citoplasmas. En las muestras con medio de

proliferación a 2 semanas de cultivo, los núcleos tenían una morfología redondeada, mientras que, a partir de la cuarta semana, las células presentaron un núcleo ligeramente aplanado y excéntrico. El citoplasma se observó generalmente basófilo, lo que sugiere una mayor cantidad de ARN ribosomal y por tanto un incremento en la actividad de síntesis de proteínas, en aquellas células dispuestas por la cortical del microtejido, mientras que las células dispuestas por el interior de este mostraron un aspecto ligeramente eosinófilo.

En las muestras con medio de diferenciación condrogénica la redondez de los núcleos celulares se mantuvo durante las 4 primeras semanas de cultivo, observándose ligeramente aplanados y dispuestos cercanos a la membrana citoplasmática en la sexta semana de cultivo. En todos los puntos temporales, estas muestras presentaron un citoplasma bastante eosinófilo en las células dispuestas en todo el organoide, con algunos citoplasmas ligeramente basófilos en la zona más superficial del mismo.

Es conocido que las características y el aspecto del citoplasma de las células varían según el estado funcional de las mismas<sup>142,145</sup>. En el caso de las células condrales del cartílago hialino, su citoplasma se observa basófilo y con núcleo parcialmente aplanado y excéntrico en aquellos condroblastos recién diferenciados, localizados en la zona externa del cartílago, los cuales sintetizan activamente componentes de la matriz extracelular. Por el contrario, las células más envejecidas o con menor actividad de síntesis se muestran con citoplasmas eosinófilos y núcleos redondeados y ligeramente centrados.

Por lo que respecta a las muestras estudiadas en este bloque experimental, se podría decir que las hDPSC mantenidas en medio de proliferación, a partir de la cuarta semana mostraron la morfología característica de los condrocitos en estado activo o de síntesis proteica estando en la zona cortical del microtejido, mientras que las dispuestas por el interior de este, más eosinófilas, mostraron un aspecto menos activo.

En las muestras cultivadas en medio de diferenciación condrogénica esta distinción funcional no fue tan clara, ya que la mayor parte de las células

fueron eosinófilas, y solo algunas células más superficiales mostraron cierta basofilia citoplasmática.

## 1.2. Inmunofluorescencia

Por lo que respecta a la técnica de inmunodetección de proteínas empleada, se observó que, como era de esperar, no se había producido síntesis de las moléculas analizadas en las muestras en los tiempos iniciales (tiempo cero y 3 días de cultivo, con ambos medios de cultivo).

A las 2 semanas de cultivo, en las muestras con medio de proliferación no se observó síntesis de agregano ni de los dos tipos de colágeno analizados. Fue a partir de la cuarta semana cuando se detectó su presencia. En el caso de la producción de agregano, esta se fue intensificando de la cuarta a la sexta semana de cultivo, observándose lo mismo en el caso del colágeno tipo II. Por el contrario, el colágeno tipo I se mostró bastante uniforme entre estos dos tiempos analizados.

En el otro grupo experimental, las muestras cultivadas con el medio de diferenciación condrogénica mostraron síntesis de agregano ya a partir de la segunda semana, intensificándose con el tiempo. Por lo que respecta a la producción de colágeno tipo II, se observó a partir de la cuarta semana, siendo bastante intensa en la semana 6 de cultivo celular. Finalmente, el colágeno tipo I se observó desde la segunda semana, de forma tenue, aumentando ligeramente con el tiempo, pero manteniendo un nivel de expresión bajo a las 6 semanas de cultivo.

Tanto en las muestras mantenidas en medio de proliferación como en medio de diferenciación condrogénica, las proteínas sintetizadas se localizaron homogéneamente en la matriz extracelular del microtejido. En otras palabras, las células consiguieron sintetizar matriz extracelular similar a la del cartílago hialino<sup>145</sup>. Cabe destacar que esta síntesis extracelular confirió una matriz más densa en el caso de las muestras cultivadas con medio de proliferación, donde no se observaron células en el centro del microtejido, pudiéndose deber a una

posible necrosis celular por la dificultad de difusión de nutrientes a las células<sup>143,146</sup>.

Por lo que respecta a la disposición de los núcleos celulares, se corroboró lo observado anteriormente en las muestras teñidas con hematoxilina-eosina. Se observó una baja densidad celular en las muestras en medio de proliferación a partir de la cuarta semana de cultivo, mientras que en las muestras cultivadas con medio de diferenciación condrogénica la densidad celular no varió entre las semanas de cultivo 4 y 6.

En definitiva, el uso de medio de cultivo de diferenciación condrogénica aceleró el proceso de síntesis de agregano y de colágeno tipo I, pero la formación de matriz extracelular con estas proteínas se intensificó en las muestras con medio de proliferación, donde las proteínas estudiadas se observaron homogéneamente por todo el microtejido. La síntesis de colágeno tipo I se vio reducida en ambos medios de cultivo comparada con la del colágeno de tipo II, un indicador de formación de matriz de cartílago hialino<sup>147</sup>.

La presencia de colágeno tipo I es un problema habitual en los estudios de diferenciación condrogénica de MSC<sup>140</sup>. Así, Zhang *et al.* demostró que la formación de microtejidos o micromasas de células madre de médula ósea inducía la síntesis de agregano y colágeno tipo II<sup>147</sup>, reduciendo la formación de colágeno tipo I.

Es sabido que el contacto célula-célula de hDPSC favorece la síntesis de proteínas características de la matriz condral, que se disponen de manera homogénea por toda la matriz extracelular<sup>139,143</sup>. Esta síntesis de componentes propios de la matriz hialina, como el agregano y el colágeno tipo II, permite la formación de una matriz extracelular robusta y viscoelástica, con distribución homogénea de estas proteínas, permitiendo una reparación óptima de lesiones condrales en modelos experimentales *in vivo*<sup>147</sup>.

DISCUSIÓN: interbloques 1 y 2

En los cultivos de hDPSC embebidas en hidrogeles de alginato 3 %-agarosa 1 % se observó la síntesis temprana de proteínas como el colágeno tipo I y tipo II y del proteoglicano agregano en aquellas muestras cultivadas con medio de diferenciación condrogénica. Esta formación proteica se fue intensificando a lo largo de las semanas, llegando a su secreción al exterior citoplasmático, aunque en menor medida. En el caso de las muestras cultivadas con medio de proliferación, también mostraron síntesis de las proteínas analizadas, pero a partir de las 4 semanas de cultivo, sobre todo en agrupaciones o *clusters* celulares. Esta última observación puede indicar que, aunque el tipo de medio de cultivo es importante para inducir la síntesis de proteínas de la matriz condral, también lo es el ambiente tridimensional donde las células están, como por ejemplo embebidas en un hidrogel<sup>133,148</sup>. Así pues, el cultivo de células pulpares en hidrogeles, como es el alginato 3 %-agarosa 1 %, proporcionó resultados positivos en este estudio, aunque a tiempos de cultivo más largos que en el caso de las células cultivadas en microtejidos.

Por otro lado, en el cultivo de las células en modo organoide o microtejido celular se produjo la síntesis y secreción de agregano y colágeno tipo II, y en menor medida de colágeno tipo I, tanto con medio de diferenciación condrogénica (a partir de tiempos de cultivo más cortos) como de proliferación. El contacto directo célula-célula, pues, indujo la producción de proteínas características de la matriz condral, obteniendo mejores resultados que con el cultivo en hidrogel, lo que coincide con los resultados de otros estudios<sup>149-152</sup>.

Torras *et al.* mantienen que las células pluripotenciales, en este caso las hDPSC, tienen una alta capacidad de organización intrínseca cuando se cultivan en modo organoide o microtejido, estando esta capacidad relacionada con diferentes funciones, como es la de síntesis de matriz extracelular, entre otras<sup>153</sup>. Y es que muchos estudios apuestan por la microfabricación de organoides, creando tejidos organomiméticos<sup>154</sup>, los cuales, en definitiva, permiten mejorar las funciones de los tejidos nativos donde se implantarán.

Así pues, comparando los resultados obtenidos en los dos procedimientos de cultivo estudiados (cultivo de hDPSC en hidrogeles y en

forma de microtejido, con medios de proliferación y de diferenciación condrogénica), finalmente se optó por el uso de los microtejidos con medio de diferenciación condrogénica para el siguiente estudio de estimulación de hDPSC mediante campos electromagnéticos y fuerzas mecánicas (bloque 3). Esta elección se llevó a cabo considerando la alta capacidad de los microtejidos para la síntesis de proteínas características de la matriz extracelular condral hialina comparada con aquella producida por las células en los hidrogeles.

Además, se observó que el medio de diferenciación condrogénica utilizado, de la empresa Lonza, promovió la síntesis temprana de estas proteínas, sobre todo de agregano y colágeno tipo II, manteniendo, además, estable la arquitectura de los microtejidos respecto al uso de medio de proliferación celular. A esta conclusión llegaron también Meyer-Wagner *et al.*, donde sus células, cultivadas en modo de organoide, expuestas a campos electromagnéticos (EMF) y cultivadas con medio de diferenciación condrogénica mostraron mayor expresión de genes característicos de las estirpes condrogénicas que aquellas células expuestas a EMF, pero cultivadas en medio de expansión celular<sup>155</sup>.

RESULTADOS: bloque 3

## 1. Obtención y validación del EMF generado

### 1.1. Obtención y estudio

Como ya se ha explicado en el apartado de Material y Métodos, el dispositivo desarrollado funciona alimentando alternativamente las bobinas de cada uno de los dos módulos. La figura 20 muestra la representación teórica de la distribución de las curvas de flujo electromagnético entre los polos cuando solo las bobinas del módulo superior estaban activadas.

La figura 53 muestra la densidad de flujo magnético en la zona de trabajo. La línea roja (línea 3 en la figura 53) y la verde (línea 2) muestran la distribución de flujo magnético en el centro (horizontal) y a 15 mm de distancia de este, respectivamente. La línea morada (línea 1) muestra la densidad medida a 30 mm del centro (fuera de la zona de operación). El eje de abscisas se refiere al “gap” vertical.

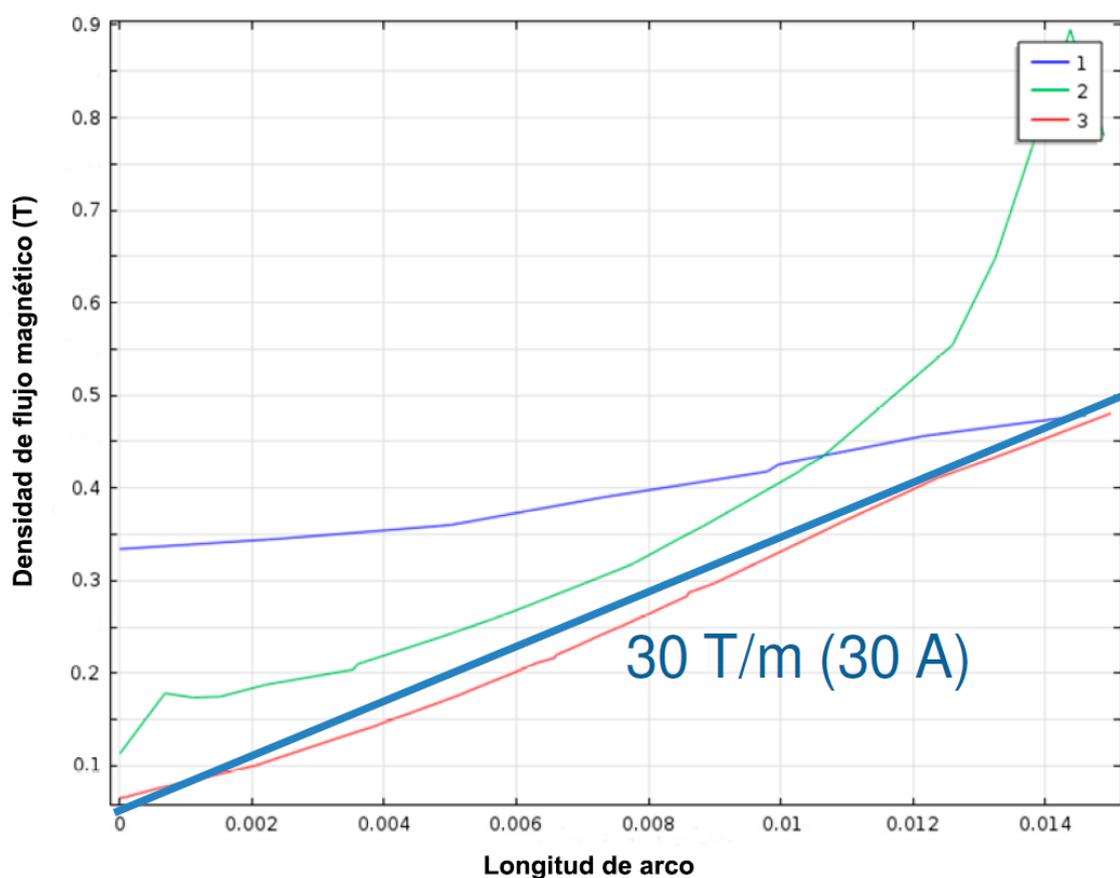


Figura 53. Densidad de flujo magnético en la zona de trabajo, distinguiendo 1: a 30 mm de la línea central; 2: a 15 mm de la línea central, y 3: en la línea central. La línea azul representa la tendencia del sistema.

## 1.2. Validación

La validación de los campos electromagnéticos generados por el dispositivo se realizó por duplicado, empleando dos gausímetros diferentes con sondas incorporadas.

Los primeros resultados obtenidos fueron con el gausímetro Metrolab. Durante el ensayo de caracterización se activaron secuencialmente ambos módulos magnéticos y se midió la densidad de flujo magnético en distintos puntos. Dado que el tamaño de la sonda era de 10 mm, no fue posible identificar la distribución de las líneas de flujo, sino únicamente evaluar valores promedio en la zona de estudio. Las figuras 54 y 55 muestran los resultados obtenidos.

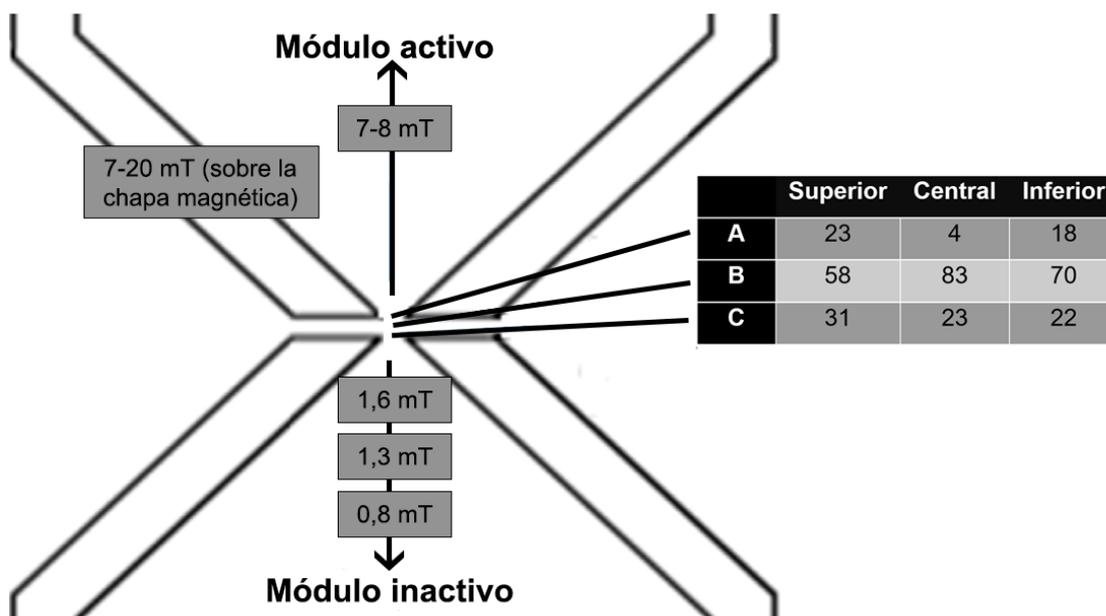


Figura 54. Campo electromagnético generado cuando se aplicó corriente sobre las bobinas superiores (como referencia, el motor estaría en la parte derecha de la imagen). Medidas tomadas con el gausímetro Metrolab expresadas en mT.

Después de cada actuación, el material quedaba ligeramente magnetizado, con valores de 0,1 – 0,4 mT en los polos.

En el momento en el que se cambió la activación de las bobinas superiores por las inferiores, se obtuvieron nuevos valores (figura 55).

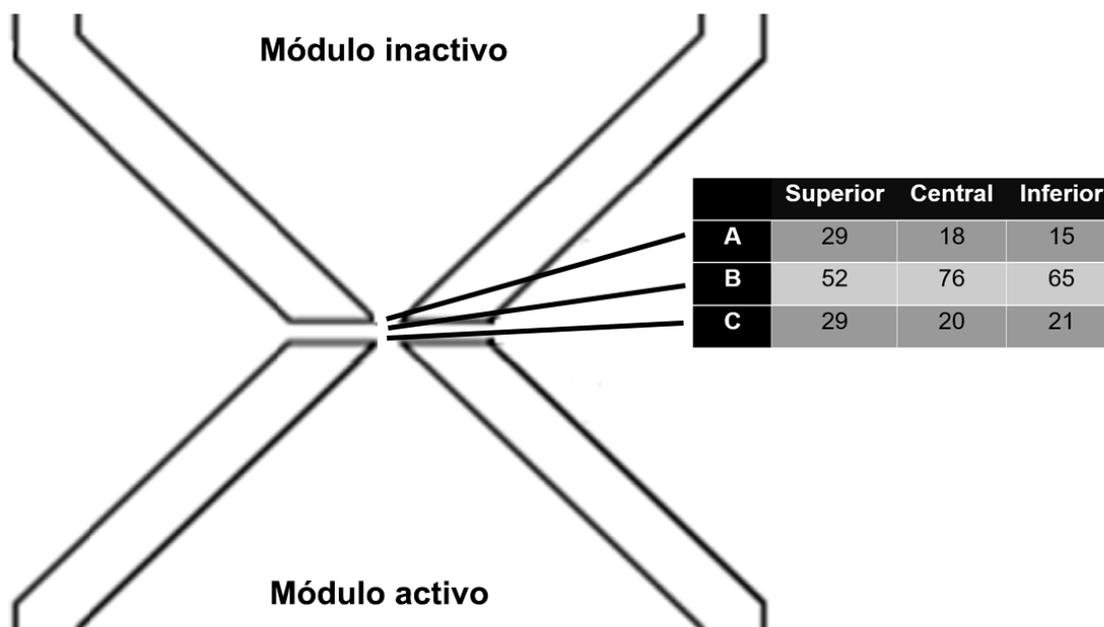


Figura 55. Campo electromagnético generado cuando se aplicó corriente sobre las bobinas inferiores (como referencia, el motor estaría en la parte derecha de la imagen). Medidas tomadas con el gausímetro Metrolab expresadas en mT.

Por otra parte, con el gausímetro de Bell se siguió el esquema de la figura 33. En este caso, ambas bobinas se activaron a la vez. Las medidas obtenidas con la sonda dispuesta paralelamente al recorrido de las muestras se exponen en la tabla 18.

	A				B				C			
	S	C	I	P	S	C	I	P	S	C	I	P
<b>1</b>	130	125	145	133	90	105	95	97	140	135	150	142
<b>2</b>	135	125	140	133	100	120	120	113	160	135	145	147
<b>3</b>	250	240	250	247	90	95	125	103	240	145	300	228
<b>4</b>	35	40	40	38	60	70	60	63	50	40	45	45
<b>5</b>	13	10	7	10	20	40	30	30	14	20	35	23
<b>6</b>	60	60	70	63	70	90	65	75	25	30	20	25
<b>7</b>	280	220	260	253	100	110	80	97	280	240	290	270
<b>8</b>	145	130	140	138	110	130	130	123	150	125	150	142
<b>9</b>	145	135	155	145	110	120	115	115	150	160	180	163

Tabla 18. Medidas de EMF obtenidas con la sonda paralela al recorrido de las muestras. S: superior, C: central, I: inferior, y P: promedio. Medidas expresadas en mT.

También se tomaron medidas con la sonda dispuesta de manera perpendicular al recorrido de las muestras en la zona central, es decir, en aquella en la que teóricamente el campo electromagnético es mayor y donde las muestras se depositarán durante el tratamiento de exposición. Las medidas obtenidas se exponen en la tabla 19.

	A				B				C			
	S	C	I	P	S	C	I	P	S	C	I	P
4	400	450	400	417	130	170	100	133	360	360	290	337
5	150	200	170	173	130	170	140	147	170	210	150	177
6	300	360	360	340	110	140	125	125	360	390	330	360

Tabla 19. Medidas de EMF obtenidas con la sonda perpendicular al recorrido de las muestras. S: superior, C: central, I: inferior, y P: promedio. Medidas expresadas en mT.

Calculando la media absoluta de los valores mostrados en la tabla 19, se obtuvo un valor medio de exposición al campo electromagnético de 245 mT, siendo pues este el valor tomado como referente en la zona o núcleo de exposición central. Además, los valores del EMF decrecían progresivamente a medida que la sonda de medición se alejaba de dicho núcleo, alcanzando valores mínimos de 7-8 mT a una distancia de 1 m del núcleo.

## 2. Determinación de los tiempos de exposición electromagnética

Una vez se diseñó y validó el sistema generador de campos electromagnéticos, se determinaron los tiempos de exposición a estos EMF. Esta determinación de los tiempos de exposición se llevó a cabo mediante el estudio de la expresión de diferentes genes, tanto genes que intervienen en el proceso condrogénico como también otros genes que consideramos de interés. Así pues, se realizó el cultivo de microtejidos de células madre mesenquimales de pulpa dental humana, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos. Estos microtejidos se mantuvieron en medio de diferenciación condrogénica durante 1, 6 y 24 h y 3, 7 y 14 días, tomándose como control muestras a tiempo cero, es decir, en el momento anterior al cambio por medio condrogénico.

Una vez llevada a cabo la cuantificación de la expresión génica mediante técnicas de biología molecular, según se describe en Material y Métodos, se analizaron y representaron (figura 56) los valores de la expresión de los genes analizados (SOX9, ACAN, COL2A1, COL1A1, COL10A1, VEGFA y HIF1A1), tomándose como control los valores de las muestras a tiempo cero.

La expresión relativa del gen marcador de la condrogénesis SOX9 no mostró diferencias significativas en los diferentes tiempos con respecto a la expresión de las muestras a tiempo cero (figura 56A).

Mientras que en el gen ACAN (figura 56B), transcrito que dará lugar a la síntesis de agregano, tampoco se observaron diferencias significativas entre los diversos tiempos experimentales, en la expresión del gen COL2A1 sí hubo diferencias (figura 56C). Este transcrito, indicador de la síntesis de colágeno de tipo II tuvo una expresión 10 veces o *fold-change* superior al valor de las muestras en tiempo cero a partir del tercer día de cultivo con medio de diferenciación condrogénica. A los 7 días de cultivo, esta expresión ascendió hasta valores cercanos a 30, mientras que a las 2 semanas alcanzó valores de 70 *fold-change* respecto a los valores de las muestras control, indicando estos dos últimos valores que las diferencias con respecto al control eran estadísticamente significativas.

Por lo que respecta a la expresión del gen COL1A1 (figura 56D), indicador de la expresión de colágeno de tipo I, no se observaron diferencias en la expresión hasta los 14 días de cultivo, momento en el que el valor de su expresión se duplicó respecto al control interno, siendo este aumento significativo.

A diferencia del gen anterior, en el caso de la expresión de gen COL10A1 (figura 56E), marcador de hipertrofia, se observó un aumento de la misma a partir de los 3 días de cultivos, siendo muy importante a las 2 semanas. Mientras que a los 3 días la expresión fue de veces superior respecto al control, a los 7 días ascendió a valores cercanos a 20. Finalmente, esta expresión alcanzó valores estadísticamente significativos a las 2 semanas de cultivo en medio de diferenciación condrogénica, siendo 240 veces superior al control interno.

Finalmente, en la expresión del gen VEGFA, que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular, solo se observaron diferencias con respecto al control a tiempo cero a las 6 h de cultivo, mientras que en el factor de hipoxia HIF1A1 no se observaron diferencias significativas respecto a este control a lo largo del tiempo estudiado (figura 56F, G, respectivamente).

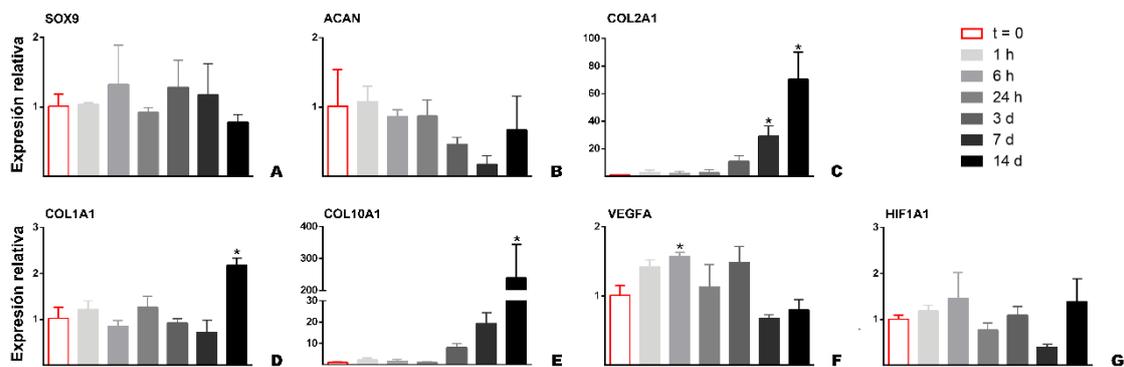


Figura 56. Evolución temporal (tiempo inicial, 1, 6 y 24 h y 3, 7 y 14 días) de la expresión relativa de A: SOX9, B: ACAN, C: COL2A1, D: COL1A1, E: COL10A1, F: VEGFA, y G: HIF1A1. Las muestras en tiempo cero o inicial se tomaron como control de la expresión relativa. Se representa el valor promedio y la desviación estándar (barra de error); \* $p \leq 0,05$  respecto al control ( $t = 0$ ).

### 3. Estudio preliminar de hDPSC expuestas a EMF

Una vez determinados los tiempos de exposición al campo electromagnético, se estudió el efecto de la exposición de 3 días sobre la viabilidad de células madre mesenquimales de pulpa dental humana cultivadas en forma de microtejidos, siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos.

#### 3.1. Estudio de viabilidad celular

Después de 3 días de exposición de los microtejidos al EMF, las muestras irradiadas (A) mostraron un incremento del 59 % en la viabilidad relativa cuando se compararon con las muestras control no irradiadas y mantenidas a 37 °C fuera del incubador durante el tratamiento de estimulación (B), con las mantenidas a temperatura ambiente fuera del incubador durante el tratamiento (C) y con las mantenidas en el incubador celular durante todo el estudio (D) (figura 57). No se observaron diferencias entre los tres grupos control.

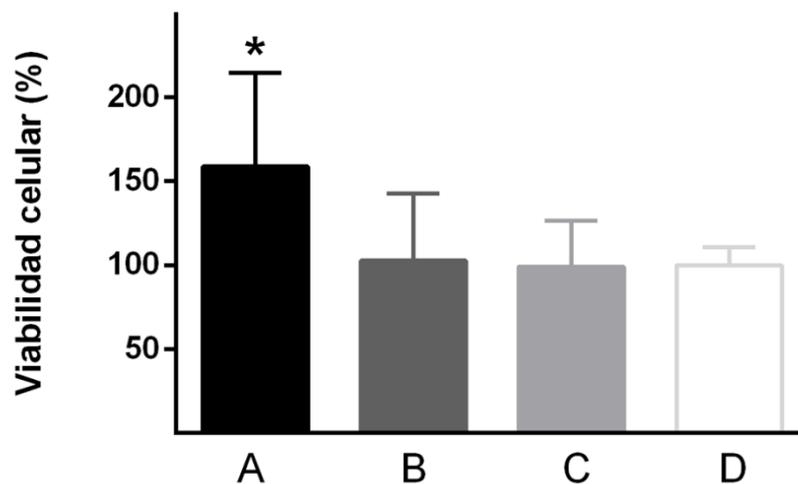


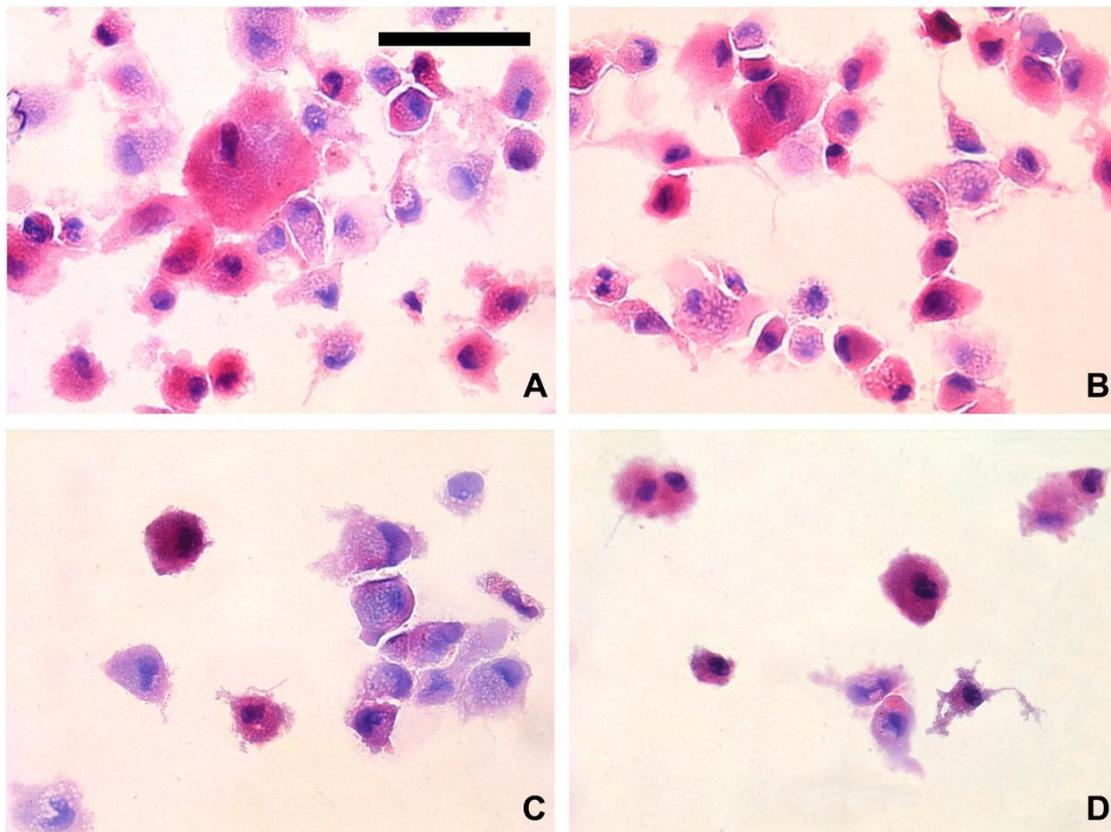
Figura 57. Estudio de la viabilidad de A: microtejidos de hDPSC expuestos al campo electromagnético durante 3 días. Se tomaron como controles B: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a 37 °C durante los periodos de exposición; C: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a temperatura ambiente durante la exposición, y D: microtejidos mantenidos dentro del incubador celular durante todo el estudio. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \* $p \leq 0,05$  respecto al grupo control D.

### 3.2. Estudio morfológico

El estudio morfológico de las muestras irradiadas durante 3 días procesadas y teñidas con hematoxilina-eosina, mostró que las células se disponían de manera aislada o formando grupos celulares pequeños (figura 58).

Los citoplasmas celulares, homogéneamente eosinófilos y en algunos casos basófilos, presentaron una morfología poligonal, con pequeñas prolongaciones. Además, el núcleo se observó redondeado, de cromatina densa, y situado en el centro o excéntrico respecto al citoplasma.

No se encontraron diferencias morfológicas entre las muestras expuestas al EMF (figura 58A) con respecto a los grupos control.



*Figura 58. Imágenes representativas de microtejidos de hDPSC procesados y teñidos con hematoxilina-eosina. A: microtejidos de hDPSC expuestos al campo electromagnético durante 3 días. Se tomaron como controles B: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a 37 °C durante los periodos de exposición; C: microtejidos mantenidos fuera del incubador celular a temperatura ambiente durante la exposición, y D: microtejidos mantenidos dentro del incubador celular durante todo el estudio. Barra de escala = 50  $\mu$ m.*

## 4. Elaboración de las partículas electromagnéticas

Una vez terminó el proceso de fabricación de las partículas electromagnéticas, siguiendo el protocolo descrito por Clara-Trujillo *et al.*<sup>129</sup>, se obtuvo 1 cm<sup>3</sup> en volumen total. Estas partículas mostraron una morfología homogéneamente esférica, con un diámetro de  $50 \pm 20 \mu\text{m}$ . En la figura 59 se observa una única partícula en dos planos de enfoque diferentes, superior y ecuatorial.

Además, la observación de las partículas con el microscopio permitió verificar que la fase férrica, opaca, estaba distribuida homogéneamente por todo el volumen de la partícula.

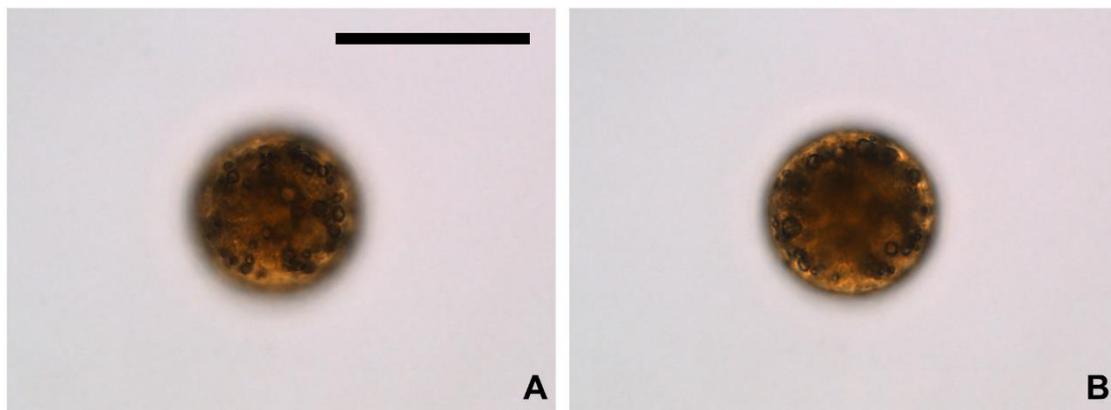


Figura 59. Imágenes tomadas al microscopio óptico de una partícula. Imágenes tomadas en diferentes planos de enfoque, siendo A: plano superior, y B: plano medio o ecuatorial de la partícula. Barra de escala =  $50 \mu\text{m}$ .

### 4.1. Determinación de la densidad de partículas por muestra

El estudio realizado determinó que la densidad de 1 mg/muestra provocaba una menor deformación de los microtejidos durante el periodo de estimulación electromagnética sin llegar a su rotura. Además, se observó un movimiento adecuado de las partículas, desplazándose en una misma dirección en ambos sentidos por todo el microtubo de cultivo durante el tiempo de encendido de las bovinas magnéticas.

## 5. Estudio de la expresión génica de microtejidos de hDPSC estimulados electromagneto-mecánicamente

Considerando los resultados obtenidos en un punto anterior (“Determinación de los tiempos de exposición electromagnética”), se decidió que los tiempos a emplear en este punto del trabajo fueran 3 y 14 días. Esta determinación se basó en que en estos tiempos se apreció un incremento considerable en la expresión de factores condrogénicos, como es la expresión del gen COL2A1, pero también de otros no deseables, como el COL10A1. Así pues, se estudió si la estimulación electromagnética y la electromagneto-mecánica durante estos periodos de tiempo afectaban a la expresión por parte de las hDPSC de estos y otros marcadores analizados.

Una vez finalizados los tiempos de exposición se extrajo el ARN de las muestras y se analizó mediante *Real-Time* RT-PCR, la expresión de los genes SOX9, ACAN, COL2A1, COL1A1, COL10A1, VEGFA y HIF1A1. Para cada gen se tomó como control la expresión de ese gen en las muestras a tiempo cero o inicial.

### 5.1. Estudio de la expresión génica

El gen SOX9 (figura 60), relacionado directamente con la condrogénesis, se expresó de manera superior respecto las muestras O (control a  $t=0$ ) en todas las muestras estimuladas. La exposición a los EMFs durante 72 h (A) aumentó la expresión de este gen 40 veces respecto al control; siendo de 35 *fold-change* para las muestras B. Las muestras mantenidas en el incubador celular durante 72 h (J) también mostraron una mayor expresión respecto al control a  $t = 0$  (O), siendo este valor de 3 *fold-change*.

Por lo que respecta al estudio de 2 semanas en total de estimulación y/o cultivo, en las muestras estimuladas electromagnética y electromagneto-mecánicamente durante 72 h (C y D) se observaron valores superiores cercanos a 3 y 4 *fold-change* respectivamente respecto a las muestras O. Sin embargo, la expresión fue superior para las muestras estimuladas durante 14 días, alcanzando valores de 6 para las muestras estimuladas

electromagnéticamente (H) y de 9 para las muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente (I), siendo este último valor estadísticamente significativo.

Las muestras estimuladas durante 72 h (J) obtuvieron valores superiores respecto aquéllas no estimuladas y mantenidas el mismo tiempo en el incubador. De la misma manera, en las muestras estimuladas 72 h, con posterior cultivo hasta las 2 semanas (C y D), y las estimuladas 14 días (H e I) también se observó un aumento significativo en la expresión de este gen respecto a las muestras mantenidas durante 14 días en el incubador (K).

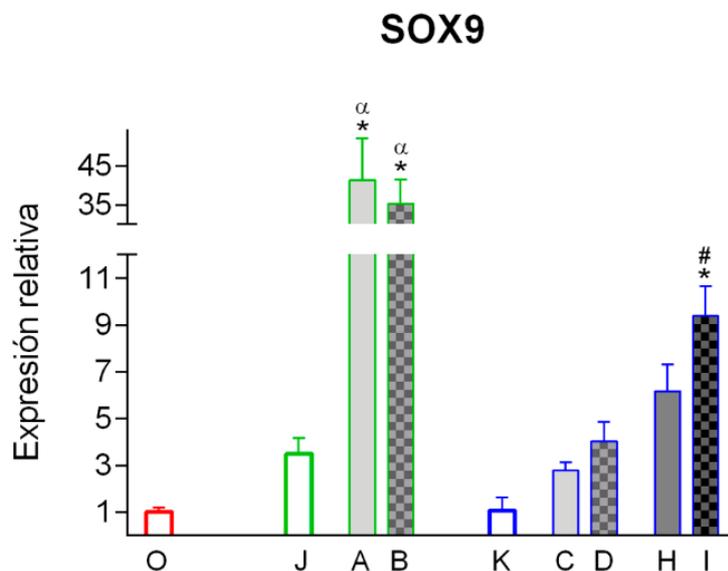


Figura 60. Expresión relativa de SOX9 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $\alpha$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J, y #  $p \leq 0,05$  respecto la muestra K.

Por lo que respecta al gen ACAN (figura 61), se observaron diferencias en las muestras estimuladas durante 72 h y aquellas mantenidas en cultivo hasta 2 semanas.

Por una parte, las muestras A mostraron un aumento en la expresión de este gen de hasta 4 veces superior respecto a las muestras O control y a las

muestras J y B. Las muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h (B) no mostraron diferencias respecto al control (O).

En las muestras estimuladas 72 h y mantenidas posteriormente 11 días en el incubador (C y D) y las muestras estimuladas 14 días (H e I) se observó una disminución significativa importante en la expresión de ACAN respecto a las muestras a tiempo cero (O).

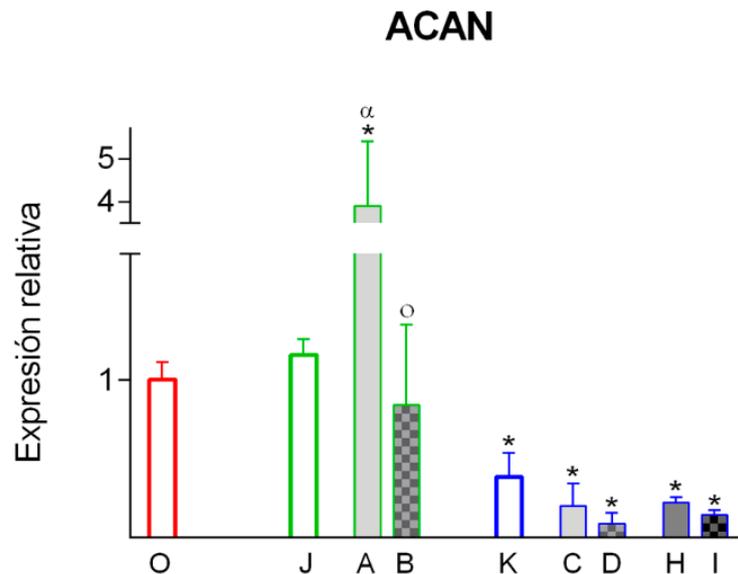


Figura 61. Expresión relativa de ACAN respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O; <sup>α</sup>  $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J, y <sup>o</sup>  $p \leq 0,05$  respecto a la muestra A.

La expresión relativa de COL2A1 en todas las muestras (figura 62) fue más alta que en el control a  $t = 0$  (O). Por un lado, las muestras A mostraron un aumento de 53 puntos y las B, de 85 puntos, respecto al control O. La diferencia entre ambas muestras fue significativa. Además, estas muestras mostraron valores inferiores respecto a aquellas mantenidas en el incubador durante 72 h (muestras J).

Por otro lado, las muestras estimuladas 72 h y mantenidas 11 días más en el incubador celular (C y D) mostraron una expresión superior en 13 y 30 puntos respectivamente respecto al control O, siendo la diferencia entre ellas también significativa. Las muestras estimuladas durante 14 días mostraron un nivel de expresión 7 veces superior en el caso de las muestras estimuladas electromagnéticamente (H), y 4 veces superior en el caso de las muestras también estimuladas mecánicamente (I). Cabe destacar que las muestras de los 4 grupos anteriores mostraron valores de expresión de este gen inferiores respecto a las muestras K, mantenidas durante 14 días en el incubador celular.

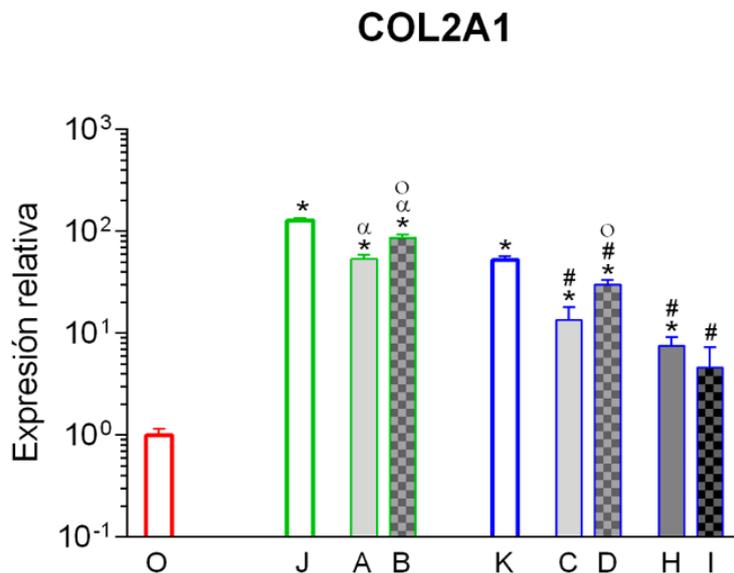


Figura 62. Expresión relativa de COL2A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $\alpha$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J; #  $p \leq 0,05$  respecto a la muestra K, y  $\circ$   $p \leq 0,05$  respecto a las muestras A/C en su caso.

La expresión del gen COL1A1 (figura 63) fue superior en todas las muestras estimuladas por los EMF respecto a las muestras a tiempo cero (O) y a las mantenidas durante 72 h y 14 días en el incubador celular (J y K).

En el caso de las muestras A, estas mostraron valores 17 veces por encima del grupo control (O), pero solo de 4 *fold-change* en el caso de las muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h (B), siendo la diferencia significativa entre ambos grupos de muestras.

Por lo que respecta a las muestras C y D, estas mostraron valores superiores a 7 respecto a las muestras O, sin observar diferencias entre ambos grupos. El aumento más importante se observó en el caso de las muestras estimuladas durante 14 días (H e I), llegando a alcanzar valores de 20 *fold-change* respecto al control a tiempo cero (O), no encontrando diferencias entre ambas.

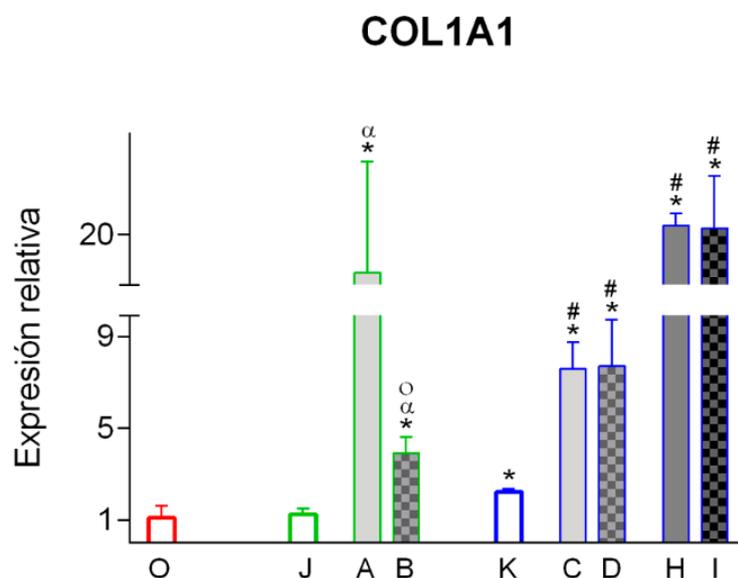


Figura 63. Expresión relativa de COL1A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $\alpha$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J; #  $p \leq 0,05$  respecto a la muestra K; y  $\circ$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra A.

Con respecto a la expresión de COL10A1, se observó un gran aumento de la misma en todos los grupos de muestras respecto a la muestra control O (figura 64). Por un lado, las muestras estimuladas electromagnéticamente (A) mostraron unos valores de 7.000 puntos por encima de las muestras O. En el

caso de las muestras B el incremento fue menor, mostrando valores de 600 *fold-change* respecto este control. Además, en ambas muestras el nivel de expresión fue superior con respecto al de las muestras J.

Por otro lado, las muestras estimuladas 72 h y cultivadas posteriormente durante 11 días (C y D) mostraron valores 7.600 veces superiores respecto las muestras control O, sin que se observasen diferencias entre ambas. Las muestras estimuladas electromagnéticamente durante 14 días alcanzaron valores de expresión relativa superiores a 9.700 (H), mientras que, si la estimulación también fue mecánica (I), estos valores superaron los 16.000. Además, todas las muestras estimuladas (C, D, H e I) mostraron valores significativamente superiores respecto a las muestras K, mantenidas en el incubador celular durante 14 días.

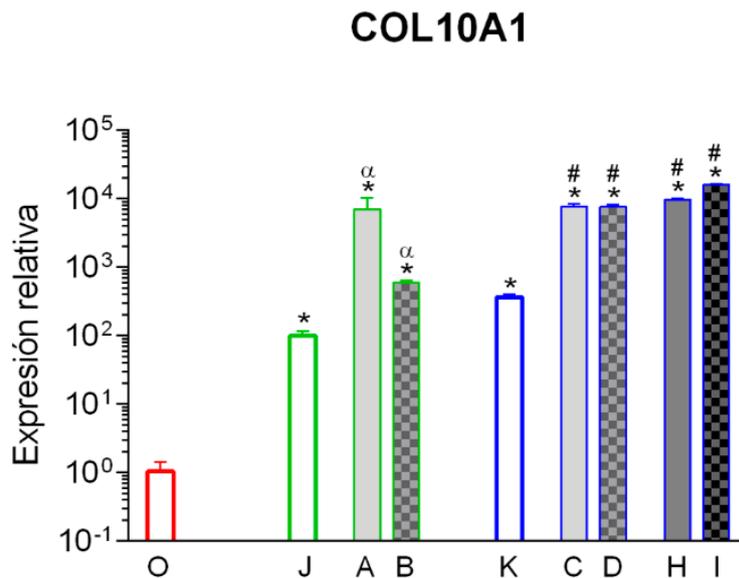


Figura 64. Expresión relativa de COL10A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $\alpha p \leq 0,05$  respecto a la muestra J; y #  $p \leq 0,05$  respecto a la muestra K.

La figura 65 muestra la expresión relativa del gen VEGFA respecto a las muestras tomadas como control a tiempo cero (O). En el caso de las muestras

estimuladas durante 72 h (A y B), se observaron valores 20 y 16 veces por encima de las muestras O, respectivamente. No se observaron diferencias entre ellas. Los valores de expresión de estas muestras fueron superiores significativamente respecto a las muestras mantenidas durante 72 h en el incubador (J).

Por otra parte, las muestras estimuladas 72 h y mantenidas posteriormente 11 días en cultivo (C y D) no mostraron diferencias respecto al control a tiempo cero (O) ni respecto a las muestras mantenidas 14 días en el incubador celular (K). Por el contrario, las muestras estimuladas durante 14 días (H e I) mostraron unos valores relativos de expresión de 5 y 4 *fold-change*, respectivamente. En estos dos casos, el aumento de expresión también fue significativo respecto a las muestras K.

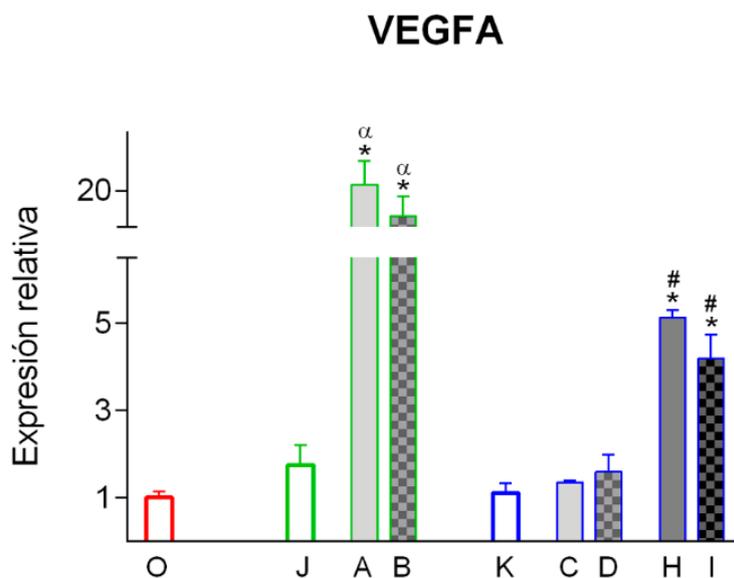


Figura 65. Expresión relativa de VEGFA respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $\alpha$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J; y #  $p \leq 0,05$  respecto a la muestra K.

Por último, con respecto al gen HIF1A1 (figura 66) también se observó un aumento significativo de su expresión en todas las muestras estimuladas

electromagnética y electromagneto-mecánicamente respecto a la muestra tomada como control (O). Las muestras A mostraron valores de expresión cercanos a 7 veces superiores al control, mientras que las B no superaron los 4 *fold-change*. La diferencia entre ambas muestras fue estadísticamente significativa. Además, ambos grupos de muestras mostraron valores de expresión superiores a los obtenidos con las muestras mantenidas en el incubador celular durante 72 h (J).

Por otro lado, las muestras C, D, H e I mostraron valores de en torno 8 *fold-change* respecto a las muestras O, siendo además superiores respecto de las muestras mantenidas durante 14 días en el incubador celular (K). Finalmente, la estimulación electromagneto-mecánica de 14 días (I) provocó un aumento significativo en la expresión de HIF1A1 respecto a las muestras H estimuladas simplemente con electromagnetismo (H).

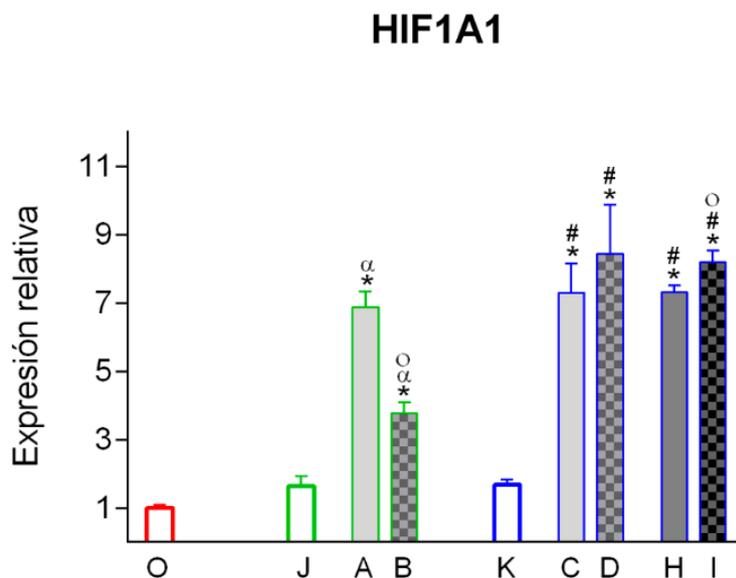


Figura 66. Expresión relativa de HIF1A1 respecto al grupo control a tiempo cero (muestra O) de las muestras A: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h; B: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h; C: estimuladas electromagnéticamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; D: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 72 h con posterior cultivo durante 11 días; H: estimuladas electromagnéticamente durante 14 días; I: estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 14 días; J: mantenidas en el incubador celular durante 72 h; y K: mantenidas en el incubador celular durante 14 días. Promedio  $\pm$  desviación estándar; \*  $p \leq 0,05$  respecto al grupo control O;  $\alpha$   $p \leq 0,05$  respecto a la muestra J; #  $p \leq 0,05$  respecto a la muestra K; y  $\circ$   $p \leq 0,05$  respecto a las muestras A/C en su caso.

## 6. Estudio histológico y de la expresión de proteínas de muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 3 días

Una vez terminado el estudio del punto anterior, considerando los resultados obtenidos se concluyó que la estimulación electromagneto-mecánica durante 72 h favoreció la expresión de los marcadores condrogénicos SOX9, ACAN y COL2A1, mientras que la expresión de otros marcadores, como es el COL10A1, fue menor respecto a la observada en las muestras estimuladas sólo con EMF. Así pues, se elaboraron nuevos microtejidos con partículas electromagnéticas y se expusieron a EMF durante 72 h. Además, se elaboraron microtejidos sin partículas electromagnéticas, que se mantuvieron en el incubador celular a modo de control. En ambos casos las muestras estuvieron en medio de diferenciación condrogénica.

Una vez finalizado el tratamiento de exposición electromagnética, los microtejidos se mantuvieron en el incubador celular durante 2, 4 y 6 semanas más, siempre en medio de diferenciación condrogénica. El propósito de este estudio fue estudiar cómo afectaba el tratamiento de estimulación mecánica tanto a la morfología celular como a la síntesis de proteínas características de la matriz extracelular del cartílago, como son los colágenos tipo I y II y el agregano.

### 6.1. Tinción con hematoxilina-eosina

En las muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 3 días y mantenidas posteriormente 2 semanas más en el incubador celular (figura 67A), se observó un microtejido ligeramente compactado, formado por células de morfología redondeada y núcleos excéntricos, redondeados o aplanados. Se observó un citoplasma eosinófilo, ligeramente basófilo en algunas de las células.

Por lo que respecta a las muestras mantenidas en cultivo 4 y 6 semanas, se apreciaron diferencias respecto a las cultivadas 2 semanas. A las 4 semanas, se distinguió un microtejido menos compacto y se observó una

menor densidad celular y un aumento en matriz extracelular, eosinófila (figura 67B). Por lo que respecta a las 6 semanas, se mantuvo la disminución en la densidad celular, observándose un aumento en matriz extracelular eosinófila y un mayor número de espacios libres entre células, siendo el microtejido menos compacto (figura 67C).

Por el contrario, en las muestras mantenidas en el incubador celular durante el tratamiento de exposición y las posteriores semanas de cultivo no se apreciaron diferencias morfológicas entre ellas, mostrando algunas de las células cierta basofilia (figura 67D-F). El microtejido se mantuvo compacto, observándose una elevada densidad celular y escasos espacios intercelulares.

Cabe destacar en la figura 67A la presencia de dos partículas magnéticas rodeadas por células.

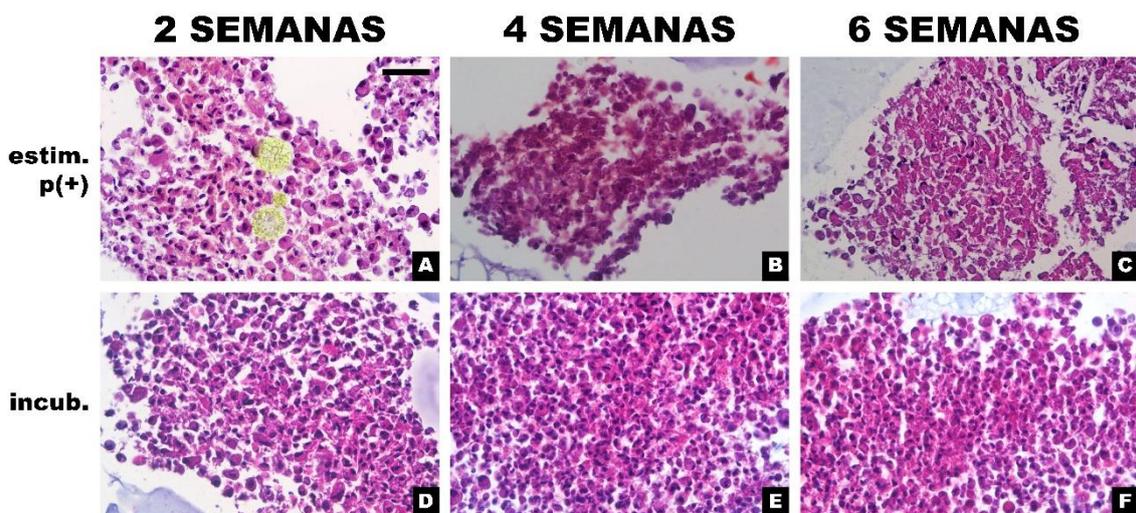


Figura 67. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido teñidas con hematoxilina-eosina. A-C: microtejidos estimulados electromagneto-mecánicamente durante 3 días o, D-F, mantenidos en el incubador celular 3 días y, posteriormente, mantenido en el incubador con medio de diferenciación condrogénica durante A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas; y C y F: 6 semanas. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

A 63 aumentos, se observan células parcialmente redondeadas en el caso de las muestras estimuladas (figura 68A-C), con núcleo grande redondeado y aplanado a las 6 semanas de cultivo (figura 68C).

Por lo que respecta a las muestras control mantenidas en el incubador celular (figura 68D-F), el citoplasma de las células se observó redondeado, con

núcleo excéntrico, redondeado o aplanado. No se observaron diferencias entre las muestras a diferentes tiempos de cultivo celular.

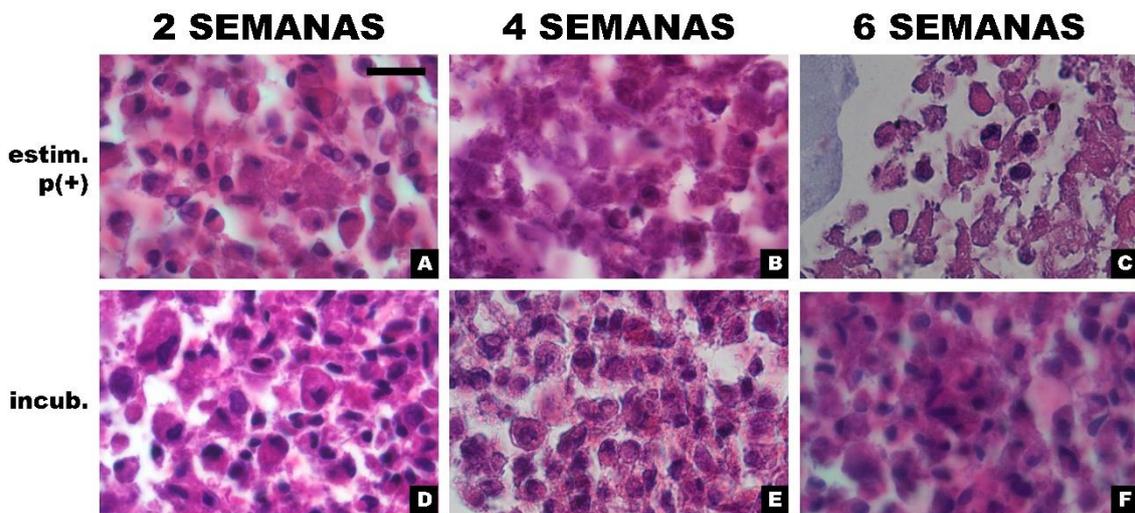


Figura 68. Imágenes de muestras del cultivo de hDPSC en forma de microtejido teñidas con hematoxilina-eosina. A-C: microtejidos estimulados electromagneto-mecánicamente durante 3 días o, D-F, mantenidos en el incubador celular 3 días, y posteriormente mantenidos en el incubador con medio de diferenciación condrogénica durante A y D: 2 semanas; B y E: 4 semanas, y C y F: 6 semanas. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

#### 6.1.1. Adhesión celular a las partículas electromagnéticas

En los microtejidos estimulados con EMF en presencia de partículas electromagnéticas se observaron células adheridas sobre la superficie de estas partículas (figura 69), que parecían emitir cortas prolongaciones hacia la estructura de PLA.

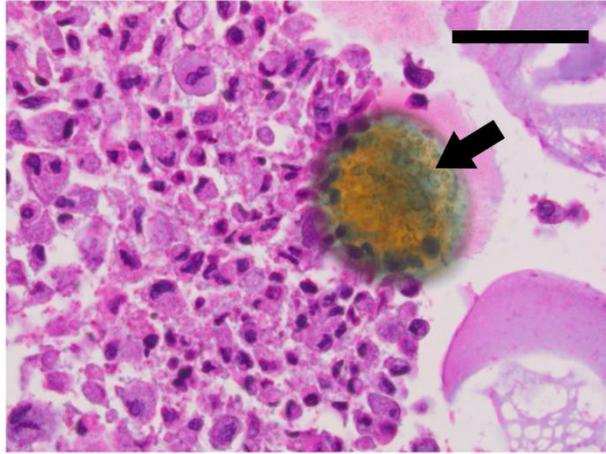


Figura 69. Imagen de un microtejido estimulado electromagneto-mecánicamente durante 72 h en presencia de partículas electromagnéticas y mantenido 4 semanas en el incubador celular. La flecha indica la partícula electromagnética con células adheridas a ella. Tinción de hematoxilina-eosina. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

## 6.2. Densidad celular en los microtejidos

Se determinó la densidad celular mediante el recuento de los núcleos celulares en las muestras analizadas. Los resultados obtenidos se representan en la figura 70.

A tiempo inicial o tiempo cero, las muestras analizadas mostraron una densidad de  $9,4 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ . Por una parte, las muestras expuestas a los campos electromagnéticos con partículas magnéticas, siguiendo el tratamiento de 3 días, y cultivadas posteriormente durante 2 semanas más en medio de cultivo de diferenciación condrogénica, mostraron un incremento de la densidad celular hasta valores de  $11,4 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ . La densidad celular de estas mismas muestras cultivadas durante 4 semanas fue de  $7,8 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ . Y, finalmente, en el caso de las muestras cultivadas durante 6 semanas después del tratamiento de estimulación electromagneto-mecánica, se observó una disminución significativa del número de células hasta valores de  $3,6 \times 10^3$  células/ $\text{mm}^2$ . En los 3 tiempos de cultivo se apreciaron diferencias significativas con los valores obtenidos en las muestras a tiempo cero.

Por otra parte, las muestras control, es decir, sin exposición a los campos electromagnéticos y sin presencia de partículas, mostraron un

comportamiento similar al descrito en el punto 1.2 del bloque 2. Las muestras mantenidas durante 2 semanas en el incubador celular, una vez terminado el tratamiento de estimulación electromagneto-mecánica, mostraron una densidad de  $10,4 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup>. Se calculó un valor de  $11,2 \times 10^3$  células/mm<sup>2</sup> en el caso de las muestras mantenidas 4 semanas y, finalmente, este valor alcanzó las  $12,1 \times 10^3$  células /mm<sup>2</sup> para el caso de las muestras cultivadas durante 6 semanas. No se apreciaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en los 3 tiempos muestrales, pero sí hubo diferencias de estos valores respecto a los de las muestras a tiempo cero.

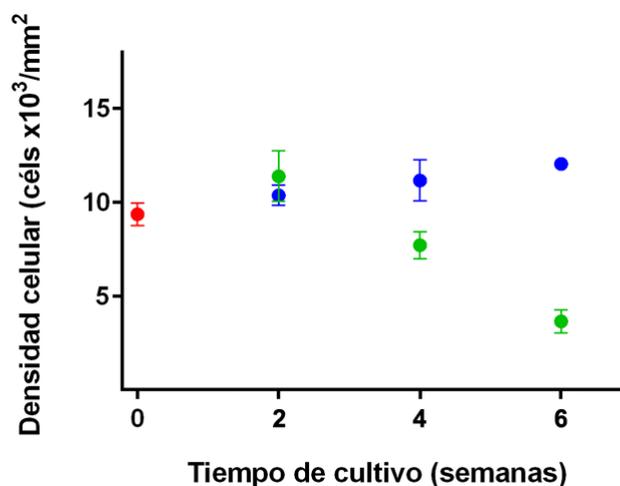


Figura 70. Densidad celular en los microtejidos en las diferentes condiciones estudiadas (azul: muestras en incubador sin estimular; verde: muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente durante 3 días) y tiempos de cultivo analizados (rojo: control a  $t = 0$ ). Promedio  $\pm$  desviación estándar. Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en las muestras a 2, 4 y 6 semanas respecto al tiempo cero y entre ambas condiciones en las muestras de 4 y 6 semanas.

### 6.3. Caracterización celular mediante inmunofluorescencia

Tras procesar las muestras para realizar los estudios de inmunofluorescencia, se observó la presencia de agregano en las muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente (figura 71A, E, I). Mientras que a dos semanas de cultivo posterior a este tratamiento se observó este proteoglicano en torno a los núcleos celulares (figura 71A), en los cultivos de 4 y 6 semanas se distinguió en todo el microtejido celular de manera extracelular, homogénea, y con mayor intensidad en el último tiempo analizado.

Por lo que respecta a la síntesis de colágeno de tipo II, su evolución se asemejó a la del agregcano, observándose levemente en torno a las células en los cultivos de 2 semanas posteriores a la estimulación electromagneto-mecánica (figura 71B). En la semana 4 de cultivo, la síntesis de colágeno de tipo II en el interior celular se intensificó (figura 71F) y, por último, en las muestras mantenidas durante 6 semanas después de la estimulación, se apreció esta proteína en todo el microtejido, distribuida de manera extracelular y uniforme (figura 71J).

Finalmente, la síntesis de colágeno tipo I, proteína característica del cartílago fibroso, se observó levemente en el interior de las células a las 2 semanas de cultivo posterior al tratamiento de estimulación (figura 71C), y se mantuvo a lo largo del tiempo, no siendo importante durante la cuarta y sexta semana de estudio (figura 71G, K).

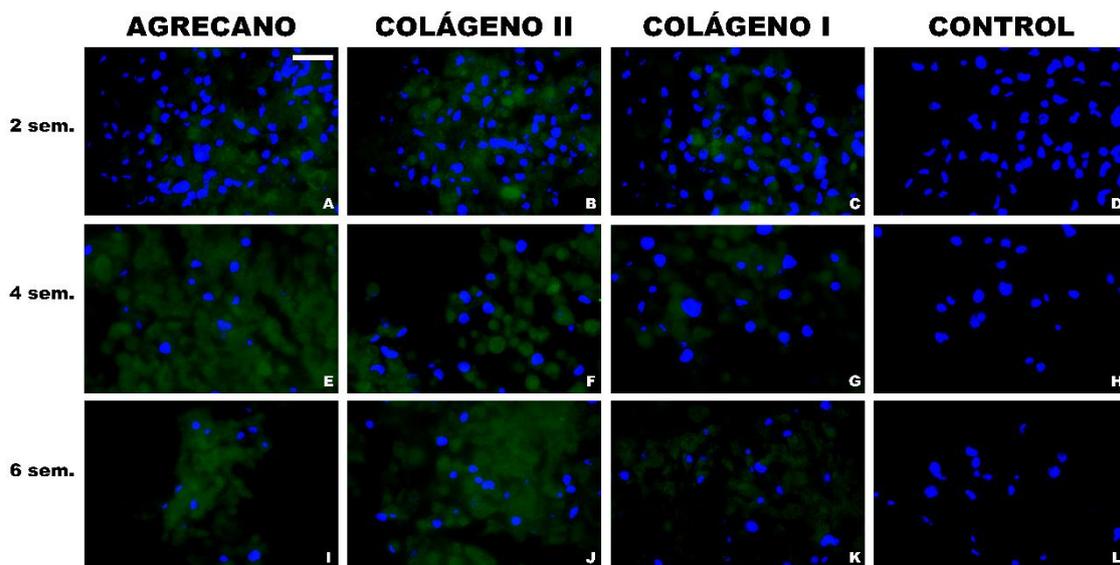


Figura 71. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en forma de microtejidos, estimulados electromagneto-mecánicamente durante 3 días y mantenidos posteriormente en el incubador celular durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas, e I-L: 6 semanas. En todo el estudio las muestras estuvieron en medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares (teñidos con DAPI) y, en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Canal verde de las imágenes modificado mediante PhotoShop: A-C, E, G y K (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y F, I y J (sat. +100 % y lum. +25 %). barra de escala = 25  $\mu$ m.

En las muestras control mantenidas en el incubador celular durante el tiempo equivalente al tratamiento de estimulación electromagneto-mecánica y

durante las semanas posteriores, se observaron diferencias con las muestras sí expuestas.

En la segunda semana del cultivo, se observó menor síntesis de agrecano en las muestras no tratadas (figura 72A). Sin embargo, se apreció, sobre todo, a partir de la cuarta semana de cultivo en el interior celular, intensificándose en la semana 6 (figura 72E, I), sin alcanzar la intensidad que se observó en las muestras estimuladas.

El colágeno de tipo II se detectó a partir de la cuarta semana (figura 72B, F). Esta proteína característica del cartílago hialino se observó distribuida de manera homogénea por toda la matriz extracelular del microtejido en la sexta semana del cultivo (figura 72J). No obstante, se observó en menor cantidad que en las muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente.

Por último, durante la semana 2 del cultivo celular se detectó la presencia de colágeno de tipo I en torno a los núcleos celulares, y su presencia se intensificó en toda la matriz extracelular durante la cuarta y sexta semana de cultivo (figura 72C, G, K).

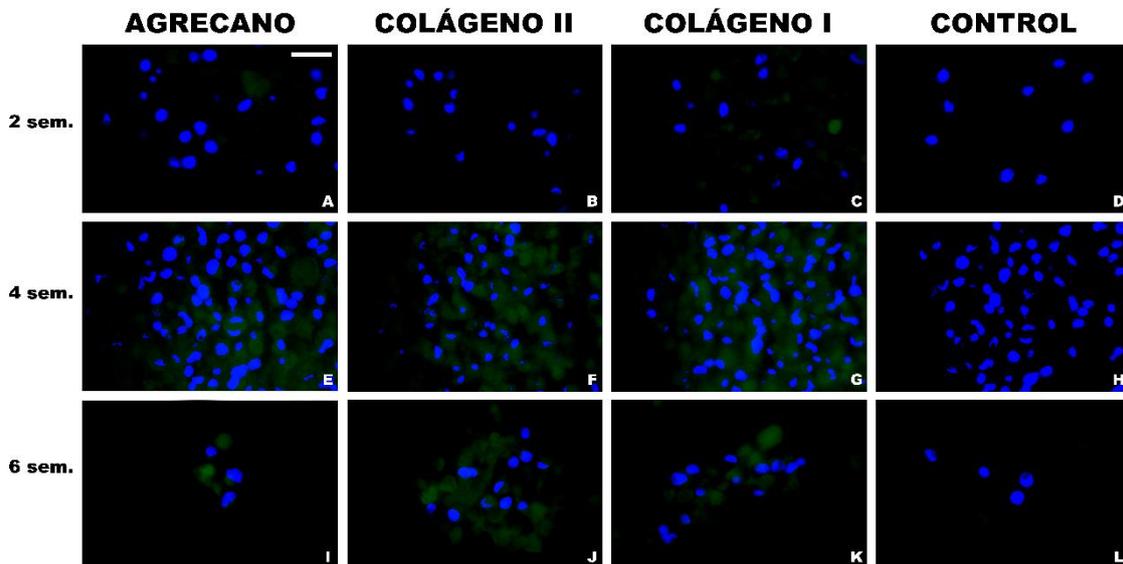


Figura 72. Imágenes de inmunofluorescencia de células hDPSC cultivadas en forma de microtejidos mantenidos en el incubador celular tanto durante el tratamiento de estimulación electromagneto-mecánica como posteriormente, durante A-D: 2 semanas; E-H: 4 semanas; e I-L: 6 semanas. En todo el estudio las muestras estuvieron en medio de diferenciación condrogénica. En azul se observan los núcleos celulares (teñidos con DAPI) y, en verde, la presencia de las proteínas analizadas. Canal verde de las imágenes modificado mediante PhotoShop: A y C (saturación +100 % y luminosidad +50 %), y E-G (sat. +100 % y lum. +25 %). Barra de escala = 25  $\mu$ m.

DISCUSIÓN: bloque 3

## 1. Sistema generador de campos electromagnéticos

El diseño y fabricación del sistema generador de campos electromagnéticos (EMF) se llevó a cabo por parte del grupo de investigación de la Universidad de Zaragoza, con quien nuestro grupo ha estado colaborando durante los últimos 6 años<sup>127</sup>. Este dispositivo presentó dos elementos separados; por un lado, el relacionado con la generación de un campo electromagnético alterno y, por otro, el que permite el desplazamiento de los tubos en que se encuentran las muestras.

El primer componente consistió en un circuito magnético formado por dos módulos (izquierdo y derecho) conectados secuencialmente para generar fuerzas en los dos sentidos de una misma dirección. El comando fue dado por un generador de señales GW-Instek PSB 2800L, que controló dos fuentes de energía GW-Instek AFG-2225.

Para el segundo propósito, se situó un actuador entre ambos circuitos magnéticos, el cual permitió el desplazamiento secuencial y controlado de 3 muestras que se expondrán a los EMF; de esta manera, fue posible cambiar de muestra de manera automatizada en intervalos de tiempos establecidos sin que la estimulación de una muestra afectara a las otras dos. Para ello, se utilizó un control de posición para comandar un motor Elmeq de paso a paso (MLI1FRL17A4-EQ-LB3M180GT) conectado a un husillo mecánico. Además, se elaboró un programa para la ejecución controlada del actuador, según los tiempos de exposición que se determinaron con estudios posteriores, detallado en el anexo.

Así pues, el dispositivo electromagnético permitió generar EMF en un rango operativo de 15×15 mm, creando un gradiente de flujo electromagnético de 30 T/m, con una magnitud de campo electromagnético de 245 mT en el punto central del dispositivo, lugar donde se situó cada vez una muestra para la exposición. Esta magnitud de campo electromagnético localizado se comprobó y validó empleando 2 gausímetros con sonda diferentes.

## 2. Determinación de los tiempos de exposición electromagnética

El análisis de la expresión de los diferentes genes de una célula es fundamental actualmente en numerosos estudios. La expresión de determinados genes en una célula determinará, por ejemplo, la posterior síntesis de diferentes proteínas y su posible secreción a la matriz celular. Es por ello por lo que esta detección de la expresión génica es fundamental para estudiar el efecto condrogénico que puede tener la aplicación de un tratamiento de estimulación con EMF como el propuesto en este trabajo de Tesis Doctoral.

Las proteínas son macromoléculas que sintetizan las células a partir de la información contenida en su ADN. Esta información genética se transcribe a una molécula intermedia llamada ARN mensajero o ARNm. Esta molécula sale al citosol donde se produce la traducción, proceso por el cual se generan proteínas a partir de dicha molécula.

Así pues, el análisis de la presencia del ARNm es fundamental para determinar la posterior síntesis de dicha proteína. No obstante, para facilitar la cuantificación de la presencia de un ARNm, que dará lugar a una proteína en concreto, se debe realizar la conversión de esta molécula, que se degrada fácilmente durante el procesado y almacenamiento de las muestras, en ADN complementario o ADNc, molécula más estable. Esta conversión se llama transcripción inversa o retrotranscripción.

Finalmente, el ADNc generado se cuantifica mediante PCR cuantitativa o qPCR (por sus siglas en inglés) a tiempo real, método que está ampliamente utilizado para cuantificar de forma relativa la expresión de un gen, proceso previo a la síntesis de la proteína.

Una vez se diseñó y validó el sistema generador de campos electromagnéticos, se realizó la determinación de los tiempos de exposición a estos EMF. Esta determinación de los tiempos de estudio se llevó a cabo mediante la expresión de diferentes genes, tanto partícipes del proceso condrogénico como también de otros genes de interés. Así pues, como paso previo se realizó el cultivo de microtejidos de hDPSC. Estos microtejidos se

mantuvieron en medio de diferenciación condrogénica durante un tiempo comprendido entre 1 h y 14 días, tomándose como control muestras a tiempo cero, es decir, en el momento anterior al cambio de medio de proliferación en el que se generaron los microtejidos por medio de diferenciación condrogénica.

Una vez llevada a cabo la cuantificación de la expresión génica, descrita en Material y Métodos, se analizaron los valores de la expresión de los genes analizados (SOX9, ACAN, COL2A1, COL1A1, COL10A1, VEGFA y HIF1A1), tomándose como control los valores de expresión de las muestras a tiempo cero.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la expresión de los genes SOX9, ACAN y HIF1A1 a lo largo del tiempo, mientras que en los genes de las cadenas de los colágenos sí se observaron. Por lo que respecta a COL2A1 y COL10A1, a partir de los 3 días de cultivo con el medio de diferenciación condrogénica se observó un aumento en su expresión, respecto al control interno a tiempo cero, intensificándose a los 7 días y, sobre todo, a los 14 días de cultivo. Por el contrario, COL1A1 solo mostró un aumento significativo a las 2 semanas de cultivo con el medio estudiado. Por último, la expresión de VEGFA solo mostró un ligero aumento significativo respecto al control a tiempo cero a las 6 h de cultivo en medio de diferenciación condrogénica.

Dichos resultados coinciden con los estudios de Hu *et al.* con células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, y cultivadas con medio de diferenciación condrogénica, donde no observaron diferencias en la expresión de ACAN y SOX9 en los diferentes tiempos de estudio analizados (3, 7 y 14 días)<sup>156</sup>.

Por lo que respecta a los genes COL2A1 y COL1A1, diversos trabajos describen que, a tiempos largos de cultivo (2-4 semanas) de MSC, se observa un aumento en la expresión de estos genes cuando las células se cultivan con medio de diferenciación condrogénica<sup>157,158</sup>.

A partir de estos datos observados, se decidió profundizar en el estudio de la evolución de la expresión de COL2A1, el cual da lugar a la posterior síntesis de colágeno tipo II, proteína fundamental de la matriz extracelular del

cartílago hialino<sup>142</sup>. Así pues, se determinaron dos tiempos de exposición electromagnética, con el fin de apreciar posibles diferencias con muestras control (no expuestas), ya que en otros estudios se ha observado que la exposición a EMF reducía el tiempo de diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales<sup>112</sup>.

El primer tiempo fue de 3 días de estimulación, en el que se observó un aumento inicial de COL2A1 en las muestras cultivadas. El segundo fue de 14 días de estimulación, donde se observó un aumento considerable en la expresión de COL2A1, pero también de COL1A1 y COL10A1. El motivo de la inclusión de este segundo tiempo fue estudiar si la exposición electromagnética mejoraba la expresión de COL2A1 y disminuía la expresión de los marcadores COL1A1 y COL10A1 (marcadores génicos relacionados con la formación de tejido fibroso e hipertrófico, respectivamente, siendo por tanto indicadores negativos de la diferenciación a cartílago hialino).

### 3. Estudio preliminar de hDPSC expuestas a EMF

Estudios recientes se han centrado en el uso de campos electromagnéticos *in vitro* para inducir la proliferación y diferenciación celular y su posible uso en pacientes con lesiones osteocondrales, mejorando de esta manera defectos o lesiones tisulares causadas por enfermedades como la osteoartritis<sup>159-161</sup>. Hoy en día el rango de magnitudes de EMF y de tiempos de tratamiento empleados son muy variados, pero varios estudios han aplicado EMF del orden de mT e inferiores, y exposiciones de en torno a 1 h de duración. En este estudio preliminar se empleó un campo generado de 245 mT, cercanos a los 600 mT utilizados por Suryani *et al.*<sup>159</sup> o por Negi *et al.*<sup>160</sup>. Suryani *et al.* estudiaron el efecto de diferentes tiempos de exposición a EMF sobre células madre mesenquimales, y observó que 15 min incrementaban el contenido de ADN y ARN en las muestras estimuladas<sup>159</sup>, induciendo pues la proliferación celular *in vitro*. Por otro lado, Negi *et al.* redujeron el tiempo de exposición a 10 min diarios, no encontrando diferencias entre las muestras estimuladas respecto a los controles<sup>160</sup>. Además, Ribeiro *et al.* observaron un incremento del 25 % en la proliferación celular en muestras estimuladas tanto electromagneto-mecánicamente respecto a aquellas estimuladas solo con electromagnetismo<sup>161</sup>. Considerando los resultados de estos estudios previos<sup>145,159,160</sup>, el tratamiento usado en este estudio fue de 4 exposiciones electromagnéticas diarias de 20 min cada una, con un periodo de descanso de 2 h entre la segunda y la tercera, durante 3 días.

Una vez determinados los tiempos de exposición al campo electromagnético, se estudió el efecto de la exposición de 3 días sobre la viabilidad de células madre mesenquimales de pulpa dental humana cultivadas en forma de microtejidos, siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos.

En el caso de este estudio preliminar, se observó un incremento en el número de células de más del 50 % en las muestras estimuladas electromagnéticamente, comparado con aquellas muestras tomadas como control (sin exposición a EMF). En este caso, la magnitud del campo electromagnético no afectó al número de células, por lo que fue la exposición la responsable de este aumento.

Con respecto a la morfología celular, Negi *et al.* demostraron en su estudio que las células madre mesenquimales expuestas al campo electromagnético que emplearon no sufrían una transformación maligna ni la formación de colonias cuando las células se cultivaban en agar blando<sup>160</sup>. Además, las células estimuladas acorde con los parámetros de Ribeiro *et al.* tampoco mostraron diferencias significativas en la morfología celular con respecto a las tomadas como control<sup>161</sup>, siendo células poligonales con escasas y cortas prolongaciones, núcleos redondeados de cromatina densa y citoplasma eosinófilo teñido homogéneamente.

Por tanto, se puede afirmar que el tratamiento empleado en este punto del trabajo no alteró la morfología de las hDPSC. No obstante, se observó un incremento en el número de células en los microtejidos expuestos a los campos electromagnéticos, probablemente debido a una inducción de la proliferación celular. Este último punto resulta fundamental en tratamientos empleados en el ámbito de la traumatología<sup>162</sup>, donde los procedimientos de ingeniería tisular permiten elaborar constructos o andamiajes artificiales de alto contenido celular que posteriormente se implantarán en lesiones condrales<sup>41,163</sup>.

#### 4. Elaboración de las partículas electromagnéticas

En diferentes estudios de esta Tesis Doctoral se emplearon partículas electromagnéticas para estimular mecánicamente microtejidos de hDPSC expuestos a campos electromagnéticos. La síntesis de estas partículas se llevó a cabo mediante la técnica de emulsión- evaporación descrita por Clara-Trujillo *et al.*<sup>129</sup>. Una vez elaboradas estas partículas de PLA con 5 % en volumen de ferrita clínica, se observaron al microscopio óptico.

Por lo que respecta a la morfología, las partículas presentaron una forma esférica, con distribución homogénea de la ferrita por toda la estructura de PLA. El tamaño medio de las partículas obtenido fue de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, siendo el diámetro máximo de 70  $\mu\text{m}$ , que se corresponde al tamaño de poro del tamiz utilizado durante el proceso de limpieza de las partículas una vez se sintetizaron. No se observaron diferencias entre las partículas elaboradas en este trabajo y las preparadas por Clara-Trujillo *et al.*<sup>129</sup>.

## 5. Caracterización de microtejidos expuestos a estimulación electromagneto-mecánica mediante la determinación de la expresión génica

Una vez determinados los tiempos de exposición a los campos electromagnéticos (3 y 14 días) y estudiada el efecto de estos campos sobre la viabilidad de las células empleadas, se procedió a elaborar microtejidos para el estudio de la influencia de la exposición electromagneto-mecánica mediante el análisis de la expresión de diferentes genes y proteínas.

Para ello, se elaboraron microtejidos siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos. Se obtuvieron microtejidos de  $0,6 \times 10^6$  células madre pulpares. Al tercer día desde la siembra, y con el microtejido formado, se añadieron las partículas electromagnéticas a un grupo de las muestras, en las que se estudió el efecto de la estimulación electromagneto-mecánica. Se sustituyó en todas las muestras el medio de cultivo por medio de diferenciación condrogénica. A continuación, las muestras se expusieron a los EMF.

Se llevaron a cabo 3 protocolos de exposición: 3 y 14 días. Además, otras muestras se expusieron durante 3 días y se mantuvieron posteriormente 11 días más en el incubador celular con medio de diferenciación, alcanzando un tiempo de cultivo total de 2 semanas.

Asimismo, se elaboraron muestras que se mantuvieron dentro del incubador celular durante 3 y 14 días, las cuales se tomaron como control interno para cada tratamiento de exposición.

Finalmente, se prepararon otras muestras a tiempo cero, es decir, en el momento del inicio del estudio; estas muestras se consideraron como control del estudio de estimulación electromagneto-mecánica. En este caso, a las muestras no se añadieron partículas electromagnéticas.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento correspondiente, se extrajo el ARN de las muestras y se realizó una PCR cuantitativa o Real-Time PCR, analizando los genes SOX9, ACAN, COL2A1, COL1A1, COL10A1, VEGFA y HIF1A1.

Por lo que respecta al gen SOX9, gen marcador de la condrogénesis, en las muestras estimuladas tanto por EMF como también mecánicamente se observó un aumento en la expresión respecto a las muestras mantenidas en el incubador, siendo importante en la estimulación de 3 días.

La expresión del gen ACAN aumentó en las muestras estimuladas electromagnéticamente durante 3 días y, por el contrario, se redujo en aquellas muestras mantenidas hasta 14 días en cultivo y en las del tratamiento de 14 días de exposición.

En el caso de COL2A1, se observó un aumento muy importante en todas las muestras estudiadas respecto al control a tiempo inicial.

De igual manera, COL1A1 mostró un aumento considerable en su expresión relativa en las muestras expuestas a los campos electromagnéticos, en presencia o ausencia de partículas electromagnéticas, respecto a las muestras mantenidas en el incubador celular.

La expresión de los genes SOX9, COL2A1 y COL1A1 aumentó significativamente respecto a la de los controles, efecto promovido por la exposición a los campos magnéticos y, en su caso, al estímulo mecánico en estos EMF. Así pues, en el caso de SOX9 y de COL2A1, una estimulación de 3 días favorecería la diferenciación condrogénica, mientras que, si esta estimulación se prolongaba hasta 14 días, la expresión del gen COL1A1, marcador de tejido conjuntivo fibroso, aumentaba de forma notables.

El trabajo de Chen *et al.* demostró que la exposición a EMF aumentaba la expresión de algunos marcadores génicos, como son SOX9 y COL2A1, a tiempos de exposición cortos, mientras que a tiempos de exposición mayores (7 días), la expresión de COL1A1 aumentaba respecto a los controles<sup>121</sup>.

De la misma manera, Lin *et al.* demostraron que la estimulación dinámica (mecánica) durante 14 días de células madre mesenquimales tratadas con medio de diferenciación condrogénica aumentaba la expresión de COL2A1 de manera importante respecto al control no estimulado<sup>164</sup>. En su estudio también observó un aumento del transcrito ACAN en aquellas muestras

estimuladas mecánicamente con medio de diferenciación condrogénica respecto a los controles.

La expresión del gen marcador de la hipertrofia de los condrocitos, COL10A1, que aparece asociado a una mineralización de la matriz condral y posterior muerte celular, fenómeno que ocurre en zonas de osificación endocondral<sup>165</sup>, se observó aumentado en todas las muestras estudiadas a los 3 y 14 días, siendo significativo respecto a aquellas tomadas como control (tiempo inicial).

Mayer-Wagner *et al.* observaron que la exposición a los EMF disminuía la expresión del gen COL10A1<sup>155</sup> en su tratamiento de 45 min cada 8 h durante 21 días, y en el caso del estudio de Lin *et al.*<sup>164</sup>, las muestras estimuladas mecánicamente durante 14 días también mostraron niveles inferiores de este gen respecto a las no tratadas<sup>164</sup>.

Por lo que respecta al marcador VEGFA, las muestras expuestas durante 72 h y durante 14 días mostraron niveles superiores a aquellas tomadas como controles. En este caso, la estimulación de 72 h afectó en mayor medida, pero cuando estas mismas muestras se dejaron 11 días más en cultivo, sin EMF, los valores obtenidos no se diferenciaron de aquellos tomados como control; en el caso de las muestras estimuladas 14 días, los valores disminuyeron respecto a los obtenidos a los 3 días. Esto indica que la estimulación, tanto electromagnética como electromagneto-mecánica, induce la expresión de VEGFA y la mantiene en el tiempo, mientras que en las células no sometidas a los tratamientos estudiados no se inducía su expresión.

Finalmente, se estudió la expresión de HIF1A1, que es un marcador de hipoxia. Se observó aumentada en las muestras estimuladas electromagnética y electromagneto-mecánicamente respecto a los controles internos. Así pues, los tratamientos estudiados indujeron notablemente la expresión de este marcador de factor de hipoxia.

## 6. Caracterización morfológica de microtejidos expuestos a estimulación electromagneto-mecánica durante 3 días

Partiendo de los resultados obtenidos en el punto anterior al estimular durante 3 días los microtejidos de células madre pulpares, se repitió el estudio para realizar su caracterización morfológica. Esta vez, las muestras estuvieron en presencia de partículas electromagnéticas, causando también una estimulación mecánica sobre los microtejidos, y se expusieron a los EMF durante 3 días. También se elaboraron microtejidos sin partículas, que se mantuvieron en el incubador celular a modo de control. En ambos casos, las muestras estuvieron se cultivaron con el medio de diferenciación condrogénica de la empresa Lonza.

Una vez terminó el tratamiento de exposición electromagnética, los microtejidos se mantuvieron en el incubador celular durante 2, 4 y 6 semanas más, con medio de diferenciación condrogénica. Con esto, se pretendió estudiar cómo afectaba el tratamiento de estimulación mecánica a la morfología celular y, también, a la síntesis y secreción de proteínas y proteoglicanos típicos de la matriz condral, como son el colágeno de tipo II y el agregano, o de tejido conjuntivo fibroso, como es el colágeno tipo I.

### 6.1. Caracterización histológica y recuento celular

A las 2 semanas de cultivo, tanto las muestras control (no estimuladas) como aquellas que recibieron el tratamiento mostraron una gran consistencia, con la presencia de células próximas entre sí. A partir de la cuarta semana, las muestras estimuladas mostraron áreas extensas acelulares, intensificándose en la semana 6. Las células presentes en el microtejido mostraron núcleos grandes, redondeados, algunos ligeramente aplanados y excéntricos. Por el contrario, las muestras control mostraron una gran celularidad por todo el microtejido, y no se observaron diferencias a lo largo del tiempo.

Los resultados observados mediante la tinción con hematoxilina-eosina se corroboraron en el estudio de recuento del número de núcleos en los microtejidos expuestos al tratamiento y cultivados. En las muestras tratadas se observó una disminución progresiva en el número de células por unidad de

superficie, mientras que las tomadas como control (las muestras no expuestas al tratamiento electromagneto-mecánico) mantuvieron una densidad celular parecida entre ellas y, además, a la observada en el estudio realizado en el bloque 2 (cultivo de hDPSC en microtejidos).

## 6.2. Inmunofluorescencia

La presencia de agregano se observó en las muestras tratadas electromagneto-mecánicamente en todos los tiempos de estudio. Inicialmente se observó en torno a los núcleos celulares y, en tiempos más avanzados, ocupando la matriz extracelular por toda la estructura del microtejido. Esto mismo ocurrió en el caso del colágeno tipo II, situándose de manera homogénea por todo el organoide celular al término del estudio.

Por otro lado, las muestras mantenidas en el incubador celular durante todo el estudio (muestras control), mostraron un comportamiento parecido a las del estudio del bloque 2, como cabía esperar. El agregano se empezó a detectar, de manera sutil, a las dos semanas de cultivo, intensificándose su presencia con el tiempo.

El colágeno tipo II se observó a partir de la cuarta semana de cultivo, distribuyéndose de manera homogénea por todo el microtejido en la semana 6 del estudio.

Por lo que respecta a la síntesis de colágeno tipo I en las muestras estimuladas, se observó levemente en la segunda semana del estudio, manteniéndose a lo largo de las semanas posteriores. Su síntesis no se mostró muy importante en las muestras estimuladas electromagneto-mecánicamente.

Por el contrario, en las muestras mantenidas en el incubador esta proteína se distinguió alrededor de los núcleos celulares en la segunda semana del estudio, intensificándose su presencia en la cuarta y, sobre todo, en la sexta semana de cultivo.

En definitiva, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha comprobado por primera vez que la exposición de microtejidos de hDPSC con medio de

diferenciación condrogénica a campos electromagnéticos durante 3 días (siguiendo el tratamiento propuesto en este trabajo de Tesis Doctoral), juntamente con la aplicación de fuerzas mecánicas sobre estos, promueve la síntesis de agregano y colágeno tipo II, proteínas características de la matriz extracelular del cartílago hialino. Por tanto, la exposición de las células que forman los microtejidos a los campos electromagnéticos, con una estimulación además mecánica, induce la diferenciación condral de las células DPSC. Por otro lado, la síntesis de colágeno tipo I se vio reducida y mantenida en el tiempo, no alcanzando valores elevados.

DISCUSIÓN: interbloques 2 y 3

En el bloque 2 se observó que la elaboración de organoides o microtejidos monocelulares de células madre mesenquimales de pulpa dental humana, y su cultivo con medio de diferenciación condrogénica durante varias semanas, indujo la síntesis y secreción de proteínas características de la matriz extracelular del cartílago hialino, como son el colágeno tipo II y el agregano<sup>1,59,145</sup>. Además, también se observó la síntesis de colágeno tipo I, proteína abundante en tejidos conjuntivos, como son la dermis, el cartílago fibroso y el hueso, entre otros; la presencia de esta proteína pues, no es beneficiosa para la regeneración de cartílago articular debido a que altera sus propiedades mecánicas<sup>142,145</sup>.

Considerando los resultados anteriores, se diseñó y fabricó un dispositivo capaz de generar campos electromagnéticos localizados y controlados. Además, la incorporación de dos pares de bobinas, las cuales se encendían de manera alterna, permitió el movimiento bidireccional y controlado de partículas electromagnéticas. Este movimiento, en definitiva, generó presiones (fuerzas mecánicas) sobre las muestras expuestas a los EMF, en este caso, sobre los microtejidos de hDPSC elaborados.

Una vez determinados los tiempos de estimulación a partir del análisis de la expresión de diferentes genes de interés, se estimularon electromagneto-mecánicamente microtejidos durante 3 días, siguiendo el tratamiento diario desarrollado en este trabajo.

Los resultados obtenidos mostraron que esta estimulación favorecía la síntesis de agregano y colágeno tipo II por las células pulpares mesenquimales, apareciendo estas proteínas por toda la estructura o matriz del microtejido. Además, la estimulación inhibió en gran medida la síntesis de colágeno tipo I, el cual sí se observó expresado de manera significativa en los microtejidos tomados como control (sin tratamiento) o en aquellos elaborados en el bloque 2 (cultivo de hDPSC en microtejidos).

Y es que numerosos trabajos realizados desde los años 70, revisados por Vaca-González *et al.*<sup>145</sup>, han demostrado que el uso de campos electromagnéticos altera el comportamiento de células, como son los

condrocitos y, en este caso, células madre mesenquimales. En concreto, la exposición electromagnética estimula la proliferación celular, como se ha visto en el punto 3.1 del bloque 3 (estudio preliminar de hDPSC expuestas a EMF), donde se observó un aumento en la densidad celular de más de un 50 % en microtejidos expuestos durante 3 días. Además, también se ha descrito que los EMF incrementan la síntesis y secreción de proteínas de la matriz extracelular del cartílago articular, como son el colágeno tipo II y el agregano<sup>100,121,155</sup>, también observado en el punto 6.2 del mismo bloque.

# CONCLUSIONES

Como resultado del estudio realizado y en relación con los objetivos planteados, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. Las células madre mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSC) exhiben mejores propiedades que las células madre mesenquimales de tejido adiposo (hADSC) en cuanto a su capacidad proliferativa y viabilidad celular. Fue el tipo celular más adecuado para realizar el resto de los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral.
  
2. Con relación al cultivo de hDPSC en hidrogel de alginato 3 %-agarosa 1 %:
  - a. El hidrogel compuesto por alginato 3 % y agarosa 1 % exhibe una baja citotoxicidad y es adecuado para el cultivo de hDPSC, tanto con medios de proliferación celular como de diferenciación condrogénica, durante 3 días y 2, 4 y 6 semanas.
  - b. En este entorno las células expresan proteínas de la matriz extracelular: agregano, colágeno de tipo II y colágeno de tipo I. Esta expresión depende del medio en que se cultivan las células, ya que es más temprana en el caso de aquellas cultivadas con medio de inducción condrogénica (semana 2 de cultivo) que en el caso de cultivadas con medio de proliferación (semana 4 de cultivo).

En definitiva, un ambiente tridimensional como es el caso del hidrogel estudiado favorece la diferenciación condrogénica de hDPSC, favoreciendo la síntesis de proteínas características de la matriz extracelular, tanto condral (agregano y el colágeno tipo II) como del tejido fibroso (colágeno de tipo I), ocurriendo este proceso en tiempos más cortos cuando se emplea medio de inducción condrogénica.

3. Respecto al cultivo de microtejidos de hDPSC:

- a. El método desarrollado permite la elaboración de microtejidos u organoides de hDPSC, que mantienen sus propiedades cuando se cultivan con medios de proliferación celular o de diferenciación condrogénica durante periodos largos, de hasta 6 semanas.
- b. Las células de los microtejidos cultivados con medio de inducción condrogénica se distribuyen homogéneamente por todo el microtejido, en todos los tiempos estudiados. Sin embargo, en los microtejidos cultivados con medio de proliferación las células se acumulaban en mayor medida en la parte periférica del organoide celular a partir de la cuarta semana de cultivo; la disminución de la densidad celular en el centro del microtejido podría deberse a la necrosis de las células en esta zona por falta de difusión de nutrientes.
- c. En todos los microtejidos las células expresan a partir de la cuarta semana de cultivo proteínas de la matriz extracelular: agrecano, colágeno de tipo II y colágeno de tipo I. El medio de diferenciación condrogénica induce una expresión elevada del agrecano. El medio de proliferación celular induce una mayor expresión de colágeno de tipo II.

En definitiva, el cultivo de hDPSC en forma de organoide celular o microtejido induce la diferenciación condrogénica, favoreciendo la expresión de proteínas características de la matriz extracelular del cartílago hialino, como son el agrecano y el colágeno tipo II.

4. Con relación al desarrollo del protocolo de estimulación electromagneto-mecánica:

- a. Los tiempos de estimulación seleccionados para estudiar el efecto de la exposición electromagnética en la diferenciación condrogénica de los microtejidos de hDPSC fueron 3 y 14 días. La inducción condrogénica durante 3 y 14 días provoca un aumento de la

expresión del gen condrogénico COL2A1, mientras que la expresión del gen marcador de hipertrofia COL10A1 aumenta a los 14 días de exposición

- b. El protocolo desarrollado para elaborar partículas electromagnéticas permite obtener partículas de ácido poliláctico conteniendo ferrita clínica de un tamaño homogéneo.
5. Sobre la estimulación electromagnética y electromagneto-mecánica de los microtejidos:
- a. Los campos electromagnéticos generados por el sistema no afectan negativamente a la viabilidad de las células en los microtejidos de hDPSC.
  - b. La exposición de los microtejidos a estimulación electromagnética y electromagneto-mecánica durante 3 días favorece la diferenciación condrogénica de las células hDPSC. La estimulación más prolongada, de 14 días, favorece la expresión de genes marcadores de tejido fibroso o hipertrófico (COL1A1, COL10A1, VEGFA). La estimulación mecánica, adicional a la electromagnética, no altera significativamente el patrón de expresión de los genes estudiados con respecto al observado en las muestras estimuladas solo electromagnéticamente.

Por tanto, según el protocolo que se ha desarrollado en este trabajo, los tejidos de hDPSC han de ser expuestos al campo electromagnético durante 3 días para favorecer la diferenciación condrogénica. Tiempos más largos de exposición (14 días) inducen la expresión de genes no característicos del cartílago hialino.

6. Respecto a los microtejidos estimulados electromagneto-mecánicamente durante 3 días y cultivados posteriormente durante 2, 4 y 6 semanas:
- a. La estimulación favorece la síntesis de matriz extracelular. Las muestras estimuladas alcanzan una menor densidad celular a partir

de la cuarta semana de cultivo, aumentando la cantidad de matriz extracelular entre ellas. En las muestras no estimuladas las células se distribuyen homogéneamente por todo el microtejido.

- b. En las muestras estimuladas se genera matriz extracelular propia del cartílago hialino, ya que a partir de la cuarta semana de cultivo se observa la presencia extracelular de agregano y de colágeno de tipo II.

En definitiva, la estimulación electromagneto-mecánica de microtejidos de hDPSC durante 3 días favorece la síntesis y acumulación extracelular de agregano y de colágeno de tipo II, componentes fundamentales de la matriz extracelular del cartílago hialino.

A la vista de todos los resultados obtenidos, se ha demostrado que, en primer lugar, el contacto célula-célula (cultivo en organoide celular o microtejido) promueve la síntesis y secreción de sustancias características de la matriz extracelular del cartílago hialino. En segundo lugar, la exposición de microtejidos de hDPSC a campos electromagnéticos durante 3 días promueve la diferenciación condrogénica, mientras que a tiempos de exposición más largos se inducen genes no característicos del cartílago hialino. Finalmente, la estimulación mecánica de estos microtejidos durante 3 días favorece la síntesis y acumulación extracelular de agregano y de colágeno tipo II, componentes principales de la matriz extracelular del cartílago hialino.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Welsch U.; Deller T. *Histología de Sobotta 3/e. Edit. Médica Panamericana* (2013).
2. Sancho-Tello, M., Milián, L., Roig, M. M., De Llano, J. J. M. & Carda, C. Cartilage regeneration and tissue engineering. in *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration* (2019).
3. Guillén-García, P. *et al.* Viability of Pathologic Cartilage Fragments as a Source for Autologous Chondrocyte Cultures. *Cartilage* **7**, 149–156 (2016).
4. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histología Texto y Atlas. Histología, texto y atlas* (2015).
5. Junqueira, L. C. & Carneiro, J. *Histologia Basica, Texto E Atlas. Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (2013).
6. Matta, C. & Zakany, R. Calcium signalling in chondrogenesis: Implications for cartilage repair. *Front. Biosci. - Sch.* (2013).
7. Hamid, A., Idrus, R., Saim, A., Sathappan, S. & Chua, K. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics* **67**, 99–106 (2012).
8. Richter, W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. in *Journal of Internal Medicine* (2009).
9. Filardo, G. *et al.* Clinical profiling in cartilage regeneration: Prognostic factors for midterm results of matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation. *Am. J. Sports Med.* (2014).
10. Mithoefer, K. *et al.* Guidelines for the design and conduct of clinical studies in knee articular cartilage repair: International cartilage repair society recommendations based on current scientific evidence and standards of clinical care. *Cartilage* (2011).

11. Sharma, L. The Role of Knee Alignment in Disease Progression and Functional Decline in Knee Osteoarthritis. *JAMA* **286**, 188 (2001).
12. Dell'Isola, A., Smith, S. L., Andersen, M. S. & Steultjens, M. Knee internal contact force in a varus malaligned phenotype in knee osteoarthritis (KOA). *Osteoarthr. Cartil.* (2017).
13. Frenkel, S. R. & Di Cesare, P. E. Degradation and repair of articular cartilage. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* (1999).
14. Shelbourne, K. D., JARI, S. & GRAY, T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: A natural history study. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* **85**, 8–16 (2003).
15. Bert, J. M. & Maschka, K. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: A five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* (1989).
16. Johnson, L. L. Arthroscopic abrasion arthroplasty: A review. in *Clinical Orthopaedics and Related Research* (2001).
17. Becher, C., Malahias, M. A., Ali, M. M., Maffulli, N. & Thermann, H. Arthroscopic microfracture vs. arthroscopic autologous matrix-induced chondrogenesis for the treatment of articular cartilage defects of the talus. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* (2019).
18. Mithoefer, K., Mcadams, T., Williams, R. J., Kreuz, P. C. & Mandelbaum, B. R. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: An evidence-based systematic analysis. *American Journal of Sports Medicine* (2009).
19. Goyal, D., Keyhani, S., Lee, E. H. & Hui, J. H. P. Evidence-Based Status of Microfracture Technique: A Systematic Review of Level I and II Studies. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **29**, 1579–1588 (2013).
20. Hangody, L. *et al.* Autologous osteochondral grafting—Technique and long-term results. *Injury* **39**, 32–39 (2008).

21. Campbell, J. *et al.* Salvage of contaminated osteochondral allografts: The effects of chlorhexidine on human articular chondrocyte viability. *Am. J. Sports Med.* (2014).
22. Langer, R. & Vacanti, J. Tissue engineering. *Science (80-. )*. **260**, 920–926 (1993).
23. Skalak, R. Tissue engineering. in *Proceedings of the Annual Conference on Engineering in Medicine and Biology* (1993).
24. Asano, Y., Shimoda, H., Matsusaki, M. & Akashi, M. Transplantation of artificial human lymphatic vascular tissues fabricated using a cell-accumulation technique and their engraftment in mouse tissue with vascular remodelling. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e1501–e1510 (2018).
25. Mayer, C. S. *et al.* Residual Iris Retraction Syndrome After Artificial Iris Implantation. *Am. J. Ophthalmol.* **199**, 159–166 (2019).
26. Ozaki, M. *et al.* Implantation of Thickened Artificial Bone for Reduction of Dead Space and Prevention of Infection between Implant and Dura in Secondary Reconstruction of the Skull. *J. Craniofac. Surg.* **28**, 888–891 (2017).
27. Kumai, T. *et al.* A novel, self-assembled artificial cartilage– hydroxyapatite conjugate for combined articular cartilage and subchondral bone repair: Histopathological analysis of cartilage tissue engineering in rat knee joints. *Int. J. Nanomedicine* **14**, 1283–1298 (2019).
28. Tai, B. C. U., Du, C., Gao, S. & Wan, A. C. A. Synthetic Poly(Vinylalcohol)-Based Membranes for Cartilage Surgery and Repair. *Biotechnol. J.* **12**, 1–11 (2017).
29. Giannobile, W. V. Periodontal tissue engineering by growth factors. in *Bone* (1996).
30. Bouhadir, K. H. & Mooney, D. J. In vitro and in vivo models for the reconstruction of intercellular signaling. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (1998).

31. Hari Reddi, A. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology* (1998).
32. Nakashima, M. & Reddi, A. H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology* (2003).
33. Prescott, R. S. *et al.* In Vivo Generation of Dental Pulp-like Tissue by Using Dental Pulp Stem Cells, a Collagen Scaffold, and Dentin Matrix Protein 1 after Subcutaneous Transplantation in Mice. *J. Endod.* (2008).
34. Hall, P. A. & Watt, F. M. Stem cells: The generation and maintenance of cellular diversity. *Development* (1989).
35. Bruder, S. P., Jaiswal, N. & Haynesworth, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* (1997).
36. Rao, M. S. Stem sense: A proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells and Development* (2004).
37. Woods, E. J. *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* (2009).
38. Calle, E. A. *et al.* Strategies for whole lung tissue engineering. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* (2014).
39. Vega, S. L. S., Kwon, M. Y. & Burdick, J. A. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* **33**, 59–75 (2017).
40. Guillén-García, P. *et al.* Increasing the Dose of Autologous Chondrocytes Improves Articular Cartilage Repair: Histological and Molecular Study in the Sheep Animal Model. *Cartilage* **5**, 114–122 (2014).
41. Lopez-Alcorocho, J. M. *et al.* Cartilage Defect Treatment Using High-Density Autologous Chondrocyte Implantation: Two-Year Follow-up. *Cartilage* **9**, 363–369 (2018).

42. Lu, D. *et al.* Accelerated neuronal differentiation toward motor neuron lineage from human embryonic stem cell line (H9). *Tissue Eng. - Part C Methods* (2015).
43. Toh, W. S. & Cao, T. Derivation of chondrogenic cells from human embryonic stem cells for cartilage tissue engineering. *Methods Mol. Biol.* (2015).
44. Blum, B. & Benvenisty, N. The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells. in *Advances in Cancer Research* 133–158 (2008).
45. Hiltz, F. M. *et al.* Influence of extremely low frequency, low energy electromagnetic fields and combined mechanical stimulation on chondrocytes in 3-D constructs for cartilage tissue engineering. *Bioelectromagnetics* **35**, 116–128 (2014).
46. Peng, G., McNary, S. M., Athanasiou, K. A. & Reddi, A. H. Surface zone articular chondrocytes modulate the bulk and surface mechanical properties of the tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng. - Part A* (2014).
47. Kanafi, M. M. *et al.* Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy* **15**, 1228–1236 (2013).
48. Kanafi, M., Majumdar, D., Bhone, R., Gupta, P. & Datta, I. Midbrain cues dictate differentiation of human dental pulp stem cells towards functional dopaminergic neurons. *J. Cell. Physiol.* (2014).
49. Ansari, S. *et al.* Alginate/hyaluronic acid hydrogel delivery system characteristics regulate the differentiation of periodontal ligament stem cells toward chondrogenic lineage. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2017).
50. Izal, I. *et al.* Culture of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on of poly(l-lactic acid) scaffolds: Potential application for the tissue engineering of cartilage. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **21**, 1737–1750 (2013).

51. Esposito, M. *et al.* Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs, into chondrogenic cells in the presence of pulsed electromagnetic fields. *In Vivo (Brooklyn)*. **27**, 495–500 (2013).
52. Chen, F. H. & Tuan, R. S. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **10**, 223 (2008).
53. Homicz, M. R., Schumacher, B. L., Sah, R. L. & Watson, D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* (2002).
54. MacKenzie, T. C. & Flake, A. W. Human mesenchymal stem cells: Insights from a surrogate in vivo assay system. *Cells Tissues Organs* (2002).
55. Mesner, P. W. & Kaufmann, S. H. Methods Utilized in the Study of Apoptosis. *Adv. Pharmacol.* (1997).
56. Nakayama, N. *et al.* Human pluripotent stem cell-derived chondroprogenitors for cartilage tissue engineering. *Cell. Mol. Life Sci.* (2020).
57. Discher, D. E., Mooney, D. J. & Zandstra, P. W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* (2009).
58. Gronthos, S. *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* (2002).
59. Gómez de Ferraris, C. M. *Histología y embriología bucodental. Editorial Médica Panamericana*, (2002).
60. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13625–13630 (2000).
61. Bluteau, G., Luder, H. U., De Bari, C. & Mitsiadis, T. A. Stem cells for tooth engineering. *Eur. Cells Mater.* **16**, 1–9 (2008).

62. Rizk, A. & Rabie, A. B. M. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor  $\beta$ 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy* (2013).
63. Téclès, O. *et al.* Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. in *Archives of Oral Biology* (2005).
64. Umeda, K. *et al.* Long-term expandable SOX9+ chondrogenic ectomesenchymal cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* (2015).
65. Shin, Y. S., Seo, S. R., Jung, J. C. & Park, T. K. Promoting Effects of Forskolin on Chondrogenic Differentiation in vitro. **4**, 515–518 (1994).
66. Lee, J. Y. *et al.* Pre-transplantational Control of the Post-transplantational Fate of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilage. *Stem Cell Reports* (2018).
67. Lotz, M. K. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: Pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Research and Therapy* (2010).
68. Bussmann, B. M. *et al.* Chondrogenic potential of human dermal fibroblasts in a contractile, soft, self-assembling, peptide hydrogel. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2016).
69. Lebourg, M. *et al.* Biodegradable polycaprolactone scaffold with controlled porosity obtained by modified particle-leaching technique. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2008).
70. Ródenas-Rochina, J., Ribelles, J. L. G. & Lebourg, M. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2013).
71. Panadero, J. A. *et al.* Mechanical fatigue performance of PCL-chondroprogenitor constructs after cell culture under bioreactor mechanical stimulus. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* (2016).

72. Martínez-Díaz, S. *et al.* In Vivo Evaluation of 3-Dimensional Polycaprolactone Scaffolds for Cartilage Repair in Rabbits. *Am. J. Sports Med.* (2010).
73. García Cruz, D. M., Salmerón-Sánchez, M. & Gómez-Ribelles, J. L. Stirred flow bioreactor modulates chondrocyte growth and extracellular matrix biosynthesis in chitosan scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* (2012).
74. Sancho-Tello, M. *et al.* Human platelet-rich plasma improves the nesting and differentiation of human chondrocytes cultured in stabilized porous chitosan scaffolds. *J. Tissue Eng.* (2017).
75. Popa, E. G., Reis, R. L. & Gomes, M. E. Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage. *Crit. Rev. Biotechnol.* **35**, 410–424 (2015).
76. Park, H., Kim, D. & Lee, K. Y. Interaction-tailored cell aggregates in alginate hydrogels for enhanced chondrogenic differentiation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* (2017).
77. Campos, F. *et al.* Evaluation of Fibrin-Agarose Tissue-Like Hydrogels Biocompatibility for Tissue Engineering Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* (2020).
78. Campos, F. *et al.* Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* (2018).
79. Gamboa-Martínez, T. C., Luque-Guillén, V., González-García, C., Gómez Ribelles, J. L. & Gallego-Ferrer, G. Crosslinked fibrin gels for tissue engineering: Two approaches to improve their properties. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* (2015).
80. Rodríguez-Arco, L. *et al.* Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues. *Nanoscale* **8**, 8138–8150 (2016).

81. Daly, A. C. *et al.* 3D Bioprinting for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **6**, 1–20 (2017).
82. Hak, D. J. *et al.* Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* (2014).
83. Nandra, R., Grover, L. & Porter, K. Fracture non-union epidemiology and treatment. *Trauma* (2016).
84. Watts, J. J., Abimanyi-Ochom, J. & Sanders, K. M. *Osteoporosis costing all Australian: a new burden of disease analysis - 2012 to 2022. Osteoporosis Australia* (2013).
85. Claes, L., Recknagel, S. & Ignatius, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology* (2012).
86. Court-Brown, C. M., Clement, N. D., Duckworth, A. D., Biant, L. C. & McQueen, M. M. The changing epidemiology of fall-related fractures in adults. *Injury* (2017).
87. Pasco, J. A. *et al.* The Epidemiology of Incident Fracture from Cradle to Senescence. *Calcif. Tissue Int.* (2015).
88. Steinberg, F. U. & Steinberg, F. U. The Effects of Immobilization on Bone. in *The Immobilized Patient* (1980).
89. McKinley, T. Principles of Fracture Healing. *Surg.* (2003).
90. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr. Cartil.* (2002).
91. Jorgensen, C., Noel, D., Apparailly, F. & Sany, J. Stem cells for repair of cartilage and bone: The next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2001).
92. Morales, T. I. The role and content of endogenous insulin-like growth factor-binding proteins in bovine articular cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997).

93. Trippel, S. B. Growth factor actions on articular cartilage. *J. Rheumatol. Suppl.* **43**, 129–32 (1995).
94. Chandrasekhar, S., Harvey, A. K. & Stack, S. T. Degradative and repair responses of cartilage to cytokines and growth factors occur via distinct pathways. in *Agents and Actions* 121–125 (Birkhäuser Basel, 1993).
95. Glansbeek, H. L., Van Der Kraan, P. M., Lafeber, F. P. J. G., Vitters, E. L. & Van Den Berg, W. B. Species-specific expression of type II TGF- $\beta$  receptor isoforms by articular chondrocytes: Effect of proteoglycan depletion and aging. *Cytokine* (1997).
96. Studer, R. K., Georgescu, H. I., Miller, L. A. & Evans, C. H. Inhibition of transforming growth factor  $\beta$  production by nitric oxide-treated chondrocytes: Implications for matrix synthesis. *Arthritis Rheum.* **42**, 248–257 (1999).
97. Heng, B. C., Cao, T. & Lee, E. H. Directing Stem Cell Differentiation into the Chondrogenic Lineage In Vitro. *Stem Cells* (2004).
98. Ongaro, A. *et al.* Chondroprotective effects of pulsed electromagnetic fields on human cartilage explants. *Bioelectromagnetics* (2011).
99. Boopalan, P. R. J. V. C., Arumugam, S., Livingston, A., Mohanty, M. & Chittaranjan, S. Pulsed electromagnetic field therapy results in healing of full thickness articular cartilage defect. *Int. Orthop.* (2011).
100. Yi, H. G. *et al.* Effects of electromagnetic field frequencies on chondrocytes in 3D cell-printed composite constructs. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **104**, 1797–1804 (2016).
101. Brighton, C. T., Wang, W., Seldes, R., Zhang, G. & Pollack, S. R. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* (2001).
102. Griffin, X. L., Warner, F. & Costa, M. The role of electromagnetic stimulation in the management of established non-union of long bone fractures: What is the evidence? *Injury* (2008).

103. Daish, C., Blanchard, R., Fox, K., Pivonka, P. & Pirogova, E. The Application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) for Bone Fracture Repair: Past and Perspective Findings. *Ann. Biomed. Eng.* **46**, 525–542 (2018).
104. Bassett, C. A. L., Pawluk, R. J. & Pilla, A. A. ACCELERATION OF FRACTURE REPAIR BY ELECTROMAGNETIC FIELDS. A SURGICALLY NONINVASIVE METHOD. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1974).
105. Heckman, J. D., Ingram, A. J., Loyd, R. D., Luck, J. V. & Mayer, P. W. Nonunion treatment with pulsed electromagnetic fields. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (1981).
106. Hinsenkamp, M., Burny, F., Donkerwolcke, M. & Coussaert, E. Electromagnetic stimulation of fresh fractures treated with Hoffmann® external fixation. *Orthopedics* (1984).
107. Jansen, J. H. W. *et al.* Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: An in vitro study. *BMC Musculoskelet. Disord.* (2010).
108. Giusti, A. *et al.* Short-term effect of low-intensity, pulsed, electromagnetic fields on gait characteristics in older adults with low bone mineral density: A pilot randomized-controlled trial. *Geriatr. Gerontol. Int.* (2013).
109. Martinez-Rondanelli, A. *et al.* Electromagnetic stimulation as coadjuvant in the healing of diaphyseal femoral fractures: A randomized controlled trial. *Colomb. Med.* (2014).
110. Mohammadi, R., Faraji, D., Alemi, H. & Mokarizadeh, A. Pulsed electromagnetic fields accelerate functional recovery of transected sciatic nerve bridged by chitosan conduit: An animal model study. *Int. J. Surg.* (2014).
111. Newberry SJ, FitzGerald J, SooHoo NF, Booth M, Marks J, Motala A, Apaydin E, Chen C, Raaen L, Shanman R, S. P. Treatment of Osteoarthritis of the Knee: An Update Review. *Comp. Eff. Rev.* (2017).

112. Maziarz, A. *et al.* How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts. *Stem Cell Res. Ther.* **7**, 54 (2016).
113. Chao, E. Y. S., Inoue, N., Ripamonti, U. & Fenwick, S. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *European Cells and Materials* (2003).
114. Assiotis, A., Sachinis, N. P. & Chalidis, B. E. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *J. Orthop. Surg. Res.* (2012).
115. Funk, R. H. W., Monsees, T. & Özkucur, N. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. *Prog. Histochem. Cytochem.* **43**, 177–264 (2009).
116. Ganesan, K., Gengadharan, A. C., Balachandran, C., Manohar, B. M. & Puvanakrishnan, R. Low frequency pulsed electromagnetic field-A viable alternative therapy for arthritis. *Indian J. Exp. Biol.* (2009).
117. Veronesi, F. *et al.* In vivo effect of two different pulsed electromagnetic field frequencies on osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* (2014).
118. Fioravanti, A., Nerucci, F., Collodel, G., Markoll, R. & Marcolongo, R. Biochemical and morphological study of human articular chondrocytes cultivated in the presence of pulsed signal therapy [2]. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2002).
119. Wang, J. *et al.* Pulsed electromagnetic field may accelerate in vitro endochondral ossification. *Bioelectromagnetics* (2015).
120. Chang, S. H., Hsiao, Y. W. & Lin, H. Y. Low-frequency electromagnetic field exposure accelerates chondrocytic phenotype expression on chitosan substrate. *Orthopedics* (2011).
121. Chen, C. H. *et al.* Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment in vitro. *J. Appl. Physiol.* **114**, 647–655 (2013).

122. Li, S. *et al.* Magnetic Resonance Spectroscopy for Evaluating the Effect of Pulsed Electromagnetic Fields on Marrow Adiposity in Postmenopausal Women with Osteopenia. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **42**, 792–797 (2018).
123. Clavell, R. S., de Llano, J. J. M., Carda, C., Ribelles, J. L. G. & Vallés-Lluch, A. In vitro assessment of the biological response of Ti6Al4V implants coated with hydroxyapatite microdomains. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **104**, 2723–2729 (2016).
124. De Moor, L., Beyls, E. & Declercq, H. Scaffold Free Microtissue Formation for Enhanced Cartilage Repair. *Ann. Biomed. Eng.* **48**, 298–311 (2020).
125. Durand-Herrera, D. *et al.* Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of microtissues for tissue engineering applications. *Histochem. Cell Biol.* **150**, 379–393 (2018).
126. Yin, H. *et al.* Functional tissue-engineered microtissue derived from cartilage extracellular matrix for articular cartilage regeneration. *Acta Biomater.* **77**, 127–141 (2018).
127. Salvador-Clavell, R. *et al.* Design and experimental validation of a magnetic device for stem cell culture. *Rev. Sci. Instrum.* **91**, 124103 (2020).
128. Vikingsson, L. *et al.* Local deformation in a hydrogel induced by an external magnetic field. *J. Mater. Sci.* (2016).
129. Clara-Trujillo, S. *et al.* Biomimetic microspheres for 3D mesenchymal stem cell culture and characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **177**, 68–76 (2019).
130. Potdar, P. D. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J. Stem Cells* (2015).
131. Homayounfar, N. *et al.* Isolation, characterization, and differentiation of dental pulp stem cells in ferrets. *J. Endod.* **42**, 418–424 (2016).

132. Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B. & Aflatoonian, R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J. Vis. Exp.* (2012).
133. De Ceuninck, F., Lesur, C., Pastoureau, P., Caliez, A. & Sabatini, M. Culture of Chondrocytes in Alginate Beads. in *Cartilage and Osteoarthritis* 015–022 (Humana Press, 2004).
134. Im, G. II. Clinical use of stem cells in orthopaedics. *Eur. Cells Mater.* (2017).
135. Kristjánsson, B. & Honsawek, S. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *World Journal of Orthopaedics* (2017).
136. Fernandes, T. L. *et al.* Systematic Review of Human Dental Pulp Stem Cells for Cartilage Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* **26**, 1–12 (2020).
137. Koh, E., Jung, Y. C., Woo, H. M. & Kang, B. J. Injectable alginate-microencapsulated canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for enhanced viable cell retention. *J. Vet. Med. Sci.* **79**, 492–501 (2017).
138. van Caam, A. P., Madej, W., van Beuningen, H. M., Blaney Davidson, E. N. & van der Kraan, P. M. TGF-beta blocks chondrocyte hypertrophy and maintains cell viability in cultured cartilage explants but does not protect against proteoglycan loss. *Osteoarthr. Cartil.* (2015).
139. Rogan, H., Ilagan, F. & Yang, F. Comparing Single Cell Versus Pellet Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Hydrogels for Cartilage Regeneration. *Tissue Eng. - Part A* **25**, 1404–1412 (2019).
140. Mata, M. *et al.* In Vivo Articular Cartilage Regeneration Using Human Dental Pulp Stem Cells Cultured in an Alginate Scaffold: A Preliminary Study. *Stem Cells Int.* **2017**, 1–9 (2017).

141. Wang, T. & Yang, F. A comparative study of chondroitin sulfate and heparan sulfate for directing three-dimensional chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* (2017).
142. Vega Álvarez, J. A., García-Suárez, O., Fernández Monjil, D. & Del Valle Soto, M. E. Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev. Ortop. y Traumatol.* (2002).
143. Tare, R. S., Howard, D., Pound, J. C., Roach, H. I. & Oreffo, R. O. C. Tissue engineering strategies for cartilage generation-Micromass and three dimensional cultures using human chondrocytes and a continuous cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005).
144. Steudler, S. & Bley, T. *Filaments in Bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (2015).
145. Vaca-González, J. J., Gutiérrez, M. L. & Garzón-Alvarado, D. A. Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales. *Rev. Colomb. Ortop. y Traumatol.* **31**, 202–210 (2017).
146. Steudler, S. & Bley, T. *Filaments in Bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (2015).
147. Zhang, L. *et al.* Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol. Lett.* **32**, 1339–1346 (2010).
148. Kim, I. L., Mauck, R. L. & Burdick, J. A. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials* (2011).
149. Lee, S., Lee, K., Kim, S. H. & Jung, Y. Enhanced cartilaginous tissue formation with a cell aggregate-fibrin-polymer scaffold complex. *Polymers (Basel)*. (2017).

150. Taraballi, F., Bauza, G., McCulloch, P., Harris, J. & Tasciotti, E. Concise Review: Biomimetic Functionalization of Biomaterials to Stimulate the Endogenous Healing Process of Cartilage and Bone Tissue. *Stem Cells Translational Medicine* (2017).
151. LaPorta, T. F., Richter, A., Sgaglione, N. A. & Grande, D. A. Clinical Relevance of Scaffolds for Cartilage Engineering. *Orthopedic Clinics of North America* (2012).
152. Johnstone, B. *et al.* Tissue engineering for articular cartilage repair - The state of the art. *Eur. Cells Mater.* (2012).
153. Torras, N., García-Díaz, M., Fernández-Majada, V. & Martínez, E. Mimicking epithelial tissues in three-dimensional cell culture models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **6**, 1–7 (2018).
154. Schneeberger, K. *et al.* Converging biofabrication and organoid technologies: the next frontier in hepatic and intestinal tissue engineering? *Biofabrication* **9**, 013001 (2017).
155. Mayer-Wagner, S. *et al.* Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* (2011).
156. Hu, N. *et al.* Chondrogenic induction of human osteoarthritic cartilage-derived mesenchymal stem cells activates mineralization and hypertrophic and osteogenic gene expression through a mechanomiR. *Arthritis Res. Ther.* **21**, (2019).
157. Bae, S. W. *et al.* 3D bioprinted artificial trachea with epithelial cells and chondrogenic-differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–14 (2018).
158. Fernández-Muiños, T. *et al.* Bimolecular based heparin and self-assembling hydrogel for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* (2015).

159. Suryani, L. *et al.* Effects of electromagnetic field on proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3 Cells. *Tissue Eng. - Part C Methods* **25**, 114–125 (2019).
160. Negi, H. *et al.* In Vitro Safety and Quality of Magnetically Labeled Human Mesenchymal Stem Cells Preparation for Cartilage Repair. *Tissue Eng. - Part C Methods* **25**, 324–333 (2019).
161. Ribeiro, C., Correia, V., Martins, P., Gama, F. M. & Lanceros-Mendez, S. Proving the suitability of magnetoelectric stimuli for tissue engineering applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2016).
162. Martinez-Riaza, L., Herrero-Gonzalez, H., Lopez-Alcorocho, J. M., Guillen-Garcia, P. & Fernandez-Jaen, T. F. Epidemiology of injuries in the Spanish national futsal male team: A five-season retrospective study. *BMJ Open Sport Exerc. Med.* **2**, 4–9 (2017).
163. Guillén-García, P. *et al.* Increasing the Dose of Autologous Chondrocytes Improves Articular Cartilage Repair. *Cartilage* **5**, 114–122 (2014).
164. Lin, S. *et al.* Synergistic effects on mesenchymal stem cell-based cartilage regeneration by chondrogenic preconditioning and mechanical stimulation. *Stem Cell Res. Ther.* (2017).
165. Ain, N. U., Makitie, O. & Naz, S. Autosomal recessive chondrodysplasia with severe short stature caused by a biallelic COL10A1 variant. *J. Med. Genet.* **55**, 403–407 (2018).

**ANEXOS**

# 1. Financiación

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se contó con fondos del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades dentro del proyecto MAT 2016-76039-C4-2-R (*Diferenciación condrogénica de células cultivadas en interfases eléctricamente activas*).

## 2. Fichas de calidad hADSC y hDPSC

Lonza Walkersville Inc.  
8830 Biggs Ford Road  
Walkersville, MD 21793 8415  
Tel (301) 898 7025  
Fax (301) 845 4024

# Lonza

Printed on, 17-Nov-2016 08:35

Page 1 / 1

### CERTIFICATE OF ANALYSIS

**Product Code:** PT-5006 **Lot Number:** 0000543947  
**Product:** Adipose-Derived Stem Cells (Amp) **Manufacture Date:** 20-Apr-2016

TEST (Method)	SPECIFICATIONS		Results
	Min.	Max.	
Tissue Acquisition Number	***	***	29738
DONOR CHARACTERISTICS			
Age	***	***	55 Y
Sex	***	***	MALE
Race	***	***	C
BMI	***	***	23
VIRUS TESTING			
HIV Test	***	***	Not Detected
HBV Test	***	***	Not Detected
HCV Test	***	***	Not Detected
MICROBIAL TESTING			
Sterility Test	***	***	Negative
Mycoplasma	***	***	Negative
CELL PERFORMANCE TESTING			
Cell Passage Frozen			1
Viability	>=70%	***	96 %
Cell Count (Cells/ml)	>=1,000,000	***	2240000
Seeding Efficiency	>=20%	***	43 %
Doubling Time (hours)	15	70	19 hrs
CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166	>=90% Positive	***	Pass
CD14, CD31, CD45	<=5% Positive	***	Pass
CD34	% Positive FIO	***	11 %

These cells were isolated from donated human tissue after obtaining permission for their use in research applications by informed consent or legal authorization. This product is for research use only. Details concerning the use of our cell and media products can be downloaded from our website at [www.lonza.com/cell-protocols](http://www.lonza.com/cell-protocols).

This lot has been reviewed by Quality Assurance in compliance with requirements of Lonza's Quality System.  
This document was generated from a validated Part 11-compliant electronic system and thus handwritten signatures are not required.

For Technical Assistance, call 1-800-521-0390

Lonza Walkersville Inc.  
8830 Biggs Ford Road  
Walkersville, MD 21793 8415  
Tel (301) 898 7025  
Fax (301) 845 4024

# Lonza

Printed on, 17-Nov-2016 08:37

Page 1 / 1

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**Product Code:** PT-5025  
**Product:** Human Dental Pulp  
Stem Cells 1M

**Lot Number:** 0000361427  
**Manufacture Date:** 21-Mar-2013

TEST (Method)	SPECIFICATIONS		Results
	Min.	Max.	
Tissue Acquisition Number	***	***	25885
DONOR CHARACTERISTICS			
Age	***	***	16 Y
Sex	***	***	MALE
Race	***	***	UNKNOWN
VIRUS TESTING			
HIV Test	***	***	Not Detected
HBV Test	***	***	Not Detected
HCV Test	***	***	Not Detected
MICROBIAL TESTING			
Sterility Test	***	***	Negative
Mycoplasma	***	***	Negative
CELL PERFORMANCE TESTING			
Viability	>=70%	***	86 %
Cell Count (cells/vial)	>=1x10E+6	***	1470000
Total Population Doublings	>=10	***	13
Seeding Efficiency	>=25%	999	92 %
CD34, CD45, & CD133	***	<=10%	< 10.0 %
CD105, CD166, CD29, CD90, & CD73	>=90%	***	> 90.0 %

These cells were isolated from donated human tissue after obtaining permission for research use by informed consent or legal authorization. This product is for research use only. Details concerning the use of our cell and media products can be downloaded from our website at [www.lonza.com/cell-protocols](http://www.lonza.com/cell-protocols).

This lot has been reviewed by Quality Assurance in compliance with requirements of Lonza's Quality System.

This document was generated from a validated Part 11-compliant electronic system and thus handwritten signatures are not required.

For Technical Assistance, call 1-800-521-0390

### 3. Programa para la ejecución del motor del EMFGS

PG 100

LB P1

P=0

MR 2140000 'Muestra 1 (1° estimulación, 20 min)

H

SL 0 'Empiezan los primeros 10 min

H 60000

SL 0

H 60000

SL 0 'Terminan los primeros 10 min

x2 (#)

(##)

MR 710000 'Muestra 2 (1° estimulación, 20 min)

H

**(#)**

**(##)**

MR 730000 'Muestra 3 (1° estimulación, 20 min)

H

**(#)**

MR -1440000 'Muestra 1 (2° estimulación, 20 min)

H

**(##)**

MA 0 'Vuelva al origen

H

PR P

E

PG

EX P1

## 4. Protocolo de uso del EMFGS



### PROTOCOLO DE USO DEL IMÁN

por Rubén Salvador i Clavell



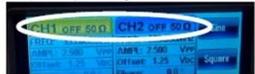
**ADVERTENCIA!!!** → bajo ningún concepto dejar que se acerque una persona con marcapasos o dispositivos electrónicos implantados en su cuerpo al imán.

DEPARTAMENT DE PATOLOGIA  
Facultat de Medicina i Odontologia – Universitat de València

### PROTOCOLO DE USO DEL IMÁN

1. Enchufar la regleta del imán a la corriente eléctrica.
2. Encender el PC del imán (tanto el monitor como la torre del PC están nombrados como "monitor imán" y "PC imán"; asegurarse de que los cables de alimentación están enchufados a la corriente eléctrica).
3. Mientras se enchufa el PC, encender el imán siguiendo el procedimiento siguiente:
  - 1) Encender el generador de señales apretando el botón "POWER".



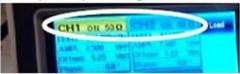
- 2) Si en pantalla aparece lo siguiente:
 

Darle a "OUTPUT". Todo seguido, apretar en "CH1/CH2", y volver a apretar "OUTPUT".



1

Esto hará que en la pantalla aparezca lo siguiente:



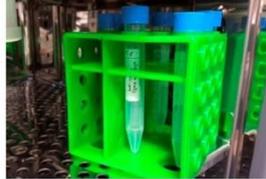
- 3) Una vez con los canales CH1 y CH2 en "ON", encender las 2 fuentes de alimentación dándole al botón "POWER":
 
- 4) Y finalmente, apretar en estos dos aparatos el botón "OUTPUT":
 

CON TODO LO ANTERIOR, EL IMÁN ESTÁ YA EN FUNCIONAMIENTO.

2

4. Colocar las muestras en el portamuestras que hay en la bandeja unida al tornillo sinfin del motor en el imán. Para ello, seguir los pasos siguientes:
  - 1) Las muestras están en el incubador. Se encuentran en eppendorfs de 500 µL, los cuales están abiertos dentro de falcons de 15 mL. Extraer los eppendorf con pinzas previamente flameadas, y taparlos con sus tapas correspondientes (que se encontrarán en su mismo falcon).
 

**ATENCIÓN:** los falcons no están roscados, para permitir el paso de oxígeno a las muestras. Así pues, hay que tener cuidado al sacarlos (para que no caiga la tapa al suelo). Meterlos inmediatamente en la campana de flujo laminar, junto con la gradilla para mejor manejo de las muestras.


  - 2) Una vez los eppendorfs con las muestras (1.1, 1.2 y 1.3) estén tapados, se sacan de la campana y se ponen en el portamuestras siguiendo el orden:
    - a. Eppendorf 1.1 en el hueco 1 del portamuestras
    - b. Eppendorf 1.2 en el hueco 2 del portamuestras
    - c. Eppendorf 1.3 en el hueco 3 del portamuestras

(Dejar los falcon de las muestras restantes sin roscar con la tapa y en el incubador, y los falcon vacíos dejarlos roscados con la tapa en el incubador también)

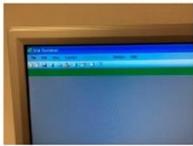
3

5. Con el PC enchufado y ya listo para usarse, abrir el programa "SEM Terminal":



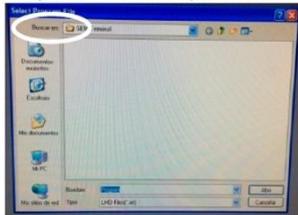
6. Con el programa abierto, se pueden dar 2 situaciones:

6.1. Que aparezca la siguiente imagen (ninguna ventana abierta dentro del programa):



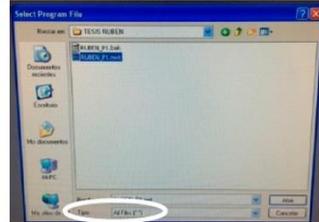
En este caso, seguir el procedimiento siguiente:

1) File > Open → abrirá una ventana de búsqueda de archivos.



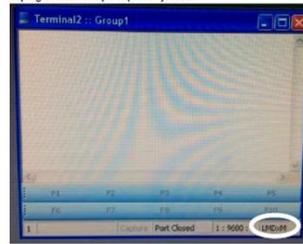
4

Tenemos que buscar la carpeta "TESIS RUBEN" que se sitúa en el escritorio y entrar en ella. Una vez dentro, seleccionar "All Files" en "Tipo".



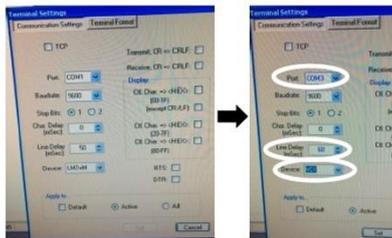
Aparecerá un archivo llamado "RUBEN\_P1.mxt". Lo abrimos. Este es el programa que se ejecutará para que el motor del imán funcione.

2) View > New Terminal → abre un terminal, donde cargaremos a continuación el programa abierto para que se ejecute.



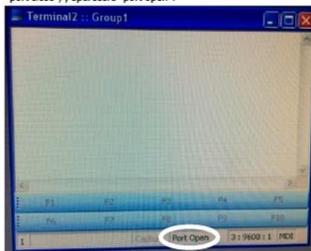
5

Hay que modificar los parámetros siguientes, haciendo doble click donde se indica con el círculo en la imagen anterior:



Apretar en "Set" para aplicar los cambios.

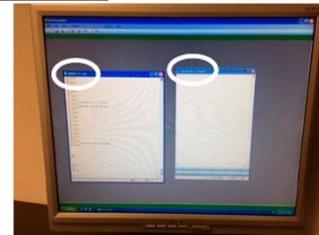
3) Finalmente abrir el puerto del Terminal. Para ello hacemos doble click en "port close", y aparecerá "port open".



6

4) Transfer > To Terminal o Transfer > From RUBEN\_P1 → (lo que aparezca). Apretar en "Download". Esto cargará el programa al Terminal, y automáticamente lo ejecutará.

6.2. O que aparezca la siguiente imagen (con las ventanas de "RUBEN\_P1.mxt" y de "Terminal" abiertas):



En este caso, hacer:

Transfer > To Terminal o Transfer > From RUBEN\_P1 → (lo que aparezca). Apretar en "Download". Esto cargará el programa al Terminal, y automáticamente lo ejecutará.

AHORRA EL PROGRAMA SE ESTÁ EJECUTANDO, POR LO QUE DARÁ LAS ÓRDENES AL MOTOR DEL IMÁN PARA QUE FUNCIONE Y MUEVA EL PORTAMUESTRAS CON LAS MUESTRAS A IRRADIAR.

7

### APAGADO DEL IMÁN

Una vez el programa ha parado y el portamuestras ha vuelto a la posición inicial, se puede apagar ya el imán y el PC. Para ello se procede:

1. Apretar el botón "output" en las 2 fuentes de alimentación:



2. Y todo seguido, apagar estos mismos aparatos, apretando en el botón "Power".
3. Poner los canales del generador de señales en OFF. Para ello, apretar en "output", después en "CH1/CH2" y finalmente en "output" de nuevo:



4. Y finalmente apagar este aparato dándole al botón "Power".
5. Desconectar de la corriente eléctrica la regleta del imán.
6. Cerrar el programa "SEM Terminal" directamente, sin guardar nada. Y apagar el PC y el monitor.
7. Por último, guardar las muestras de nuevo en el inubador, abriendo los eppendorf dentro de la campana e introduciéndolos en sus falcon correspondientes, dejando sin rosca la tapa. (Dejar la tapa del eppendorf dentro de su falcon correspondiente también).

8

### DATOS DE CONTACTO:

Rubén Salvador Clavell

676 432 058

rubensalvadorclavell@gmail.com

rusalca@alumni.uv.es

9

## 5. Análisis estadístico mediante R

### CASO 1: Determinación de tiempos EMF

```

rm (list = ls ())
ls()
#1.IMPORTACIÓN DE DATOS Y CREACIÓN DE SUBDATOS
datos <- read.csv("determ_tiempos_EMF_estadist.csv", header = T, sep = ";", dec = ",")
for (i in 2:ncol(datos)) {
  datos1 <- paste("datos", colnames(datos[i]), sep = "_")
  datos_t <- as.factor(datos[,1])
  datos2 <- data.frame(datos_t, datos[,i])
  colnames(datos2) <- c("tiempo", colnames(datos[i]))
  assign(datos1, datos2)
}
#2.TEST DE NORMALIDAD (SHAPIRO) Y TEST DE HOMOCEASTICIDAD (BARTLETT)
estadist_gen <- function(datos_gen){
  gen=datos_gen[,2]
  norm_pvalue <- c()
  for (i in 1:7) {
    normalidad <- shapiro.test(gen[datos_gen$tiempo==i])
    norm_pvalue[i] <- c(normalidad$p.value)
  }
  tiempos <- c("Normalidad_t=0", "1h", "6h", "24h", "3d", "7d", "14d")
  results <- data.frame(rbind(colnames(datos_gen[2]), tiempos, norm_pvalue))
  colnames(results) <- c()
  rownames(results) <- c()
  homocedast <- bartlett.test(gen ~ datos_gen$tiempo)
  result_homo <- c(colnames(datos_gen[2]), "Homocedasticidad", homocedast$p.value)
  results1 <- cbind(results, result_homo)
  nombre <- paste("norm_homoced", colnames(datos_gen[2]), sep = "_")
  nombrecsv <- paste(nombre, "csv", sep = ".")
  write.csv2(results1, file = nombrecsv, row.names = F)
  return(list(results1, summary(anova), intervals))
}

```

```

#3.ANOVA ONE-WAY (ACAN, COL1A1, VEGFA)
anova <- aov( lm(datos_ACAN$ACAN ~ datos_ACAN$tiempo) )
summary(anova)
qf(0.05, 7-1, 21-7, lower.tail = FALSE)
#3.1.VALIDACIÓN ANOVA MEDIANTE RESIDUOS
shapiro.test(anova$residuals)
bartlett.test(anova$residuals ~ datos_ACAN$tiempo)
#3.2.COMPARACIONES MÚLTIPLES (TEST DE TUKEY)
intervals <- TukeyHSD(anova)
intervals
#SI NO SE CUMPLEN CONDICIONES DEL ANOVA (SOX9, COL2A1, COL10A1, HIF1A1)
#4.TEST DE KRUSKAL
qchisq(0.05, 7-1, lower.tail = FALSE)
kruskal.test(datos_SOX9$SOX9, datos_SOX9$tiempo)
kruskal.test(datos_COL2A1$COL2A1, datos_COL2A1$tiempo)
kruskal.test(datos_COL10A1$COL10A1, datos_COL10A1$tiempo)
kruskal.test(datos_HIF1A1$HIF1A1, datos_HIF1A1$tiempo)
#4.1.COMPARACIONES MÚLTIPLES (TEST DE KRUSKAL-NEMENYI)
library(PMCMR)
posthoc.kruskal.nemenyi.test(datos_COL2A1$COL2A1, datos_COL2A1$tiempo, method = "Chisq")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(datos_COL10A1$COL10A1, datos_COL10A1$tiempo, method = "Chisq")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(datos_HIF1A1$HIF1A1, datos_HIF1A1$tiempo, method = "Chisq")

```

## CASO 2: Estimulación de microtejidos mediante EMF

```

library("dplyr")
library("rstatix")
library("emmeans")
rm (list = ls ())
ls()
#1.IMPORTACIÓN DE DATOS Y CREACIÓN DE SUBDATOS
datos <- read.csv("datos_para_estadist_ampliado.csv", header = T, sep = ";", dec = ",")
for (i in 3:ncol(datos)) {
  datos1 <- paste("datos", colnames(datos[i]), sep = "_")
  datos_t <- data.frame(as.factor(datos[,1]), as.factor(datos[,2]))
  datos2 <- data.frame(datos_t, datos[,i])

```

```

colnames(datos2) <- c("tiempo", "tratamiento", colnames(datos[i]))
assign(datos1, datos2)
}
#2.TEST DE NORMALIDAD (SHAPIRO) Y TEST DE HOMOCEASTICIDAD (LEVENE)
estadist_gen <- function(datos_gen){
  colnames(datos_gen)[3] <- "gen"
  normalidad <- datos_gen %>%
    group_by(tiempo, tratamiento) %>%

    shapiro_test(gen) #normalidad de datos
  homoced <- datos_gen %>%
    levene_test(gen ~ tiempo*tratamiento) #homocedasticidad
  return(list(normalidad, homoced))
}
#3.ANOVA TWO-WAY (SOX9, COL2A1, VEGFA, HIF1A1) Y VALIDACIÓN
datos_anova <- aov(datos_SOX9$SOX9 ~ datos_SOX9$tiempo * datos_SOX9$tratamiento)
summary(datos_anova)
eta_squared(datos_anova)
#3.1.TEST DE EMMEANS
signific <- datos_SOX9 %>%
  group_by(tratamiento) %>%
  emmeans_test(SOX9 ~ tiempo)

signific
signific2 <- datos_SOX9 %>%
  group_by(tiempo) %>%
  emmeans_test(SOX9 ~ tratamiento)

signific2
#SI NO SE CUMPLEN CONDICIONES DEL ANOVA (ACAN, COL1A1, COL10A1)
#4.ANOVA TWO-WAY
datos_anova <- aov(datos_ACAN$ACAN ~ datos_ACAN$tiempo * datos_ACAN$tratamiento)
summary(datos_anova)
#4.1TEST DE EMMEANS
modelo <- lm(datos_ACAN$ACAN ~ datos_ACAN$tiempo * datos_ACAN$tratamiento, data =
datos_ACAN)
datos_ACAN %>%
  emmeans_test(

```

```
        ACAN ~ tiempo,  
        model = modelo  
    )  
datos_ACAN %>%  
  emmeans_test(  
    ACAN ~ tratamiento,  
    model = modelo  
  )
```

## **6. Solicitud de permisos para la reproducción de imágenes**

Todas las imágenes con derechos han sido reproducidas tras solicitar permiso a las respectivas editoriales e investigadores o investigadoras principales.