

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 659**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2011 PCT/NL2011/050486**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12005580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11736183 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2590744**

54 Título: **Sistema multipocillo de alto rendimiento para cultivar constructos tisulares tridimensionales in vitro o in vivo, procedimiento para producir dicho sistema multipocillo y procedimientos para preparar constructos tisulares tridimensionales a partir de células usando dicho sistema multipocillo**

30 Prioridad:

06.07.2010 EP 10168610

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.03.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT MAASTRICHT (100.0%)
Minderbroedersberg 4-6
6211 LK Maastricht, NL**

72 Inventor/es:

**HIGUERA, GUSTAVO ANDRES;
MORONI, LORENZO y
VAN BLITTERSWIJK, CLEMENS ANTONI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 706 659 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

5 Sistema multipocillo de alto rendimiento para cultivar constructos tisulares tridimensionales *in vitro* o *in vivo*, procedimiento para producir dicho sistema multipocillo y procedimientos para preparar constructos tisulares tridimensionales a partir de células usando dicho sistema multipocillo

CAMPO

10 La presente invención se engloba en el campo de medios para el cultivo celular y más específicamente en el campo de medios para cultivar constructos tisulares tridimensionales. La presente invención se engloba también en el campo de sistemas de micropocillos como herramientas de ensayo en laboratorios de investigación analítica y de ensayo.

ANTECEDENTES

15 El cultivo de células en artículos de plástico planos da como resultado láminas artificiales bidimensionales de células. Las células normales experimentan en el cuerpo humano un entorno tridimensional (3D), estando completamente rodeadas por otras células, membranas, capas fibrosas y proteínas de adhesión. Muchos ensayos basados en células completas que se usan actualmente se basan en sustratos de vidrio o plástico planos bidimensionales (2D) que pueden no producir resultados característicos de las condiciones *in vivo*. El valor de los ensayos celulares 2D es limitado, porque estos ensayos no imitan completamente la respuesta de las células en el medio 3D presente en un tejido en vivo. Esto puede causar una falta de predictibilidad de dichos ensayos 2D.

20 Se han estudiado diversos procedimientos y materiales para crear microentornos. Hasta la fecha, estos esfuerzos han sido impredecibles, lo que indica que no se comprenden completamente todos los parámetros relevantes que influyen en el desarrollo de estructuras 3D en condiciones de cultivo.

25 Se ha descrito un sistema en el que se incorporan esqueletos poliméricos sintéticos 3D a placas de cultivo celular estándar que fomentan la formación de cultivos 3D (Ke Cheng et al., Biomaterials 29 (2008), 2802-2812). Estos ensayos requieren recipientes basados en células 3D, que se fabrican mediante moldeo por fundición de una capa fina de esqueletos poliméricos porosos sobre el fondo de vidrio de un recipiente de cultivo celular ordinario. Los esqueletos 3D están fijados en los recipientes. Utilizando robots para la manipulación de líquidos, esta fabricación de recipientes 3D se puede aplicar para modificar la mayor parte de los recipientes de cultivo celular 2D disponibles actualmente, tales como placas de 24 pocillos, 96 pocillos y 384 pocillos para el cultivo celular 3D y el uso de ensayos basados en células. Una desventaja de este enfoque es la dependencia de las placas de pocillos existentes que tienen un fondo de vidrio. Además, estos ensayos requieren muchas células por pocillo, una cantidad relativamente grande de medio y, por lo tanto, también una gran cantidad de compuestos de ensayo. El documento WO2007/022026 divulga que pueden cultivarse células de mamífero en un esqueleto apropiado en los orificios pasantes de una pletina.

30 El documento WO01/19502 divulga un procedimiento para producir un dispositivo de filtro de membrana multipocillo proporcionando un soporte preformado, retirando material del soporte para formar orificios pasantes alineados y laminando una membrana al soporte para formar los pocillos. Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar un sistema multipocillo que tenga las siguientes ventajas:

- 35 - Que requiera una cantidad mínima de compuestos de ensayo y células.
- Que sea adecuado para un cribado de alto rendimiento
- 40 - Que permita la formación de cultivos tisulares 3D.

SUMARIO DE LA INVENCION

55 Por lo tanto, la invención proporciona un sistema multipocillo, que comprende pocillos que tienen un volumen de entre 0,125 y 4,0 mm³. Dicho sistema multipocillo está fabricado de un material biocompatible. De forma más preferida, dicho material biocompatible es un material que ha sido aprobado para su uso en un animal por una autoridad legal, preferentemente la FDA o la EMEA. De forma más preferida, dicho material biocompatible es poli(ácido láctico), PEOT/PBT. En una forma de realización preferida, dichos pocillos tienen un diámetro interior superior a 0,5 mm. Dicho sistema multipocillo no comprende un esqueleto polimérico sintético 3D.

60 La invención proporciona también un procedimiento para producir un sistema multipocillo según la invención, en el que dicho sistema multipocillo se produce por extrusión. Dicho procedimiento comprende las etapas siguientes: fundir dicho material biocompatible en una camisa térmica; extrudir el material biocompatible fundido a presión a través de una boquilla para formar una fibra trazada; se repite la etapa b, depositando una fibra trazada subsiguiente en paralelo a una distancia de entre 0,125 y 4,0 mm junto a la última fibra depositada hasta que se forma una capa; se deposita una capa subsiguiente sobre la capa previa, depositándose las fibras que forman dicha capa

subsiguiente en un ángulo preferentemente de entre 10 y 90 grados con respecto a las fibras de la capa previa; repetir dicha etapa en la que dicha capa subsiguiente se deposita hasta que se alcanza la altura deseada.

La invención proporciona también un procedimiento para preparar un constructo tisular 3D a partir de células, que comprende las etapas siguientes: introducir un medio que comprende células en un sistema multipocillo según la invención y cultivar las células para obtener un constructo tisular 3D. Preferentemente, el medio comprende al menos 4000 células. Se pueden usar cualesquiera células que sean capaces de formar tejidos tridimensionales (3D) *in vivo*. Preferentemente, las células son células madre, preferentemente células madre mesenquimales humanas (hMSC), o condrocitos.

En una forma de realización preferida, dichas células son de un primer tipo de células y se introducen células de un segundo tipo en el pocillo y se cultivan conjuntamente con las células del primer tipo de células en la etapa b, estimulando las células del segundo tipo el crecimiento de las células del primer tipo en la formación de dicho constructo tisular 3D.

Preferentemente, los constructos tisulares 3D se forman en 2 o más pocillos del sistema multipocillo, aplicándose diferentes condiciones de cultivo a los 2 o más pocillos.

La invención proporciona además un animal no humano que comprende un sistema multipocillo según la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra tres ejemplos de sistemas multipocillo según la invención en los que los pocillos se diseñaron en una disposición de matriz (columnas x filas). La figura 1A representa una vista tridimensional de una matriz de 10 x 10. La figura 1B muestra una vista desde arriba de un sistema multipocillo con pocillos rectangulares. La figura 1C muestra la sección transversal de un diseño multipocillo en el que el fondo y los lados están cerrados, y la parte superior está abierta. La figura 1D representa la sección transversal de otro diseño multipocillo que consiste en una matriz de 10 x 10 de doble cara. Los pocillos son rectangulares y tienen una parte superior y un fondo abiertos y una capa de material en el medio. La figura 1E muestra la sección transversal de un tercer diseño multipocillo combinado con electrohilado. El fondo y los lados de cada pocillo están cerrados y se introduce una capa de fibras electrohiladas como capa intermedia. Las medidas indicadas se encuentran en micrómetros. Estas medidas y estos diseños son solo ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

La figura 2 muestra un procedimiento para producir un sistema multipocillo según la invención. En esta figura, se muestra el proceso de extrusión. En la figura 2A se muestra cómo se extruye una fibra trazada. Un material se funde en una camisa térmica (c) conectada a una tapa presurizada (b) y una jeringa calentada, y se aplica presión (preferentemente aproximadamente 4 bares) a través de un flujo de nitrógeno (a). Esto hace que el material fluya y se extruya en forma de fibra, dando como resultado una fibra trazada (e). Una multitud de fibras trazadas en paralelo unas con otras en el mismo plano horizontal (en el eje Z) juntas forman una capa. La figura 2C muestra diferentes arquitecturas como resultado de la variación de los ángulos de las fibras depositadas de una capa con respecto a las fibras de la capa previa. (i) y (k) son ejemplos de arquitecturas rectangulares, mientras que (j) y (l) son ejemplos de arquitecturas obtenidas cuando los ángulos de las fibras son de 45°.

La figura 3 muestra la importancia de las dimensiones del pocillo. Las dimensiones del pocillo se seleccionaron según dos criterios: El primero es la capacidad de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) para formar un constructo tridimensional. El segundo es la facilidad de manipulación de los pocillos del sistema multipocillo por parte del usuario. En las figuras A, B y C, "M" significa material, "w" significa pocillo, las células madre están teñidas de azul. Barras de escala igual a 0,5 mm. Cada figura muestra hMSC en cultivo durante dos días en pocillos de diferentes dimensiones de los ejes XYZ: (A) 0,5 mm x 0,5 mm x 0,5 mm, (B) 1 mm x 1 mm x 1,8 mm, (C) 1,5 mm x 1,5 mm x 1,8 mm. Cada pocillo se sembró con 250.000 hMSC/pocillo. En base a las figuras A, B y C, se determinó que: (A) las hMSC podían formar una estructura 3D dependiendo del tiempo de cultivo y del tamaño del pocillo, (B) El tamaño del pocillo de la figura B fue el más sencillo de manipular por los usuarios. El tamaño del pocillo de la figura B se diseñó basándose en la punta de una pipeta de 2,5 µl (Plastibrand, diámetro exterior de 0,5 mm), que nos permitió colocar la punta dentro del pocillo y disponer 0,8-1 µl de suspensión celular en cada pocillo. Además, el diseño en la figura B mejoró la manipulación visual y manual sin necesidad de microscopios. Los pocillos con un volumen superior a 3 mm³ fueron más fáciles de manipular, pero requirieron tiempos de cultivo superiores para obtener constructos 3D con el mismo número de hMSC. Los pocillos inferiores a 0,25 mm³ (figura 3A) fueron más difíciles de manipular. El equilibrio óptimo entre manipulación, número de células requeridas y tiempo de cultivo lo proporcionaron los pocillos de entre 1,0 y 3,0 mm³. En conclusión, los pocillos de la figura B (aproximadamente 1 x 1 x 1,8 mm) tienen las mejores características de manipulación y dan como resultado el tiempo de cultivo más deseable para inducir hMSC en constructos tisulares 3D.

La figura 4 muestra hMSC cultivadas durante 10 días en un disco fabricado de PEOT/PBT. En este experimento, se sembraron 300.000 hMSC por disco. Esto muestra que independientemente de la duración del tiempo de cultivo, las hMSC no forman un constructo tisular 3D. La barra es igual a 0,5 mm. Las hMSC están teñidas de azul (azul de metileno).

5 La figura 5 muestra la influencia de un número diferente de células. (Preferentemente) se sembraron hMSC en cada pocillo. Esta figura muestra las diluciones celulares después de 4 días de cultivo. Los constructos tisulares 3D presentes en los pocillos dependen del número de células y del tiempo. Utilizamos la dependencia del tiempo para establecer parámetros experimentales para obtener constructos tisulares en 3D: 25.000 células fue el número más alto de hMSC sembradas por pocillo; las hMSC se cultivaron en pocillos durante 4-7 días. La barra es igual a 0,5 mm.

10 La figura 6 muestra constructos de hMSC 3D en pocillos sembrados inicialmente con 25.000 y 12.000 células/pocillo después de 5 días de cultivo. Las figuras A-B muestran la tinción de los núcleos celulares y las figuras C-D muestran la tinción de células en proliferación. Esto muestra cómo podemos usar el tiempo y el número de células para determinar el tamaño y el estado de los constructos de hMSC 3D en cada pocillo. Barra de escala: 100 µm.

15 La figura 7 ilustra un procedimiento para cultivar células en un animal. Fabricamos un sistema multipocillo de forma rectangular (3 x 3) según la invención con pocillos de 1 mm x 1 mm x 2 mm y sembramos tres tipos de células diferentes y un cocultivo en cuatro sistemas multipocillo para un total de cuatro condiciones de cultivo diferentes. Para cada tipo de célula, se sembraron 3 diluciones celulares: 1x, 2x y 4x para un total de tres diluciones diferentes por triplicado. 1x es igual a 25.000 células. El cocultivo se sembró en cada una de las tres columnas con relaciones de hMSC:condrocitos bovinos primarios de 0:1, 0,5:0,5 y 1:0. Después de 4 días de cultivo *in vitro*, cada sistema multipocillo que tenía las diferentes diluciones se implantó en uno de cuatro bolsillos/ratón en un total de 10 ratones. Por lo tanto, en cada bolsillo del ratón, teníamos una condición de cultivo y 3 diluciones.

20 La figura 8 muestra un canal de pocillos sembrado con 12.500 hMSC, implantado en un ratón y explantado (retirado) después de un mes. Esto muestra cómo el tejido del ratón penetra bien después de 1 mes de implantación. La tinción se realiza utilizando tricómico de Masson.

25 La figura 9 muestra que los sistemas multipocillo pueden estar fabricados de diferentes materiales y con diferentes arquitecturas. La flecha blanca indica el tamaño de la punta de la pipeta que encaja en un pocillo. A: Vista superior de 1024 pocillos de una matriz de 32 x 32 fabricada de PEOT/PBT de composición 300/55/45. B: Vista superior de 100 pocillos de una matriz de 10 x 10 fabricada de PEOT/PBT de composición 1000/70/30. C: Vista superior de 100 pocillos de una matriz de 10 x 10 fabricada de poli(ácido láctico). D: Vista superior de 100 pocillos de una matriz de 10 x 10 fabricada de alginato (en PBS). E: Sección transversal de una matriz doble con una capa polimérica intermedia y lados superior e inferior abiertos de composición 300/55/45 de PEOT/PBT. F: Sección transversal de pocillos fabricados de PEOT/PBT 300/55/45 con una capa porosa en el centro. Capa inferior cerrada y una parte superior abierta. Barra de escala: 1 mm. G: Vista superior de un pocillo compuesto por PEOT/PBT de 300/55/45. Los lados y la primera capa se imprimieron en 3D y se introdujo una capa de fibras electrohiladas a la mitad de la altura del pocillo. H: Pocillos rectangulares producidos por estereolitografía. I: Pocillos redondos producidos por estereolitografía. J: Pocillos redondos estampados a través del eje XY de la macromatriz y producidos con estereolitografía.

30 La figura 10 muestra los resultados de cuatro condiciones de siembra en una macromatriz de 3 x 3 y de implante en ratones. 1X era equivalente a 25.000 células sembradas por pocillo. 25.000 células fue la mayor cantidad de células sembradas en un pocillo. A: hMSC. B: hMSC diferenciadas. C: PBC. D: Cocultivo hMSC:PBC en tres relaciones 0:1, 0,5:0,5, 1:0. E: Ejemplo de imagen utilizada para la cuantificación del área del tejido dentro de cada pocillo. La imagen encaja en el área contenida en un pocillo utilizando el material de macropocillo como referencia. Barra de escala: 1 mm.

35 La figura 11 muestra el análisis de regresión lineal del área del tejido frente a las cantidades de células en las semanas 2 y 4. A: hMSC. B: hMSC diferenciadas. C: Condrocitos primarios. Significancia estadística $p < 0,05$.

40 La figura 12 muestra el análisis estadístico de la cuantificación del área del tejido en cada pocillo de todas las subcondiciones implantadas. Cada subcondición está representada por un número referenciado en la tabla 1. A: diagrama de recuadros de ANOVA de todas las subcondiciones. B: Ensayo de comparación múltiple de medias de todas las subcondiciones entre sí según las estadísticas de ANOVA y su intervalo de confianza del 95%.

45 La figura 13 muestra la tinción con hematoxilina y eosina de secciones representativas de tejido huésped por encima de macromatrices de pocillos después de 1 mes de implante. Aumento de 100 X. Las flechas indican los lúmenes de los recipientes. A: hMSC. B: hMSC diferenciadas. C: Condrocitos primarios. D: Cocultivo de hMSC:condrocitos primarios. Barra de escala: 100 µm.

50 Figura 14. Sistema HTS 3D (cribado de alto rendimiento tridimensional) con dimensiones personalizadas para que se adapten al análisis de microscopía de luz confocal automática fabricado mediante (A) modelado por deposición de material fundido y (F, G) estereolitografía. Los insertos (B, C, H, I) muestran que para ambos sistemas es posible detectar tintes de diferentes colores (rojo, azul, amarillo, púrpura, blanco) correspondientes a diferentes longitudes de onda, lo que demuestra que este sistema se puede usar para analizar la respuesta celular específica en análisis multiplex mediante, por ejemplo, marcadores fluorescentes con excitaciones de longitud de onda específica. (D).

Pueden detectarse microesferas fluorescentes (YG: $\lambda = 441\text{-}486\text{ nm}$) sembradas en el sistema multipocillo y (D) cuantificarse a diferentes diluciones con un microscopio de luz confocal automático. De manera similar, se han detectado y cuantificado a diferentes concentraciones de dilución (J, K) rodamina roja y FITC. Las concentraciones de rodamina y FITC se han variado en direcciones opuestas para eliminar posibles sesgos arbitrarios.

5
10
15
Figura 15. Sección transversal del sistema HTS 3D explantado que muestra tres pocillos o subcondiciones contenidos dentro de cada macromatriz. La penetración del tejido del ratón se puede observar en cada pocillo. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y se contratiñeron con eosina. Citoplasma (rojo) y núcleos (azul oscuro). Los portaobjetos mostraron posibles diferencias en la penetración en el tejido dependiendo de las células sembradas en cada pocillo. Para cuantificar la penetración del tejido, se dibujó un rectángulo de las dimensiones de cada pocillo. Calculando el área de tejido contenida dentro de cada rectángulo, se obtuvo el porcentaje de área de tejido en cada pocillo/subcondición. Para poder identificar las subcondiciones después de procesar las muestras, un lado de la macromatriz se tiñó con tinta china, que era visible (dentro del círculo punteado) en los portaobjetos. Barra de escala: 1 mm.

20
Figura 16. El área de porcentaje de tejido para cada subcondición para dos ratones: uno de la semana 2 y otro de la semana 4. Las barras 3D muestran tendencias: una mayor cantidad de células sembradas significa más área de porcentaje de tejido en un pocillo. A: Diluciones de hMSC y control (sistema HTS 3D vacío). B: Diluciones de condrocitos y control. C: Cocultivo de hMSC y condrocitos y control.

25
Figura 17. Las cantidades más altas de hMSC promueven la organización del tejido en los pocillos. Portaobjetos teñidos con tricómico de Masson: queratina (roja), colágeno (azul) y núcleos (marrón oscuro o negro). A: El control muestra tejido muscular de ratón en los pocillos sin células. B: hMSC, dilución 1X (~25.000 células), en la semana 2 muestra organización de tejido: nótese la alineación de las fibras de colágeno y la distribución de los vasos sanguíneos. C: hMSC, dilución 2X (~12.500 células), en la semana 4 muestra organización de tejido: las fibras de colágeno están alineadas. Barras de escala: 200 μm .

30
35
Figura 18. Regeneración del cartílago según las condiciones que muestran la formación de glucosaminoglicanos (GAG). Los portaobjetos se tiñeron con azul alcán y se contratiñeron con eosina: GAG (azul) y citoplasma (rojo). A: Los controles no fueron positivos para GAG en tejido de ratón que penetró en el pocillo. B: condrocitos, dilución 1x (~25.000 células), no fue positivo para GAG. C: Cocultivo de hMSC:condrocitos en una proporción de 20:80; se sembraron un total de 25.000 células en el pocillo. Esta subcondición no fue positiva para GAG. D: Cocultivo de hMSC:condrocitos en una proporción de 80:20. Se sembraron un total de 25.000 células en el pocillo. Esta subcondición fue positiva para GAG. Barras de escala: 200 μm .

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

40
45
La expresión "sistema multipocillo" se refiere a un matriz de pocillos de muestra ubicados en una superficie sustancialmente plana. Los sistemas multipocillo pueden comprender cualquier número de pocillos de muestra separados. Un sistema multipocillo según la invención comprende al menos 3 pocillos, preferentemente al menos 9 pocillos. Los ejemplos comunes de sistemas multipocillo incluyen sistemas de 96 y 384 pocillos. La expresión "sistema multipocillo" se puede usar de forma intercambiable con las expresiones "placa de micropocillos", "macromatriz de pocillos" o "microplaca".

50
El término "pocillo", tal como se usa en el presente documento, denota un compartimento o área empotrada. Preferentemente, dicho pocillo está separado de otro pocillo por una pared lateral que evita que se mezcle el contenido de dicho pocillo con otro pocillo. Preferentemente, dicho pocillo tiene un fondo cerrado.

El término "biocompatible", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la característica del material que permite que el material se implante en un animal, sin que sea tóxico para el animal o que provoque una respuesta inmunitaria en el animal.

55
La expresión "diámetro interior de un pocillo", tal como se usa en el presente documento, se refiere al diámetro de dicho pocillo, que puede determinarse estableciendo el diámetro máximo de una forma cilíndrica que puede insertarse en dicho pocillo.

60
La expresión "constructo tisular 3D", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una pluralidad de células que forman un tejido tridimensional. Preferentemente, dicho constructo tisular 3D comprende al menos 2, 3, 4, 5 o 6 células que crecen una sobre la otra. Preferentemente, dicho constructo tisular 3D comprende al menos 2, 3, 4, 5 o 6 capas celulares. Preferentemente, dichas células que forman dicho tejido 3D no forman una suspensión y preferentemente tienen un patrón de crecimiento adherente.

65
El término "medio", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fluido que se puede usar para mantener, almacenar o cultivar células sin dañar la integridad de las células.

El término "bolsillo" se refiere a un sitio dentro del cuerpo de un animal que es adecuado para el implante de un sistema multipocillo. Preferentemente, dicho bolsillo es un sitio subcutáneo.

5 *Formas de realización*

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que las células que *in vivo* son capaces de formar tejidos 3D, pero cuando se cultivan *in vitro* en una placa de Petri o un matraz de cultivo regular solo producen capas 2D, forman constructos tisulares 3D cuando se cultivan en pocillos que tiene un volumen de entre 0,125 y 4,0 mm³. Normalmente, las células no forman constructos tisulares 3D en sistemas multipocillo, sin importar cuánto tiempo se cultiven (véase también la figura 4), a menos que dichos sistemas multipocillo se preparen incorporando esqueletos poliméricos sintéticos 3D. Sorprendentemente, los inventores han demostrado que volúmenes muy pequeños de pocillos inducen la formación de constructos tisulares 3D. Los sistemas multipocillo que se proporcionan en el presente documento, por lo tanto, no comprenden preferentemente esqueletos poliméricos sintéticos 3D.

15 Sistema multipocillo

La invención proporciona un sistema multipocillo que comprende pocillos que tienen un volumen de entre 0,125 y 4,0 mm³. Una ventaja del sistema de micropocillos según la invención es que el volumen de reactivos requerido para el cultivo se reduce considerablemente, lo que ahorra costes. Es esencial que el sistema multipocillo sea adecuado para el cultivo celular. En una forma de realización preferida, dicho sistema multipocillo está fabricado de un material biocompatible, que permite que dicho sistema multipocillo pueda implantarse en un animal. Se puede usar cualquier material biocompatible, incluidos polímeros termoplásticos, metales e hidrogeles. Sin embargo, es una gran ventaja que el material biocompatible sea un material aprobado por una autoridad legal, preferentemente la FDA o la EMEA, para su uso en un animal. En una forma de realización preferida, el material biocompatible es alginato (véase la figura 9D). De forma más preferida, dicho material biocompatible es poli(ácido láctico) o PEOT/PBT (que se puede obtener de IsoTis S.A., Bilthoven, Países Bajos). En caso de que se utilice PEOT/PBT, las composiciones más preferidas son las composiciones PEOT/PBT de 300/55/45 y 1000/70/30, debido a que proporcionaron los mejores resultados. En una forma de realización preferida, dichos pocillos tienen un diámetro interior superior a 0,5 mm. Una ventaja de los mismos es que algunas puntas de micropipeta estándar tienen un diámetro exterior de 0,5 mm, que por lo tanto encajan perfectamente en dichos pocillos.

Dicho sistema de micropocillos se puede implantar en un animal, tal como se describirá a continuación. Dependiendo del tamaño del animal y del tamaño de los bolsillos de trasplante, el número máximo de pocillos y, por lo tanto, el número máximo de condiciones de cultivo que pueden analizarse, pueden diferir. Por lo tanto, las dimensiones de dicho sistema multipocillo se ajustan preferentemente para que encajen en un bolsillo de implante de un animal específico. Un sistema multipocillo adecuado que se pueda trasplantar en un bolsillo de trasplante de un ratón es preferentemente inferior a 10 x 10 mm. Un sistema multipocillo adecuado que se pueda trasplantar en un bolsillo de trasplante de una rata es preferentemente inferior a 20 x 20 mm. Un sistema multipocillo adecuado que se pueda trasplantar en un bolsillo de trasplante de un conejo es preferentemente inferior a 30 x 30 mm. Un sistema multipocillo adecuado que se pueda trasplantar en un bolsillo de trasplante de una cabra es preferentemente inferior a 50 x 50 mm.

Se prefiere un sistema multipocillo que tenga 16 pocillos o menos cuando dicho sistema multipocillo se trasplanta en un bolsillo de trasplante de un ratón. Se prefiere un sistema multipocillo con 2000 pocillos o menos cuando dicho sistema multipocillo se trasplanta en un bolsillo de trasplante de un conejo. Se prefiere un sistema multipocillo con 12000 pocillos o menos cuando dicho sistema multipocillo se trasplanta en un bolsillo de trasplante de una cabra.

Preferentemente, la altura de dicho sistema multipocillo se encuentra entre 0,4 y 8 mm. Preferentemente, la altura máxima es 8,0, 4,0, 3,5 o 3,0 mm. Las dimensiones exteriores preferidas del sistema multipocillo son 75 x 25 x 6 mm (longitud x anchura x altura). Una ventaja del mismo es que las dimensiones exteriores del sistema multipocillo 3D que tiene estas dimensiones están adaptadas para que encaje en el soporte de un microscopio de luz confocal automático.

El volumen del pocillo se encuentra entre 0,125 y 4,0 microlitros. Las paredes de los pocillos tienen más de 50 micrómetros de espesor. El espesor de las paredes del pocillo proporciona estabilidad mecánica permitiendo que las placas de múltiples pocillos resistan las fuerzas ejercidas por el tejido *in vivo*. Preferentemente, las paredes del pocillo tienen al menos 60 micrómetros, al menos 70 micrómetros, al menos 80 micrómetros, al menos 90 micrómetros, 100 micrómetros, al menos 1 mm o al menos 2 mm de espesor. Preferentemente, las paredes del pocillo que tienen un espesor mínimo tal como se describe en el presente documento tienen menos de 3 mm de espesor. Preferentemente, las paredes tienen entre 60 micrómetros y 3 mm de espesor, de forma más preferida entre 100 micrómetros y 1 mm de espesor.

Preferentemente, dicho sistema multipocillo comprende al menos un pocillo que comprende un constructo tisular 3D. Preferentemente, dicho sistema multipocillo comprende múltiples pocillos que comprenden un constructo tisular 3D. Una ventaja del mismo es que dichos sistemas multipocillo que comprenden múltiples pocillos que tienen dicho

constructo tisular 3D pueden usarse adecuadamente para analizar diferentes variables, que incluyen analizar diferentes compuestos o condiciones de cultivo. Por supuesto, preferentemente se usan más pocillos para analizar más variables de ensayo diferentes simultáneamente. En una forma de realización preferida, al menos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 pocillos que comprenden un constructo tisular 3D se exponen a diferentes condiciones de cultivo o a diferentes composiciones del medio de cultivo. En una forma de realización preferida, dicha composición del medio de cultivo es diferente, debido a que al menos un compuesto químico está presente en un pocillo y está ausente en otros pocillos de dicho sistema multipocillo.

El sistema multipocillo se puede utilizar adecuadamente para analizar virtualmente cualquier efecto detectable de un compuesto sobre una célula en un constructo tisular 3D. La toxicidad de un compuesto se puede determinar comparando la muerte celular en un constructo tisular 3D en comparación con un constructo tisular 3D que no se ha expuesto a dicho compuesto. En otra forma de realización, el nivel de una proteína, un ácido nucleico o un metabolito se determina en una célula de dicho constructo tisular 3D que se ha expuesto a determinado compuesto o condición de cultivo y se compara con el nivel de la misma proteína, el mismo ácido nucleico o el mismo metabolito en una célula de dicho constructo tisular 3D que no se ha expuesto al mismo. Por supuesto, también está dentro del alcance de la presente invención analizar un efecto de un compuesto o condición de cultivo durante la formación de un constructo tisular 3D.

Usos del sistema multipocillo

Dicho sistema multipocillo permite realizar miles de experimentos en un solo animal vertebrado y ofrece la posibilidad extraordinaria de cribar múltiples condiciones *in vivo*. Los inventores evaluaron en primer lugar *in vitro* el efecto de los tamaños de los pocillos sobre el crecimiento y la organización de las hMSC, y sobre el desarrollo del tejido mediante la creación de macromatrices de pocillos 3D de PEOT/PBT y células de siembra (preferentemente hMSC) en las mismas. Llegaron a la conclusión de que las dimensiones del pocillo, el número de células y el tiempo de cultivo eran los parámetros más importantes para controlar el cultivo tisular dentro del sistema multipocillo. La concentración de células en un pocillo redujo significativamente la necesidad de expansión celular. Además, utilizando 4000 - 25000, de forma más preferida 6000 - 25000 y de la forma más preferida 12000 - 25000 hMSC, se podrían producir agregados 3D de hMSC de diferentes tamaños ajustando el tiempo de cultivo. Los pocillos que tienen un volumen de aproximadamente 1,8 mm³ fueron óptimos para sembrar, cultivar y manipular manualmente sistemas multipocillo *in vitro* con 25.000 hMSC o menos.

El tamaño de los pocillos desarrollados en el sistema multipocillo según la invención se encuentra entre los tamaños de los sistemas microfabricados de alto rendimiento actualmente disponibles y las matrices de placas de cultivo convencionales. El tamaño del sistema multipocillo según la invención combina dos ventajas: (i) se utilizan menos recursos. Por ejemplo, se usan cantidades reducidas de células para sembrar cada pocillo; (ii) la manipulación de dicho sistema multipocillo es posible utilizando un equipo de laboratorio estándar. Por ejemplo, el uso de puntas de pipeta estándar es posible. El sistema multipocillo según la invención tiene el potencial de albergar miles de pocillos dentro de un sistema multipocillo. El sistema de micropocillos según la invención también puede crearse en una forma personalizada que permita su inserción en microscopios automáticos ya disponibles comercialmente, lo que también permite un análisis automatizado. Otra ventaja que presenta este sistema multipocillo según la invención es que su uso da como resultado la reducción del número de animales utilizados en experimentos *in vivo*. Esto se logra fabricando dicho sistema multipocillo de polímeros biocompatibles y ajustando el número de los pocillos y el tamaño del sistema multipocillo al sitio de implante del animal de ensayo.

El sistema multipocillo utilizado en experimentos *in vivo* fue un sistema multipocillo de 3 x 3. Dicho sistema multipocillo se implantó subcutáneamente en un ratón para cribar el efecto sobre la formación de tejido de tener diferentes cantidades de células por pocillo en un bolsillo de un ratón. Se analizaron tres tipos de células. Además, se implantaron tres relaciones diferentes de cocultivos de hMSC: condrocitos primarios. El análisis de las tendencias con regresión lineal mostró que había una correlación entre la proporción del área del tejido y el número de células para las hMSC en la semana 2 y para los condrocitos primarios en la semana 4. Esto indicaba que los pocillos con cantidades elevadas de células producían pocillos con una mayor proporción de cobertura de tejido. Incluso aunque se detectaran tendencias, el análisis ANOVA de la proporción de cobertura del tejido no varió significativamente entre condiciones de cultivo. Esto sugiere que las condiciones de cultivo analizadas no fueron lo suficientemente extremas como para dar lugar a una diferencia significativa en la cobertura tisular del pocillo con los marcadores analizados. Curiosamente, los sistemas multipocillo que comprenden hMSC mostraron la presencia de lúmenes vasculares de mayor tamaño y en mayor número que los sistemas multipocillo con condrocitos o hMSC diferenciadas. Los recipientes se observaron repetidamente en sistemas de micropocillos sembrados con hMSC.

Usando microplacas convencionales, la realización de un análisis de cribado de tejidos de las mismas cantidades de células y relaciones de cocultivo habría requerido el triple de número de animales dado que cada condición de cultivo (o variable que se va a analizar) hubiera debido analizarse por separado. Los sistemas multipocillo analizados en el presente documento se fabricaron de PEOT/PBT. Tal como se muestra en la figura 9, también se podrían utilizar muchos otros materiales, lo que subraya la versatilidad de dicho sistema multipocillo. El uso de sistemas multipocillo según la invención reduce considerablemente la pérdida de vidas de animales vertebrados y de costes en el cribado farmacéutico, toxicológico, químico y de enfermedades, mientras que permite, por primera vez, realizar

dicho cribado en tejidos tridimensionales verdaderos. Se anticipa que esta tecnología contribuirá a mejorar las condiciones de salud de la sociedad.

Procedimientos para producir el sistema multipocillo

5 El sistema multipocillo según la invención se puede producir utilizando cualquier procedimiento adecuado, como por ejemplo, moldeo por fundición, grabado, estampado, extrusión, etc. Además, se puede usar cualquier procedimiento de prototipado rápido. El prototipado rápido es la construcción automática de objetos físicos utilizando tecnología de fabricación aditiva. Los procedimientos preferidos de prototipado rápido incluyen la sinterización selectiva por láser (SLS), que utiliza termoplásticos o polvos metálicos, modelado por deposición fundida (FDM), que utiliza termoplásticos o metales eutécticos, estereolitografía (SLA), utilizando fotopolímeros, fusión por haz de electrones (EBM), utilizando aleaciones de titanio e impresión 3D (3DP), que se pueden utilizar con diversos materiales. Estos procedimientos emplean diferentes medidas técnicas para solidificar el material, que pueden usarse para preparar dicho sistema multipocillo. Utilizando la estereolitografía, un polímero fotosensible en estado líquido se solidifica por exposición selectiva a longitudes de onda de luz específicas (figura 9H-J). El uso de la sinterización selectiva por láser un polvo de un material biocompatible es golpeado selectivamente por un rayo láser que funde parcialmente el polvo, dando como resultado la formación de una estructura sólida. La impresión 3D es una forma de tecnología de fabricación aditiva con la que se crea un objeto tridimensional por medio de capas sucesivas de material.

20 Preferentemente, se utiliza un procedimiento para producir un sistema multipocillo según la invención en el que dicho sistema multipocillo se produce por extrusión.

La invención proporciona además un procedimiento para producir un sistema multipocillo según la invención, que comprende las etapas siguientes:

- 25 - fundir dicho material biocompatible en una camisa térmica;
- extrudir el material fundido, biocompatible, a presión a través de una boquilla para formar una fibra trazada;
- 30 - se repite dicha etapa de extrusión, depositando así una fibra trazada posteriormente en paralelo a una distancia de entre 0,125 y 2,5 mm junto a la última fibra depositada hasta que se forma una capa.

El procedimiento puede llevarse a cabo adecuadamente usando un trazador 3D, preferentemente en el que dicho trazador 3D está controlado mediante el programa informático CAD. La etapa de controlar el trazador 3D comprende preferentemente las etapas de proporcionar un archivo de datos de diseño de coordenadas que representan un diseño tridimensional del sistema multipocillo según la invención y generar señales de control basadas en dicho archivo de datos de diseño dispensando una hebra de un material biocompatible en un estado fluido en respuesta a dichas señales de control y tratando dicha hebra de material biocompatible después de dispensarla en un tiempo controlado y una relación dimensional con dicha dispensación de dicho material biocompatible de forma que dicho material experimente una transición a un estado físico fijo en el que dicho material biocompatible se solidifica dando una forma precisa de dicho sistema multipocillo.

45 Preferentemente, dicho trazador 3D es un dispositivo Bioplotter (Envisiontec GmbH, Alemania) o un Bioscaffolder (SysEng GmbH, Alemania). Preferentemente dicha presión se encuentra entre 0,4 bar y 4 bar. La presión puede variarse dependiendo del material biocompatible depositado. Preferentemente se utiliza gas nitrógeno para crear presión. Preferentemente, la velocidad de deposición inicial de fibras es de al menos 320 mm/min y puede ser de hasta 1800 mm/min dependiendo de la composición del material biocompatible. Para crear un fondo cerrado, preferentemente la primera capa depositada es una capa cerrada. Alternativamente, también se puede lograr una capa cerrada eligiendo las dimensiones de una capa depositada subsiguientemente de forma que las aberturas de la primera capa se cierren por medio del material de la capa subsiguiente.

Se deposita una capa subsiguiente sobre la capa previa, depositándose las fibras que forman dicha capa subsiguiente en un ángulo con respecto a las fibras de la capa previa; repitiendo dicha etapa en la que se deposita dicha capa subsiguiente hasta que se alcanza la altura deseada. En principio, se puede usar cualquier ángulo, pero preferentemente dicho ángulo se encuentra entre 1 y 90 grados, de forma más preferida se utiliza un ángulo entre 10 y 90 grados y de forma incluso más preferida entre 45 y 90 grados. De la forma más preferida, se utiliza un ángulo de aproximadamente 90 grados. Por supuesto, dicho ángulo puede variarse dentro de una forma de realización del sistema de paredes múltiples y/o entre capas.

60 Dicha capa está fabricada de una multitud de fibras trazadas en paralelo entre sí en el mismo plano horizontal (en el eje Z). Una capa puede consistir en una multitud de fibras trazadas separadas o puede consistir en una única fibra trazada conectada como se muestra en la figura 2A (e) y la figura superior de la figura 2B. Se pueden usar diferentes tipos de fibras trazadas, dado que pueden regularse variando el tamaño de la abertura y/o la forma de la boquilla. Un único orificio redondo produce una fibra redonda. Alternativamente, se puede usar una boquilla doble que crea una fibra que es más alta que gruesa, lo que es una forma sencilla de crear altura con menos capas. La extrusión de las fibras se realiza capa por capa a distancias definidas de entre 0,125 y 2,0 mm, tal como se establece

preferentemente en el programa informático CAD. Esto significa que a medida que las capas se depositan una sobre cada una de las otras (en el eje Z), se pueden producir pocillos cerrados depositando fibras una sobre cada una de las otras a una temperatura controlada, preferentemente entre 25 y 250 °C, a una presión entre 0,1 y 6 bar, y utilizando una velocidad de deposición de entre 40 y 2400 mm/min. Es importante controlar estos parámetros para determinar si los pocillos se abrirán o cerrarán. Las dimensiones del pocillo se pueden definir aumentando o disminuyendo las distancias de las fibras en el eje XY. La altura del sistema multipocillo se crea depositando una capa subsiguiente sobre la capa previa, por lo que las fibras que forman dicha capa subsiguiente se depositan en un ángulo preferentemente de entre 1 y 90 grados con respecto a las fibras de la capa previa. Cuando se usa un ángulo de aproximadamente 90 grados, se crean pocillos rectangulares. Las fibras pueden extrudirse en diferentes ángulos, haciendo así canales con diferentes arquitecturas.

Procedimientos para preparar constructos tisulares 3D

La invención proporciona un procedimiento para preparar un constructo tisular 3D a partir de células, que comprende las etapas de introducir medio que comprende una cantidad de células en un sistema multipocillo según la invención y cultivar las células introducidas para permitir que las células formen un constructo tisular 3D. Algunos tipos de células deben estar presentes en un número suficiente a fin de obtener un constructo tisular 3D. Un experto puede determinar fácilmente si se requiere un número mínimo realizando series de dilución. Preferentemente, dichas células son de un tipo celular que en condiciones *in vivo* pueden formar un tejido 3D. Se puede utilizar prácticamente cualquier tipo de célula. Se prefieren las células que requieren la unión a una superficie para sobrevivir. Las células preferidas incluyen células madre, incluidas células madre embrionarias mesenquimales, pero no células madre embrionarias humanas que se obtengan mediante un procedimiento que implique la destrucción de embriones humanos. Otras células preferidas comprenden células de diferentes vertebrados, preferentemente mamíferos, de forma más preferida de seres humanos, ratones, conejos, cabras o vacas. En determinadas formas de realización, las células preferidas son de diferentes tejidos e incluyen cardiomiocitos, neuronas, células cerebrales, osteocitos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, queratinocitos, células de músculo liso, células endoteliales, osteoblastos, linfocitos, macrófagos, células T o células tumorales. En una forma de realización preferida, dicho sistema de micropocillos se usa para estudiar los efectos de compuestos farmacéuticos sobre la formación de constructos tisulares 3D. Preferentemente, dicho sistema también se usa para estudiar los efectos de compuestos antitumorales potenciales en el desarrollo de tejido tumoral. Preferentemente, dicho primer tipo de células comprende células madre, preferentemente células madre mesenquimales humanas (hMSC) o condrocitos, preferentemente condrocitos primarios, de forma más preferida condrocitos primarios bovinos. Preferentemente, dichas hMSC se obtienen a partir de un acetábulo de un donante humano. Preferentemente, dichas hMSC están esencialmente exentas de células no adherentes. Preferentemente, dichas hMSC se cultivan *in vitro*, preferentemente durante al menos 4 días, antes de dicha etapa de introducir las en dicho pocillo.

Preferentemente, dichos condrocitos se originan a partir del cartílago articular. El número de dicho primer tipo de células que es suficiente para permitir la formación de un constructo tisular 3D depende del tipo de célula que se utiliza. Los inventores han descubierto que una cantidad demasiado baja de células sembradas no formará un constructo tisular 3D, sin importar cuánto tiempo se cultiven las células. Un experto no tendrá dificultades en averiguar qué cantidad es suficiente, por ejemplo, realizando una serie de diluciones y determinando si se forma un constructo tisular 3D en aproximadamente un mes. Los inventores también han observado una fuerte correlación entre el área del tejido y el número de células. Por lo tanto, el número de células sembradas por pocillo en dicho procedimiento es preferentemente al menos 4000, pero de forma más preferida más elevado, es decir, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000 o 25000 células. En una forma de realización preferida, dicho procedimiento comprende una etapa de cocultivo de las células, que son de un primer tipo de células, preferentemente hMSC, con células de un segundo tipo de células, que estimulan el crecimiento de las células del primer tipo de células, condrocitos. Cuando se usa un cocultivo, la relación entre células del primer tipo:células del segundo tipo (preferentemente condrocitos:hMSC) se encuentra entre 0,1:0,9 y 0,9:0,1. Una ventaja es que el cocultivo estimula adicionalmente la formación de constructos tisulares 3D. Preferentemente, el número máximo de células totales en un pocillo es de $2,5 \times 10^4$. Preferentemente, las células o constructos tisulares 3D de al menos 2 pocillos se exponen a una condición de cultivo diferente, incluido un número diferente de células sembradas. En principio, se puede analizar cualquier compuesto o condición de cultivo que potencialmente tenga un efecto sobre un parámetro relevante de una célula de dicho constructo de tejido 3D.

En una forma de realización preferida, los constructos tisulares 3D se forman en 2 o más pocillos del sistema multipocillo aplicándose diferentes condiciones de cultivo a los 2 o más pocillos. Preferentemente, dichos 2 o más pocillos significa al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 pocillos. La determinación de un efecto de dicho compuesto o dicha condición de cultivo puede realizarse mediante técnicas bien conocidas en la técnica e incluyen, entre otras, la determinación de la histología, la cuantificación de células y/o la morfología de las células o constructos tisulares 3D presentes en los pocillos que se han expuesto a dicho compuesto o dicha condición de cultivo. Las tecnologías adecuadas incluyen diferentes tipos de técnicas de microscopía y tinción. En una forma de realización preferida, dicho procedimiento se realiza usando análisis por microscopía automática, preferentemente usando múltiples etiquetas fluorescentes. Preferentemente, dicho efecto se determina utilizando un procedimiento que evite el procesamiento histológico [tal como se describe por Bratlie, K.M., et al., Plos One, 2010. 5 (3): p. 1-8., Judex, S., et al., Methods, 2010. 50 (1): p. 14-19 y Bhargava, R., et al., Biochimica et Biophysica Acta-

Biomembranes, 2006. 1758 (7): p. 830-845] y mejore la cuantificación y la sensibilidad de dicho procedimiento para preparar un constructo tisular 3D según la invención, preferentemente cuando se realice *in vivo*. Por ejemplo, la toma de imágenes *in vivo* de la actividad de catepsina y macrófagos u otras enzimas podría adaptarse al sistema multipocillo. Este procedimiento está completamente descrito por Bratlie, K.M., et al., Plos One, 2010. 5 (3): p. 1- 8.

Otra ventaja de los sistemas multipocillo según la invención es que pueden fabricarse lo suficientemente pequeños como para que encajen dentro de un bolsillo de trasplante de un animal. Debido a su tamaño, estos sistemas multipocillo pueden implantarse en un animal sin causar mucho sufrimiento. Esto representa una gran ventaja, ya que implantar un sistema multipocillo en un animal significa que la formación de constructos tisulares 3D se puede realizar sin tener que renovar el medio, dado que se ha demostrado que el suministro de nutrientes por el animal es suficiente. Debido a los pequeños volúmenes, la fuerza g en el volumen de células y el medio que comprende, por ejemplo, reactivos que se van a analizar es tan pequeña que no existe riesgo de contaminación cruzada entre el contenido de diferentes pocillos y el contenido de otros pocillos.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, dicha etapa de cultivo de células en un pocillo de dicho sistema multipocillo según la invención se realiza en un bolsillo de un animal adecuado. Preferentemente, dicho animal es un vertebrado, de forma más preferida un mamífero. Los animales más preferidos comprenden ratas, ratones, preferentemente ratones desnudos, cabras y conejos. Preferentemente, dicho animal es un animal no humano. No obstante, también puede ser ventajoso usar el sistema multipocillo como un dispositivo de cribado en seres humanos.

Preferentemente, se elige un bolsillo en el que un trasplante cause un daño mínimo o una molestia mínima a dicho animal. Los sitios de bolsillo que son adecuados para el trasplante de un sistema multipocillo varían entre animales. Un experto no tendrá dificultad en identificar los bolsillos adecuados. En ratones, los bolsillos preferidos se encuentran en el lado posterior-lateral de la espalda.

Los gastos en ensayos en animales y de laboratorio son inversamente proporcionales al número de pocillos implantados por bolsillo. Por lo tanto, la invención proporciona además un animal que comprende un sistema multipocillo según la invención, en el que dicho sistema multipocillo comprende células.

La invención se ilustra ahora mediante una serie de ejemplos que no limitan el alcance de la invención.

EJEMPLOS

35 Materiales y procedimientos

Fabricación de macromatrices de pocillos

Se usó un dispositivo Bioplotter (Envisiontec GmbH, Alemania), que es un trazador XYZ, para fabricar las macromatrices de pocillos. Se diseñaron modelos cúbicos 3D por CAD con el programa informático Rhinoceros (Delft, Países Bajos) y se cargaron en el programa informático Bioplotter CAM (PrimCAM, Einsiedeln, Suiza). Además, se cargaron materiales en una jeringa de acero para polímeros termoplásticos o una jeringa de plástico para hidrogeles. A continuación, se montó la unidad de cartucho de jeringa en el brazo X móvil del aparato. Se aplicó una presión variable de nitrógeno de entre 0,4 bar y 4 bar a la jeringa para la extrusión del material. La presión varió dependiendo del material biocompatible depositado. La combinación de programa informático y configuración física dio como resultado la extrusión de materiales en forma de fibras depositadas capa a capa sobre una plataforma. La velocidad de deposición inicial de la fibra varió entre 320 mm/min y 1800 mm/min en función de la composición del material biocompatible.

Para obtener macromatrices en forma de matriz (columnas x filas), se fabricaron pocillos cerrados depositando fibras una sobre otra en un ángulo de 90° para obtener pocillos rectangulares (figura 1). Las dimensiones XY del pocillo se definieron aumentando o disminuyendo las distancias de las fibras en el eje XY. Además, la altura del pocillo se definió por la altura del modelo cúbico (figura 1C-E), en el que la primera capa depositada se cerró o no dependiendo del diseño. Se fabricaron macropocillos con cuatro materiales con sus respectivos parámetros tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales utilizados para fabricar macromatrices y parámetros de procesamiento.

| Material | Temperatura del cartucho [° C] | Distancia de hebras de primera capa [mm] | Distancia de hebras de segunda capa y superiores [mm] | Espesor de la capa [mm] | Diámetro interno de la aguja [mm] |
|--------------------|--------------------------------|--|---|-------------------------|-----------------------------------|
| PEOT/PBT 300/55/45 | 200 | 0,3 | 1,5 | 0,2 | 0,4 |

| Material | Temperatura del cartucho [° C] | Distancia de hebras de primera capa [mm] | Distancia de hebras de segunda capa y superiores [mm] | Espesor de la capa [mm] | Diámetro interno de la aguja [mm] |
|---------------------|--------------------------------|--|---|-------------------------|-----------------------------------|
| PEOT/PBT 1000/70/30 | 190 | 0,3 | 1,5 | 0,2 | 0,25 |
| Poli(ácido láctico) | 220 | 0,3 | 1,5 | 0,2 | 0,4 |
| Alginato | 25 | 0,5 | 3 | 0,2 | 0,5 |

Además, se fabricaron diferentes diseños de arquitectura para maximizar el número de pocillos de la macromatriz y para crear sistemas de macromatriz de cocultivo tal como se muestra en las figuras 9E-F. Para estas macromatrices de 4 mm de altura, se implementaron los mismos parámetros de procesamiento que se muestran en la tabla 1 dependiendo del material. Para el diseño de la figura 9E, se introdujo una distancia de hebras de tercera capa (0,5 mm) en el centro de la altura de la macromatriz de pocillos (a 2 mm). Alternativamente, esta capa intermedia puede crearse combinando prototipado rápido con tecnologías de hilado, por ejemplo electrohilado (figura 9G). Para estos diseños, las distancias de hebras de primera y segunda capa se mantuvieron en otra parte, tal como se muestra en la tabla 1. Además, el diseño de la figura 9F implicaba en primer lugar depositar distancias de hebras de segunda capa (tabla 1) para mantener un fondo abierto. Después, la deposición de la distancia de hebras de primera capa (tabla 1) en el centro de la altura de la macromatriz de pocillos (a 2 mm). Subsiguientemente, se reanudó la deposición de capas con distancias de hebras de segunda capa (tabla 1).

Discos de PEOT/PBT bidimensionales

Se fabricaron sustratos 2D de 300PEOT55PBT45 mediante una técnica de moldeo por compresión de estampado en caliente. Dos obleas de silicona sirvieron de soporte y definieron la superficie moldeada. Se dispuso un molde de acero inoxidable con características circulares a través de orificios de 2,2 cm de diámetro entre los moldes. Se dispusieron gránulos de 300PEOT55PBT45 dentro del molde para rellenar las cavidades del molde tras la fusión del polímero.

Los soportes de silicona se limpiaron mediante inmersión en solución piraña (H₂SO₄ concentrado/H₂O₂ acuoso al 33% 3:1) durante 15 min. Se enjuagaron con agua y se secaron en N₂. Después se funcionalizaron con 1H,1H,2H,2H-perfluorodeciltriclorosilano (ABCR). A continuación, se depositaron en fase gaseosa, lo que sirvió como capa antiadherente para facilitar la separación del soporte del polímero. Para el procesamiento de estampado en caliente, se utilizó una prensa hidráulica equipada con un sistema de enfriamiento por agua y control de temperatura (Fontune Holland, Países Bajos). El 300PEOT55PBT45 se dispuso sobre el soporte de silicona y en la abertura del molde. Después, el sistema se calentó a una temperatura de 180 °C y se aplicaron 10 bares. Después de 5 minutos, el sistema se enfrió a 60 °C y se liberó la presión. El molde y los soportes se separaron manualmente y el disco 2D se liberó del molde.

Cultivo de hMSC

Se aislaron, se cultivaron y se crioconservaron hMSC tal como se describe por Both, S.K. et al., Tissue Engineering, 2007. 13 (1): p. 3 - 9. Las hMSC se obtuvieron del acetábulo de tres donantes que se sometieron a una cirugía de reemplazo total de cadera y dieron su consentimiento informado para la biopsia de médula ósea, aprobado por el comité de ética médica local. El sexo y la edad de los donantes fueron: Donante 1: mujer, 81 años. Donante 2: varón, 65 años. Donante 3: mujer, 66 años. Las células mononucleadas se contaron en el aspirado y se plaquearon a una densidad de 500.000 células/cm² sobre plástico de cultivo tisular (Nunc, Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Dinamarca).

Las células se cultivaron durante cuatro a cinco días en medio de proliferación medio mínimo esencial α (α MEM) en una incubadora con una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5% a 37 °C. El medio de proliferación α MEM contenía medio esencial mínimo (GIBCO, Carlsbad, CA); suero de bovino fetal al 10% de un lote seleccionado (FBS; Biowhittaker, lote: 8SB0002; Loza, Verviers, Bélgica); 2-fosfato de ácido 1-ascórbico 0,2 mM (Sigma, St. Louis, MO); penicilina G (100 unidades/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA); estreptomycin (100 μ g/ml, Invitrogen); 1-glutamina 2 mM (Sigma) y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (Instruchemie, Delfzijl, Países Bajos).

Después del período de cultivo de cuatro a cinco días, se descartaron las células no adherentes y el medio de proliferación α MEM. Las células adherentes se lavaron a fondo dos veces con solución salina tamponada con fosfato PBS (PBS, Sigma) y se renovó el medio de proliferación α MEM. Las células adherentes se hicieron proliferar durante dos pasajes y se crioconservaron. Para el cultivo en macromatriz de pocillos, se realizó un recuento de las hMSC crioconservadas (pasaje 2) y se plaquearon a 1.000 células/cm² sobre plástico de cultivo tisular (Nunc) en medio de proliferación α MEM. Las hMSC se expandieron durante una semana con una renovación del medio de proliferación α MEM.

Cultivo de condrocitos

5 Se aislaron condrocitos primarios mediante digestión con colagenasa a partir de cartílago articular recogido de una articulación de rodilla de un bovino de 18 meses de edad. Las células se agregaron con 300 µg/ml de fibronectina (Invitrogen). Los condrocitos primarios se expandieron durante un pasaje con renovaciones del medio dos veces por semana. El medio de cultivo de condrocitos contenía DMEM (Invitrogen) tamponado con HEPES (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS; Biowhittaker, lote: 8SB0002; Loza, Verviers, Bélgica), 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen), aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Sigma-Aldrich), 2-fosfato de ácido ascórbico 0,2 mM (Invitrogen), prolina 0,4 mM (Sigma-Aldrich) y 100 unidades/ml de penicilina (Invitrogen).

Esterilización y acondicionamiento de macromatrices para cultivo celular

15 Se esterilizaron macromatrices con solución de etanol al 70% durante 15 min. Después, las macromatrices se lavaron y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas con PBS estéril. Repetimos esta etapa de lavado tres veces. Después, las macromatrices se incubaron en medio de proliferación αMEM durante la noche a 37 °C antes de la siembra.

Siembra de macromatrices de pocillos

20 A partir de una suspensión celular de 5×10^6 células/ml, se centrifugaron hMSC y condrocitos a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 200 y se resuspendieron en 0,2 ml de medio. A partir de esta suspensión celular, se prepararon diluciones y el cocultivo con un máximo de $2,5 \times 10^4$ células en 1 µl de volumen sembrado por pocillo. Cada subcondición (es decir, diluciones celulares y relaciones de cocultivo) se sembró en todos los pocillos de una columna. Por ejemplo, en una macromatriz de 3 x 3, tres replicados o tres pocillos se sembraron con la misma subcondición. Las macromatrices de pocillos sembradas se incubaron durante 20 min a 37 °C en una atmósfera húmeda con el 5% de CO₂. Las células no desprendidas de una macromatriz se retiraron mediante lavado con medio de cultivo, después se dispusieron en un pocillo de una placa de 25 pocillos (Nunc) y se cubrieron con el medio de cultivo del tipo de células sembradas y se incubaron a 37 °C.

Cocultivo

35 Se sembraron hMSC:condrocitos en macromatrices de pocillos en medio de proliferación αMEM. Se sembraron tres mezclas diferentes de hMSC y condrocitos, con relaciones de hMSC:condrocitos de 0:1, 0,5:0,5 y 1:0 por triplicado en tres pocillos de una macromatriz de 3 x 3. El número máximo de células sembradas en un pocillo con proporciones obtenidas antes de la siembra en macromatriz de pocillos fue de $2,5 \times 10^4$.

Diferenciación condrogénica

40 Se cultivaron macromatrices con diluciones de hMSC durante 4 semanas en medio de diferenciación condrogénica. El medio de diferenciación condrogénica estaba compuesto por DMEM (GIBCO) con los suplementos siguientes: 0,01 µg/ml de TGFβ1 (RnD Systems, Reino Unido), Dex 0,1 nM, 100 µg/ml de piruvato de sodio (Sigma), 40 µg/ml de L-prolina (Sigma) , 100 µg/ml de estreptomycin, 1 x insulina-transferrina-selenita (ITS + (Sigma) y 100 U/ml de penicilina. La renovación del medio se produjo dos veces por semana.

Inmunohistoquímica

50 El kit de imágenes Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) se usó para obtener imágenes de la síntesis de ADN mediante proliferación de hMSC en macromatrices de pocillos. Los pocillos con hMSC se incubaron en una solución 1:1 de EDU en medio de proliferación a 37 °C durante 24 h. Después, estos se fijaron en formalina al 1% (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Los esqueletos 3D se embebieron en Tissue-Tek OCT (Qiagen, Países Bajos) y se dispusieron a -80 °C durante la noche. Luego se cortaron secciones de 5 µm en un criomicrotomo. Después, se permeabilizaron secciones sobre un portaobjetos y se lavaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo de inmunoglobulina anti-humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante, Dako, Dinamarca) y se contratiñeron con DAPI (Invitrogen). Se utilizó microscopía fluorescente para visualizar las señales de EdU (ADN) y DAPI (núcleos celulares).

Implante en ratones desnudos

60 Se realizaron estudios con ratones desnudos después del consentimiento del comité ético para estudios en animales (DEC-GDL Utrecht, Países Bajos). Se anestesiaron ratones desnudos de seis semanas de edad (Hdcpb:NMRI-nu Harlan, Países Bajos) con 0,02 ml de una mezcla 3,5:3:1 de ketamina (100 µg/ml):xilazina (20 µg/ml):atropina (0,5 µg/ml). Se implantaron subcutáneamente cuatro pocillos de una macromatriz de 3 x 3 que contenían cada una de las condiciones y subcondiciones por ratón en el lado posterior-lateral de la espalda y se suturaron. Las cuatro condiciones implantadas fueron: hMSC, hMSC diferenciadas, condrocitos y cocultivo de hMSC:condrocitos. Las 3 subcondiciones sometidas a ensayo por cada condición dentro de cada macromatriz se referencian en la tabla 2.

Después de 2 semanas (n = 10) y 4 semanas (n = 10) los ratones se sacrificaron mediante asfixia con CO₂ y las macromatrices se extirparon y se procesaron para su análisis.

Tabla 2. Subcondiciones cribadas en las macromatrices de pocillos implantadas subcutáneamente en ratones desnudos

| Número | Subcondición | Número | Subcondición |
|--------|---------------------|--------|------------------------|
| 1 | hMSC 4x, 2 sem | 13 | BPC 4x, 2 sem |
| 2 | hMSC 2x, 2 sem | 14 | BPC 2x, 2 sem |
| 3 | hMSC 1x, 2 sem | 15 | BPC 1x, 2 sem |
| 4 | hMSC 4x, 4 sem | 16 | BPC 4x, 4 sem |
| 5 | hMSC 2x, 4 sem | 17 | BPC 2x, 4 sem |
| 6 | hMSC 1x, 4 sem | 18 | BPC 1x, 4 sem |
| 7 | hMSC dif. 4x, 2 sem | 19 | hMSC:BPC 0:1 2 sem |
| 8 | hMSC dif. 2x, 2 sem | 20 | hMSC:BPC 0,5:0,5 2 sem |
| 9 | hMSC dif. 1x, 2 sem | 21 | hMSC:BPC 0:1 4 sem |
| 10 | hMSC dif. 4x, 4 sem | 22 | hMSC:BPC 0,5:0,5 4 sem |
| 11 | hMSC dif. 2x, 4 sem | 23 | hMSC:BPC 1:0 4 sem |
| 12 | hMSC dif. 1x, 4 sem | 24* | hMSC:BPC 1:0 2 sem |

* La cuantificación no fue posible

10 *Histología*

Se lavaron pocillos de una micromatriz 3 x 3 implantados en ratones desnudos en PBS y se fijaron en formalina al 10% a 4 °C durante la noche. Después de lavar en PBS, las macromatrices se cortaron en filas con una cuchilla afilada y se tiñeron con azul de metileno al 1%. Para la tinción de hematoxilina/eosina (H y E), después de cortar una fila de la macromatriz (3 pocillos) con una cuchilla afilada, las muestras se deshidrataron y se embebieron en glicol-acrilato de metilo (GMA). Se cortaron secciones de 5 µm con un micrótopo y se tiñeron con H y E.

15 *Cuantificación de tejidos*

20 Se realizó una imagen de una fila en la matriz de macromatriz de 3 x 3 teñida con azul de metileno al 1% con un estereomicroscopio. Las imágenes se procesaron cortando las imágenes de pocillos de una fila y convirtiéndolas en una imagen de píxeles binarios (figura 10E) con el programa informático ImageJ (fuente gratuita). Los píxeles en blanco y negro dentro de la imagen de un pocillo se cuantificaron con la función de histograma en ImageJ, obteniéndose los píxeles totales y los píxeles de tejido. La relación de píxeles de tejido/totales se obtuvo para cada pocillo de una fila de una macromatriz de 3 x 3 implantada.

25 *Análisis estadístico*

30 La significancia estadística se estableció en p < 0,05. Se implantaron pocillos de macromatriz 3 x 3 en ratones desnudos (n = 20) para su explante en las semanas 2 y 4. Se realizó una regresión lineal para las medias de la relación tejido/total [píxel/píxel] frente al número de células para cada subcondición (tabla 2) para n = 10 ratones por punto temporal. El análisis de Anova entre y dentro de las medias de la relación tejido/total [píxel/píxel] de todas las subcondiciones se realizó con las funciones anova1 y de comparación múltiple de Matlab (versión 7.0.4 lanzamiento 2007a; Mathworks, Natick, MA) en un sistema basado en ventana.

35 *Resultados*

40 Se utilizó fabricación de forma libre para desarrollar el sistema HTS. Esto nos permitió definir tanto la arquitectura del pocillo como la cantidad de pocillos en las matrices de columnas x filas (figura 2). Se sembraron pocillos rectangulares de 90° de ángulo con hMSC y se cultivaron en el momento. De esta forma, se observó que había una correlación inversa entre la organización de las hMSC y el tamaño del pocillo (figura 3): a medida que aumentaba el tamaño del pocillo (figura 3A-C), las hMSC se organizaban de agregados 3D a monocapas, mostrando así esa organización de hMSC podría controlarse mediante el volumen del pocillo y el tiempo de cultivo.

45 Además, diferentes diluciones celulares sembradas en diferentes pocillos ilustraron que era posible mantener diferentes niveles de organización de hMSC en diferentes pocillos (figura 5) en la misma macromatriz. El pocillo con el mayor número de hMSC contenía agregados 3D, mientras que las diluciones de hMSC produjeron pocillos con cultivos de hMSC monocapa. Esto demostró que se podían mantener diferentes condiciones en diferentes pocillos en un estilo de matriz. Por el contrario, las hMSC en discos PEOT PBT 2D no formaron agregados 3D ni en el momento ni en función de los cantidades de células (figura 4).

50 Se explotó la naturaleza dependiente del tiempo de la proliferación de hMSC para producir agregados de hMSC de diferentes tamaños (figura 6) en diferentes pocillos de la misma macromatriz. A medida que aumentaba el tiempo de

cultivo, las hMSC proliferaron y formaron agregados más grandes (figura 6).

Las macromatrices de pocillos se sometieron a ensayo *in vivo* en macromatrices de 3 x 3 pocillos fabricadas a medida para que se ajustaran en el bolsillo de un ratón. Cada uno de los 9 pocillos dentro de la macromatriz de 3 x 3 implantada midió 1 mm x 1 mm x 1,8 mm. (figura 3B). Se evaluaron un total de cuatro condiciones en cada una de las cuatro bolsas de ratones (figura 10) hMSC, hMSC diferenciadas, condrocitos bovinos primarios (PBC) y un cocultivo de hMSC:PBC. Para cada condición, se realizaron diluciones celulares 1x, 2x y 4x (figura 10) para un total de tres subcondiciones. Cada subcondición se sembró en cada columna de pocillos para obtener tres replicados en cada macromatriz de 3 x 3 pocillos.

Los explantes tuvieron lugar en las semanas 2 y 4, con 10 ratones sacrificados cada semana para evaluar las condiciones y subcondiciones implantadas en cada macromatriz. La figura 10 muestra la penetración del tejido (huésped e implantado) en todas las subcondiciones. Había presencia en todos los pocillos de protuberancias en los tejidos. En consecuencia, se cuantificó la cobertura tisular. Esto se realizó cuantificando la relación de cobertura de tejido (huésped e implantado) de píxeles del tejido con respecto a los píxeles del área total (figura 10E).

Se realizó un análisis de regresión lineal sobre las medias de área de tejido frente a cantidades de células para los tres tipos de células implantadas en macromatrices (figura 11). Este análisis mostró que había una fuerte correlación lineal para el área del tejido frente a las cantidades de células para las hMSC en la semana 2 ($R^2 = 0,84$, figura 11A) y para condrocitos primarios en la semana 4 ($R^2 = 0,94$, figura 11C). Todas las demás subcondiciones no mostraron un fuerte coeficiente de correlación.

Para comparar las subcondiciones entre sí, se realizaron análisis ANOVA y de comparación múltiple de las medias (figura 12, números de subcondiciones de la tabla 2, tabla ANOVA de la tabla 3). Los diagramas de recuadros (figura 12A) de cada subcondición mostraron que había diferentes subcondiciones entre sí ($p = 0,0058$ en la tabla 3). No obstante, el análisis de comparación múltiple de cada una de las medias mostró que estas diferencias no eran significativas (figura 12B). La relación de cobertura de tejido no fue significativamente diferente entre las condiciones en todas las macromatrices.

Tabla 3. Tabla ANOVA que compara medias de todas las subcondiciones

| Fuente | SS | df | MS | F | Prob>F |
|--------------|------|----|-------|------|--------|
| Subcondición | 0,53 | 22 | 0,024 | 2,42 | 0,0058 |
| Error | 0,46 | 46 | 0,011 | | |
| Total | 0,99 | 68 | | | |

Secciones histológicas representativas del tejido huésped anterior se tiñeron con H y E (figura 13). El tejido huésped por encima de los pocillos de la condición hMSC (figura 13A) mostró lúmenes de mayor tamaño y en mayor número que en las otras tres condiciones (figura 13B-D).

Cribado in vitro

Para demostrar que las condiciones sembradas en el sistema HTS 3D se pueden cuantificar con equipos de laboratorio, los sistemas HTS 3D se diseñaron con más de 200 pocillos que se ajustan a un microscopio confocal automático (figura 14). Los sistemas HTS 3D eran de dos tipos; uno producido de poli(ácido láctico) (PLLA) y fabricado mediante modelado por deposición fundida (figura 14A), y el otro producido de una resina acrílica fotopolimerizable y fabricado mediante estereolitografía (figura 14F-G). Para mostrar que los compuestos inertes y biológicos se pueden cribar en una forma de alto rendimiento en el sistema HTS 3D, sembramos tintes (figura 14B-C, H-I), perlas (figura 14D) y marcadores fluorescentes (figura 14J) en los sistemas HTS 3D. Tal como se muestra en la figura 14B-C y H-I, se sembraron tintes de diferentes colores (rojo, azul, amarillo, púrpura y blanco) y se pudieron observar con estereomicroscopía en ambos sistemas de PLLA y resina HTS 3D. Para cuantificar la intensidad de la luz emitida desde cada pocillo, se sembraron perlas fluorescentes a tres diluciones en pocillos fabricados de PLLA (figura 14D). La intensidad fluorescente media ($n = 3$), medida en un microscopio confocal automático, mostró que la intensidad de la luz disminuyó significativamente con el aumento del factor de dilución (figura 14E). Cuando se sembraron marcadores fluorescentes rodamina y FITC a diferentes diluciones en pocillos fabricados de resina (figura 14J), estos también mostraron una correlación entre el factor de dilución y la intensidad de luz media (figura 14K). Estos resultados muestran adicionalmente que los sistemas HTS 3D pueden adaptarse al equipo de laboratorio e implementarse en el cribado y la cuantificación de moléculas.

Cribado in vivo

El sistema HTS 3D se puede usar para cribar condiciones y compuestos que pueden conducir a resultados positivos para una aplicación específica. Para analizar adicionalmente este concepto en animales, se realizó un estudio de cribado de tipos de células o condiciones que se ha demostrado que inducen la regeneración de tejidos *in vivo* (Gurkan UA, Akkus O. The mechanical environment of bone marrow: a review. Ann Biomed Eng.36:1978-91. 2000). En el estudio, dos tipos de células; células madre mesenquimales humanas (hMSC) y condrocitos primarios bovinos;

un cocultivo de los mismos y sistemas HTS 3D vacíos comprendían las 4 condiciones analizadas en pocillos fabricados de PEOT/PBT. Se sembraron 9 pocillos de un sistema HTS 3D de tamaño 3 x 3 con 3 subcondiciones y se implantaron subcutáneamente en el bolsillo de un ratón desnudo. Para las hMSC y los condrocitos, las tres subcondiciones consistieron en tres diluciones: 1x, 2x y 4x con un máximo de 25.000 células por pocillo. Para el cocultivo, las tres subcondiciones consistieron en tres relaciones hMSC: condrocitos: 80:20, 50:50 y 20:80 también con un máximo de 25.000 células sembradas por pocillo. Cada subcondición se sembró en tres pocillos de la misma macromatriz; por lo tanto, para cada macromatriz, el número de muestra por subcondición fue n = 3. El sistema HTS 3D vacío actuó como control para la regeneración de tejidos sin células. Se implantaron cuatro sistemas HTS 3D por ratón en un total de 20 ratones desnudos, cada uno con las 4 condiciones descritas y sus respectivas subcondiciones. Se explantaron sistemas HTS 3D de 10 ratones después de 2 semanas, y de los otros 10 ratones después de 4 semanas para evaluar el tejido de los pocillos.

Para todas las condiciones, los sistemas HTS 3D explantados se embebieron en parafina y se seccionaron cada 5 µm con un micrótopo. Después, las secciones se dispusieron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina y se contratiñeron con eosina (figura 15). Debido a que las diferentes subcondiciones mostraron diferencias potenciales en la cantidad de tejido en un pocillo, el porcentaje de área de tejido se cuantificó en todas las condiciones para determinar los efectos positivos para la regeneración de tejido dentro de un pocillo. El análisis de la imagen se realizó en el área que contiene cada pocillo en los portaobjetos (figura 15) y, subsiguientemente, el porcentaje de área de tejido se obtuvo a partir del área total del rectángulo para al menos 3 secciones representativas para cada pocillo.

Para visualizar las tendencias observadas en las secciones de los sistemas HTS 3D implantados, se representó el porcentaje del área de tejido para cada subcondición 2 y 4 semanas después del implante (figura 16). El porcentaje de área de tejido de un pocillo varió dependiendo del tipo de célula y la subcondición analizada. Por ejemplo, en los pocillos que contienen hMSC (figura 16A), el área de porcentaje de tejido aumentó con diluciones más bajas y en comparación con el control. Esta tendencia no estaba necesariamente presente en los pocillos sembrados con condrocitos (figura 16B), en los que ratones de las semanas 2 y 4 mostraron tendencias contradictorias. A pesar de la siembra de la misma cantidad total de células en todos los pocillos, los pocillos sembrados con el cocultivo también mostraron áreas de menor porcentaje de tejido para los pocillos que contenían las cantidades más bajas de condrocitos (figura 16C).

Para determinar si hubo tendencias significativas en el porcentaje de área de tejido, obtuvimos la media del porcentaje de área de tejido (n = 3) para todas las subcondiciones en los 20 ratones. A continuación, se realizó un análisis ANOVA de las medias para cada sistema HTS 3D, comparando las condiciones y el control entre sí para cada ratón estadísticamente independiente. El resultado de estos análisis fue que algunos ratones mostraron diferencias significativas (p < 0,05) en el porcentaje de área de tejido, mientras que otros no lo hicieron (tablas 4, 5 y 6). Por ejemplo, el 50% de los ratones mostró una diferencia significativa en el porcentaje de área de tejido entre la dilución 1x y el control en la semana 4. Esto significa que para la mitad de los ratones en la semana 4, cuanto mayor sea el número de células (1 x dilución), mayor será el porcentaje de área de tejido en un pocillo. Para algunas subcondiciones de los condrocitos, la mitad de los ratones mostraron un porcentaje de área de tejido significativamente mayor en algunas subcondiciones (tabla 5). Dado que los cocultivos compartieron la misma cantidad total de células (25.000), fue interesante que el 56% de los ratones mostraran un porcentaje de área de tejido significativamente mayor cuando se sembró el mayor número de hMSC (80:20) (Tabla 6).

Para la regeneración de tejidos, estos resultados sugieren que las hMSC inducen positivamente mayores cantidades de tejido en comparación con los condrocitos y los controles. Para comprender la naturaleza biológica del tejido en los pocillos que contienen hMSC, se tiñeron los portaobjetos con marcadores de tejido específicos para la formación de colágeno y proteoglicanos (figuras 17 y 18).

Tabla 4. Las diferencias en el área de porcentaje de tejido para las diluciones de hMSC fueron significativas en algunos animales. La tabla muestra el número de animales (%) que muestran una diferencia significativa (p < 0,05) en el porcentaje de área de tejido después del análisis ANOVA de las medias. El porcentaje de área de tejido para tres diluciones y el control se compararon entre sí. El texto en cursiva y el texto en negrita muestran el número de animales que muestran diferencias estadísticamente significativas en la semana 2 y 4, respectivamente.

| | 1X | 2X | 4X | Control |
|---------|------------|------------|------------|---------|
| 1X | | 0% | 33% | 25% |
| 2X | 13% | | 11% | 25% |
| 4X | 0% | 13% | | 50% |
| Control | 50% | 50% | 38% | |

Tabla 5. Las diferencias en el porcentaje de área de tejido para las diluciones de condrocitos fueron significativas en algunos animales. La tabla muestra el número de animales (%) que muestran una diferencia significativa (p < 0,05)

en el porcentaje de área de tejido después del análisis ANOVA de las medias. El porcentaje de área de tejido para tres diluciones y el control se compararon entre sí. El texto en cursiva y el texto en negrita muestran el número de animales que muestran diferencias estadísticamente significativas en la semana 2 y 4, respectivamente.

| | 1X | 2X | 4X | Control |
|---------|------------|------------|------------|---------|
| 1X | | 25% | 25% | 38% |
| 2X | 50% | | 50% | 50% |
| 4X | 25% | 0% | | 38% |
| Control | 25% | 25% | 25% | |

5
10
15
20
25
30
35

Tabla 6. Las diferencias en el porcentaje de área de tejido para las relaciones de cocultivo fueron significativas en algunos animales. La tabla muestra el número de animales (%) que muestran una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de área de tejido después del análisis ANOVA de las medias. El porcentaje de área de tejido para tres relaciones de hMSC:condrocitos y el control se compararon entre sí. El texto en cursiva y el texto en negrita muestran el número de animales que muestran diferencias estadísticamente significativas en la semana 2 y 4, respectivamente.

| hmsc:condrocitos | 80/20 | 50/50 | 20/80 | Control |
|------------------|------------|------------|------------|---------|
| 80/20 | | 11% | 22% | 44% |
| 50/50 | 33% | | 33% | 44% |
| 20/80 | 33% | 11% | | 11% |
| Control | 56% | 11% | 33% | |

Para identificar efectos positivos para la regeneración de tejidos, investigamos la organización de los tejidos dentro de los pocillos mediante tinción para colágeno y tejido muscular (figura 17). Los sistemas de control HTS 3D mostraron tejido muscular contenido dentro de los pocillos (figura 17A) mientras que los pocillos que contenían diluciones de hMSC no mostraron tejido muscular (figura 17B-C). Además, las diluciones 1x y 2x de hMSC mostraron fibras de colágeno alineadas y vasos sanguíneos, lo que demostró que los pocillos que contienen más de 12.500 hMSC (dilución 2x) apoyan positivamente un mayor grado de organización y regeneración de tejidos.

Para identificar el tipo de tejido contenido dentro de los pocillos, se tiñeron glucosaminoglicanos como marcadores de tejido de cartílago (figura 18). En comparación con los controles, el cocultivo que contenía mayores cantidades de hMSC (80:20) fue positivo para glucosaminoglicanos (figura 18D). A partir del porcentaje de área de tejido, los marcadores de colágeno y glucosaminoglicanos, llegamos a la conclusión de que los pocillos que producen de manera positiva la regeneración tisular fueron los que contenían cantidades de hMSC superiores a 12.500 células (dilución 1x y 2x) y relaciones hMSC:condrocitos iguales a 80:20. Por lo tanto, estas tres subcondiciones son resultados positivos, que son un ejemplo de cómo los sistemas HTS 3D pueden aplicarse en el cribado *in vivo* de células y compuestos para tratamientos, descubrimiento de fármacos e investigación preclínica.

Conclusiones

El HTS reduce el número de animales utilizados *in vivo* en experimentos con animales. Se pueden fabricar miles de pocillos con una amplia gama de materiales, en los que el tamaño de HTS se puede definir para el sitio de implante del animal sometido a ensayo. Esto reduce significativamente los costos financieros y ahorra vidas de los animales vertebrados utilizados en las industrias química, biotecnológica, farmacéutica y biomédica, entre otras.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un constructo tisular 3D a partir de células, que comprende las etapas siguientes:
- 5 a. introducir un medio que comprende células en un pocillo de un sistema multipocillo fabricado de un material biocompatible, que comprende al menos 3 pocillos, en el que dichos pocillos tienen una pared y un fondo, un volumen de entre 0,125 y 4,0 mm³ y un espesor de pared de al menos 50 micrómetros;
- 10 b. cultivar las células para obtener un constructo tisular 3D,
en el que el sistema multipocillo no comprende un esqueleto polimérico sintético 3D.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los pocillos tienen un diámetro interior superior a 0,5 mm.
- 15 3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que las células son células madre, preferentemente células madre mesenquimales humanas (hMSC), o condrocitos.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que las células son de un primer tipo de células y en el que se introducen células de un segundo tipo en el pocillo y se cultivan conjuntamente con las células del primer tipo de célula en la etapa b, en el que las células del segundo tipo estimulan el crecimiento de las células del primer tipo en la formación de dicho constructo tisular 3D.
- 20 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que se forman constructos tisulares 3D en 2 o más pocillos del sistema multipocillo y en el que se aplican diferentes condiciones de cultivo a los 2 o más pocillos.
- 25 6. Procedimiento para producir un sistema multipocillo para su uso en un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que comprende las etapas siguientes:
- 30 a. fundir dicho material biocompatible en una camisa térmica;
- b. extrudir el material biocompatible fundido a presión a través de una boquilla para formar una fibra trazada;
- 35 c. se repite la etapa b, depositando así una fibra trazada subsiguiente en paralelo a una distancia de entre 0,125 y 2,0 mm junto a la última fibra depositada hasta que se forma una capa;
- d. se deposita una capa subsiguiente sobre la capa previa, depositándose las fibras que forman dicha capa subsiguiente en un ángulo preferentemente de entre 10 y 90 grados con respecto a las fibras de la capa previa; y
- 40 e. el paso d se repite hasta que se alcanza la altura deseada.
7. Un sistema multipocillo fabricado de un material biocompatible que se puede obtener mediante un procedimiento según la reivindicación 6 y adecuado para su uso en un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que comprende al menos 3 pocillos, en el que dichos pocillos tienen una pared y un fondo, un volumen de entre 0,125 y 4,0 mm³ y un espesor de pared de al menos 50 micrómetros y en el que el sistema multipocillo no comprende un esqueleto polimérico sintético 3D.
- 45 8. Sistema multipocillo según la reivindicación 7, en el que dicho material biocompatible es poli(ácido láctico) o PEOT/PBT.
- 50 9. Animal no humano que comprende un sistema multipocillo según las reivindicaciones 7 u 8.

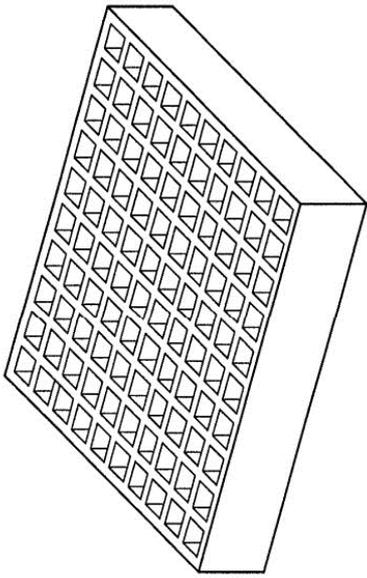


Fig. 1A

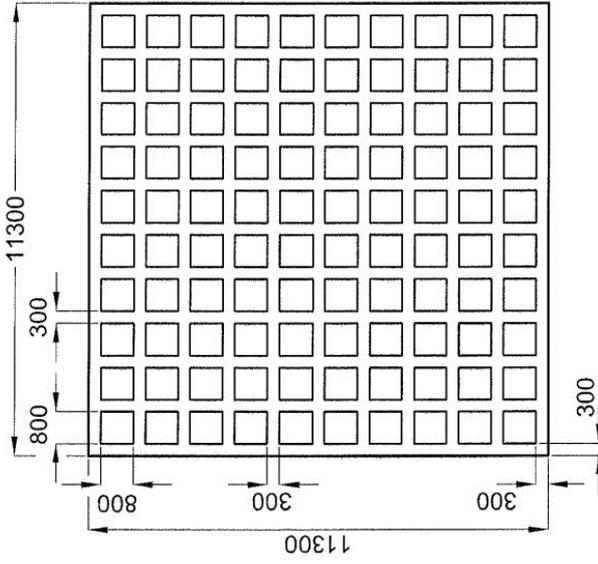


Fig. 1B

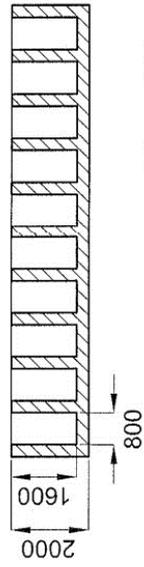


Fig. 1C

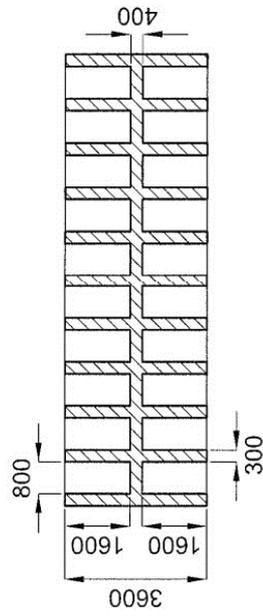


Fig. 1D

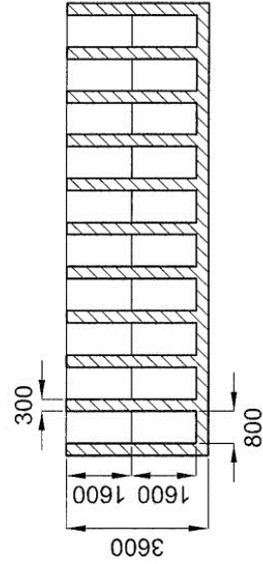


Fig. 1E

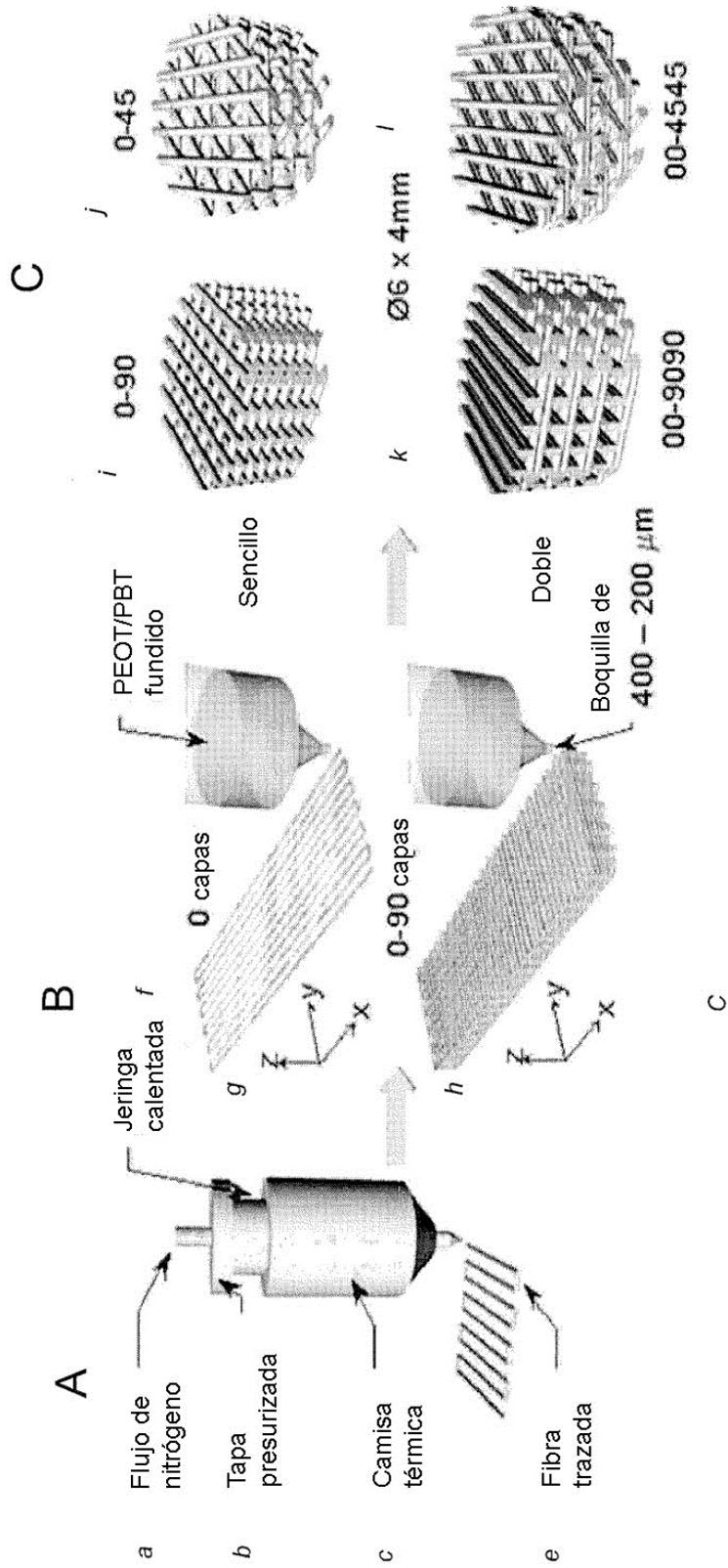


Figura 2

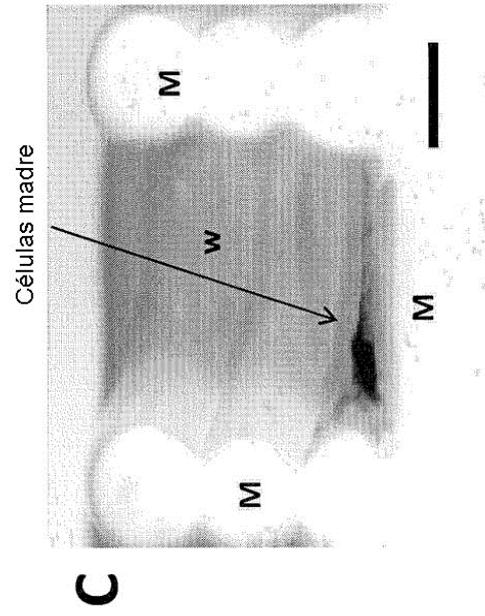
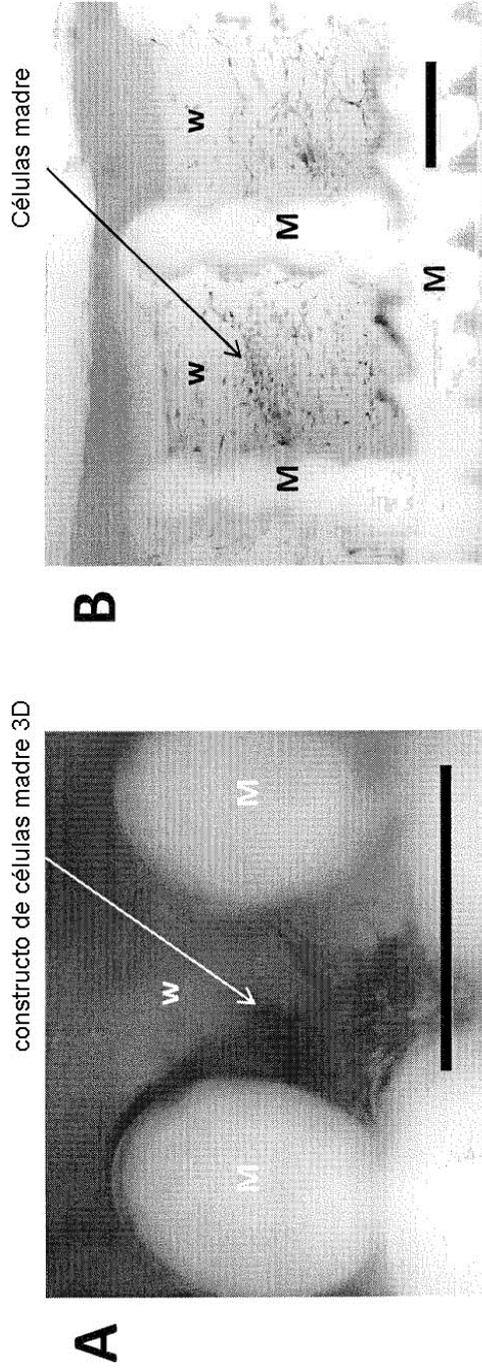


Figura 3

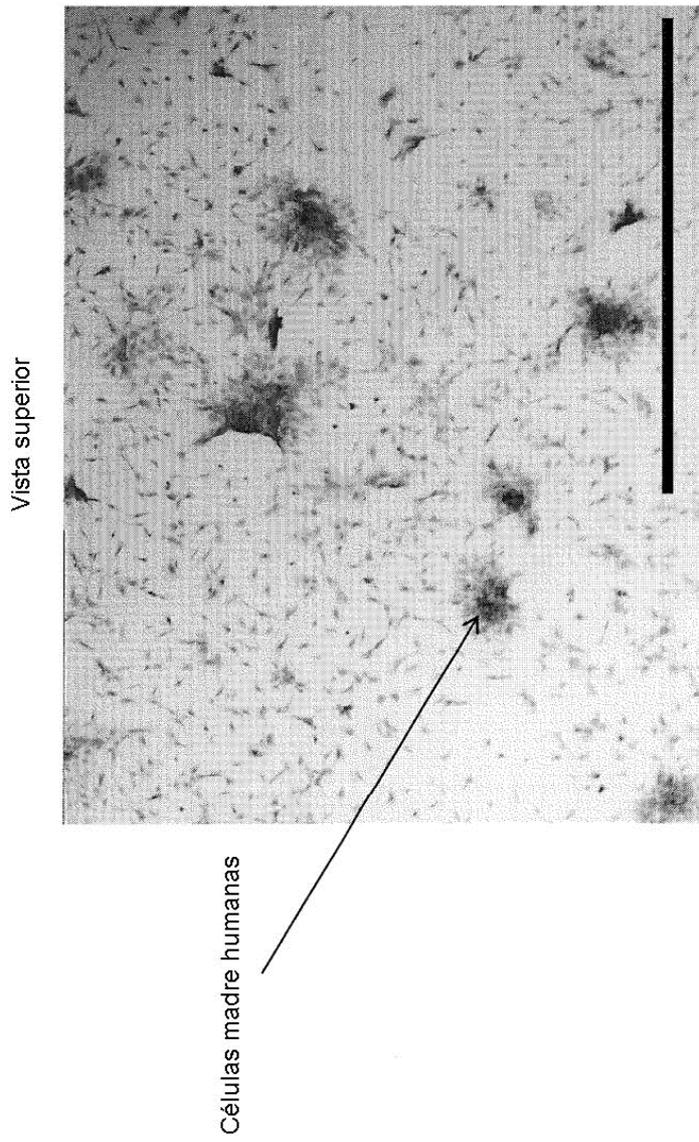


Figura 4

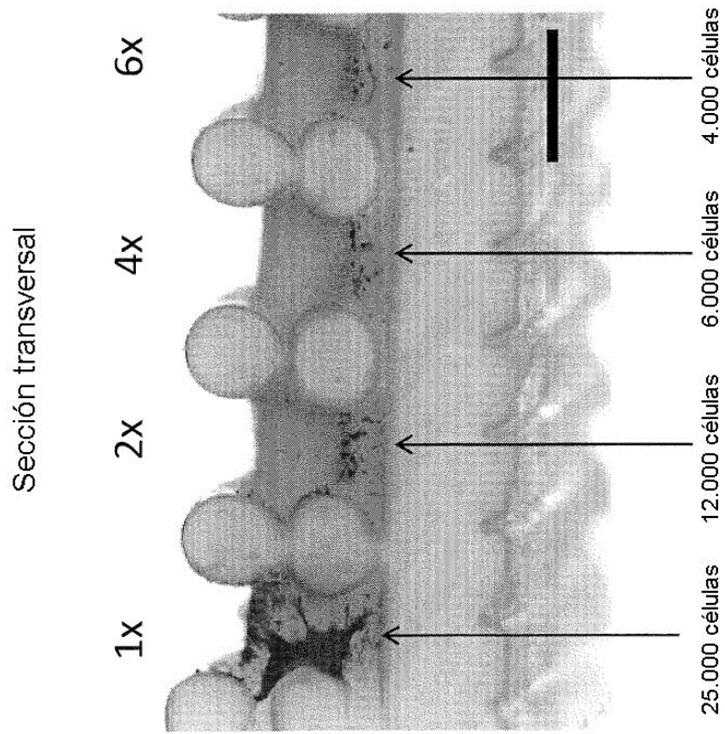


Figura 5

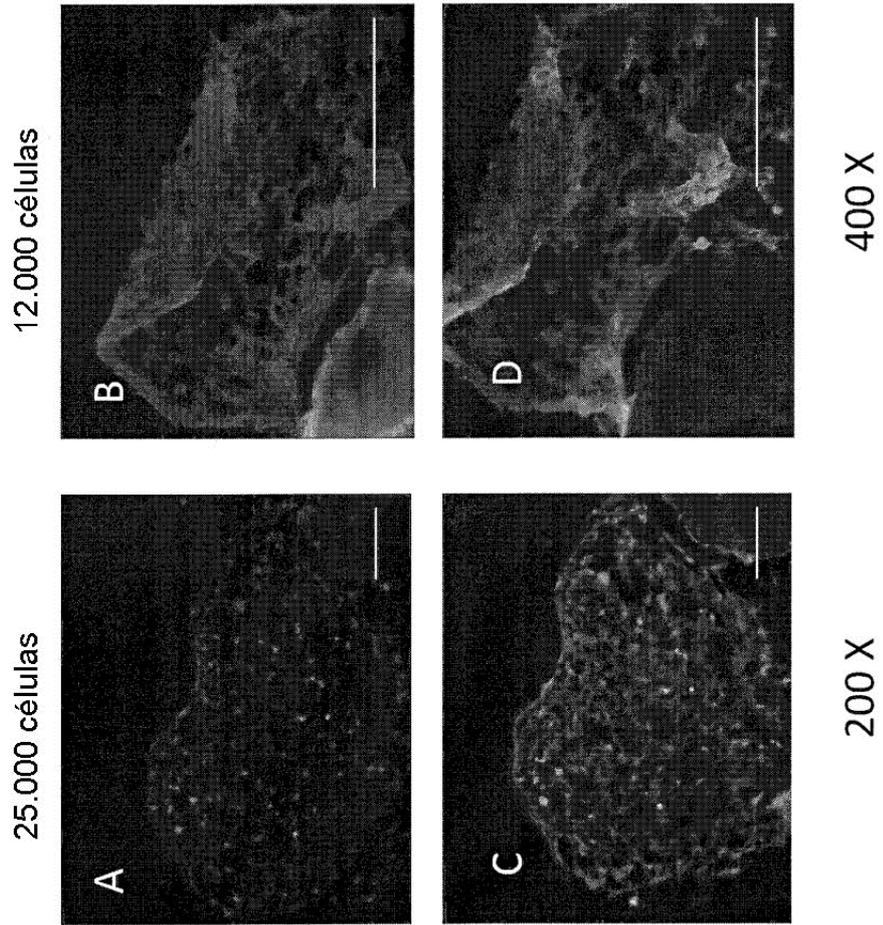


Figura 6

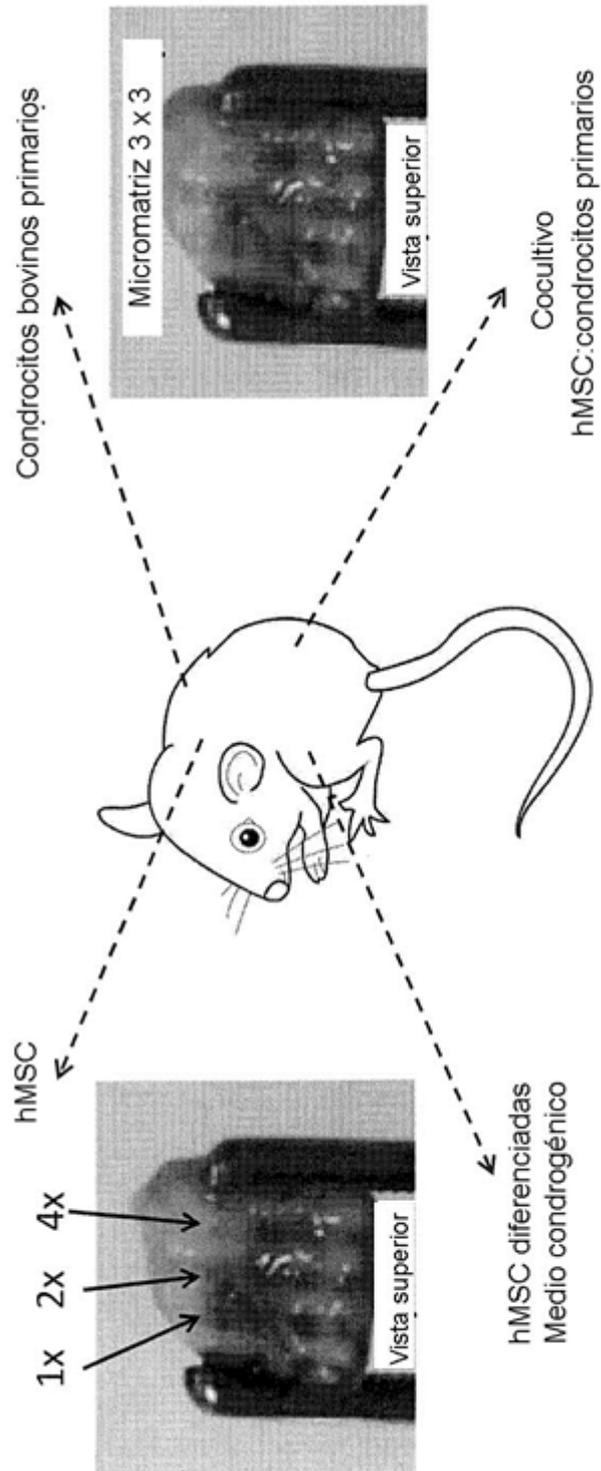


Figura 7

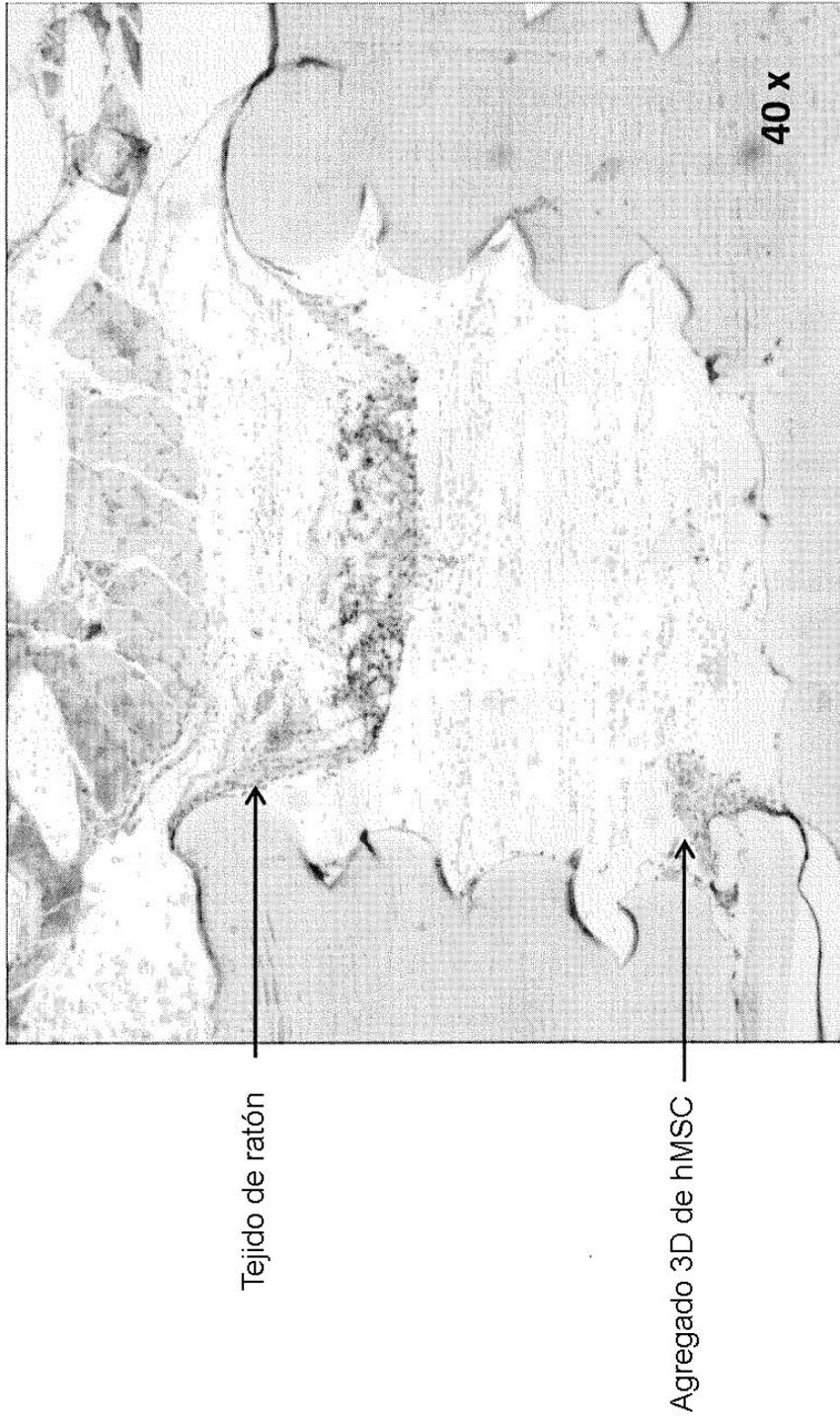


Figura 8

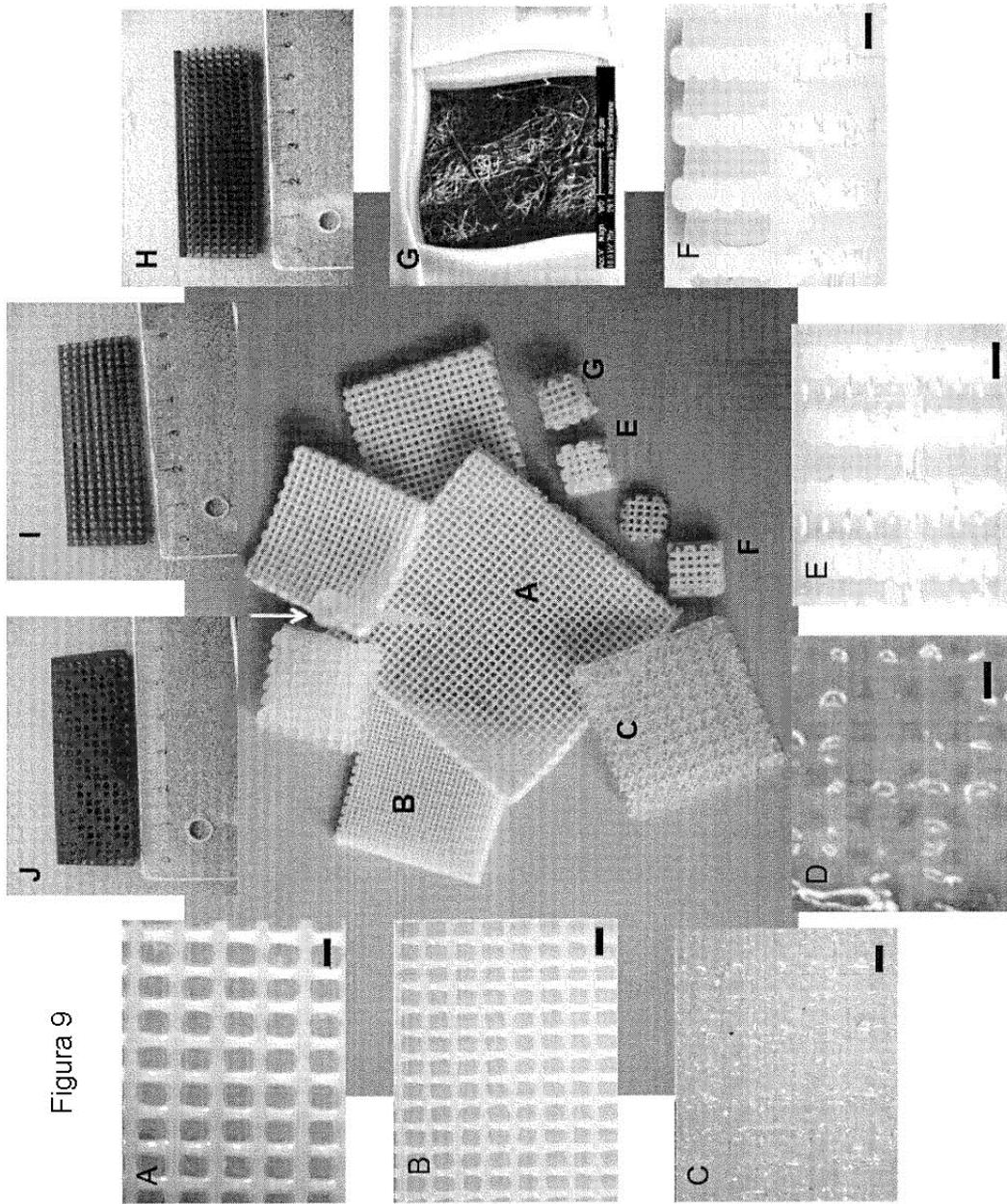


Figura 9

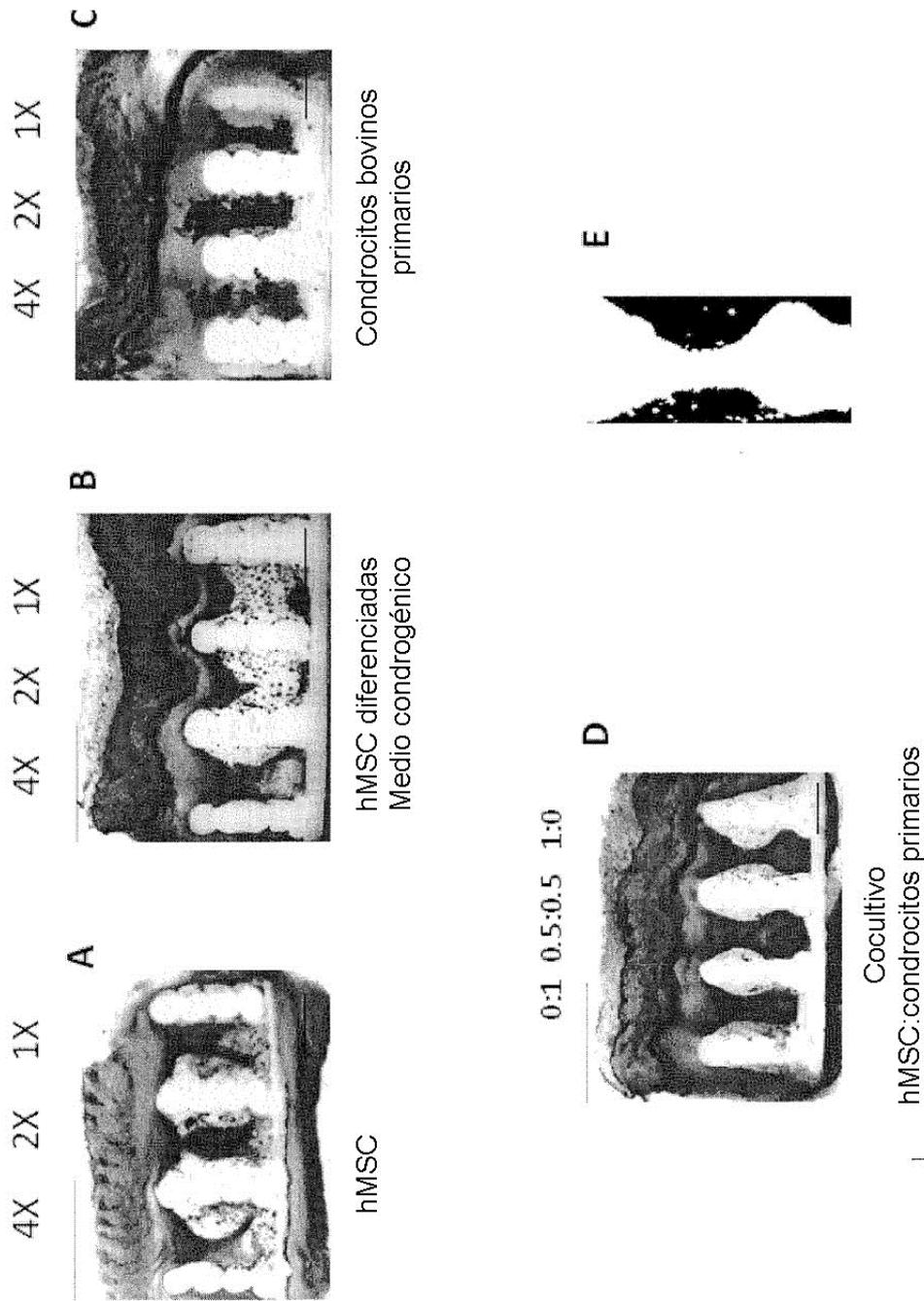


Figura 10

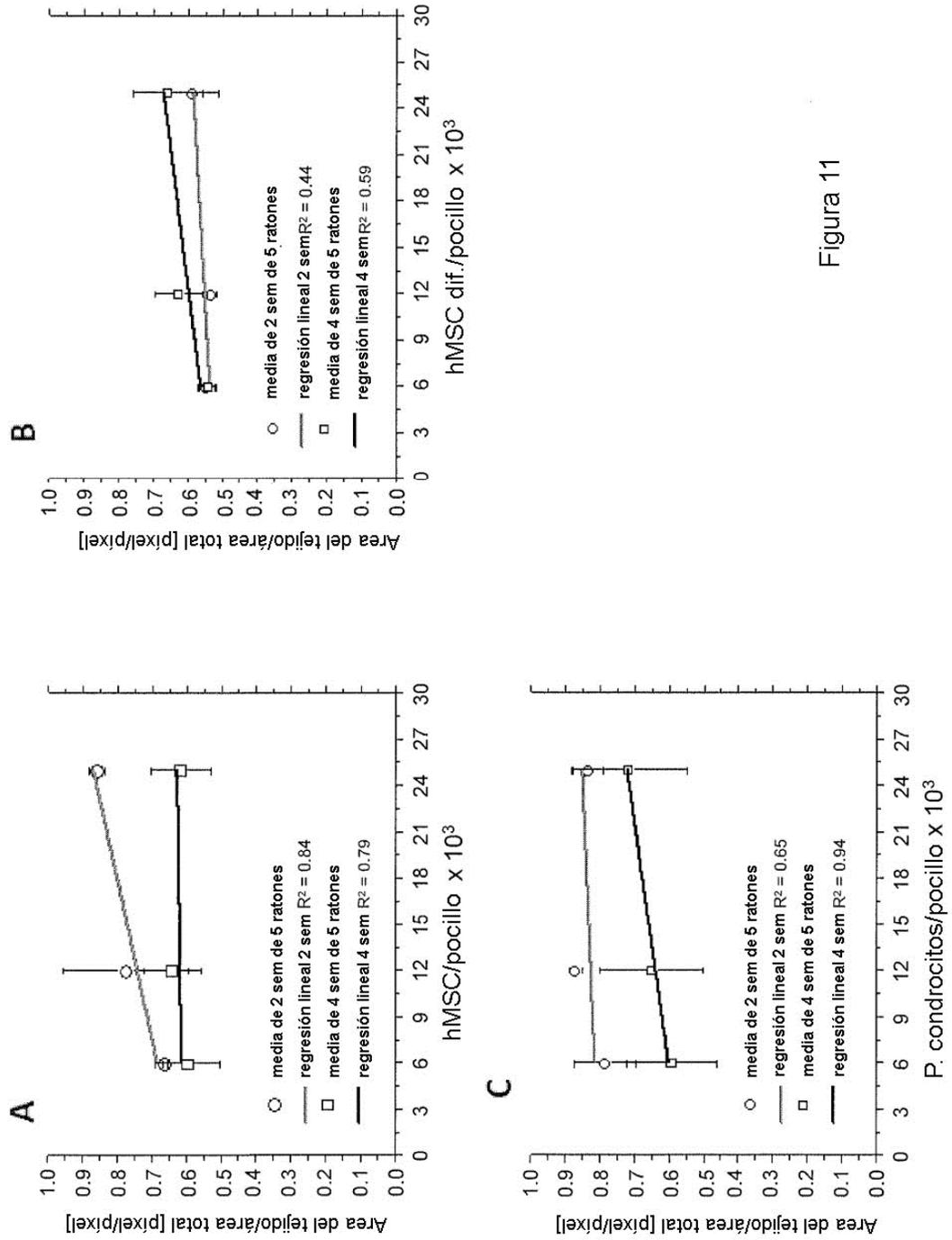


Figura 11

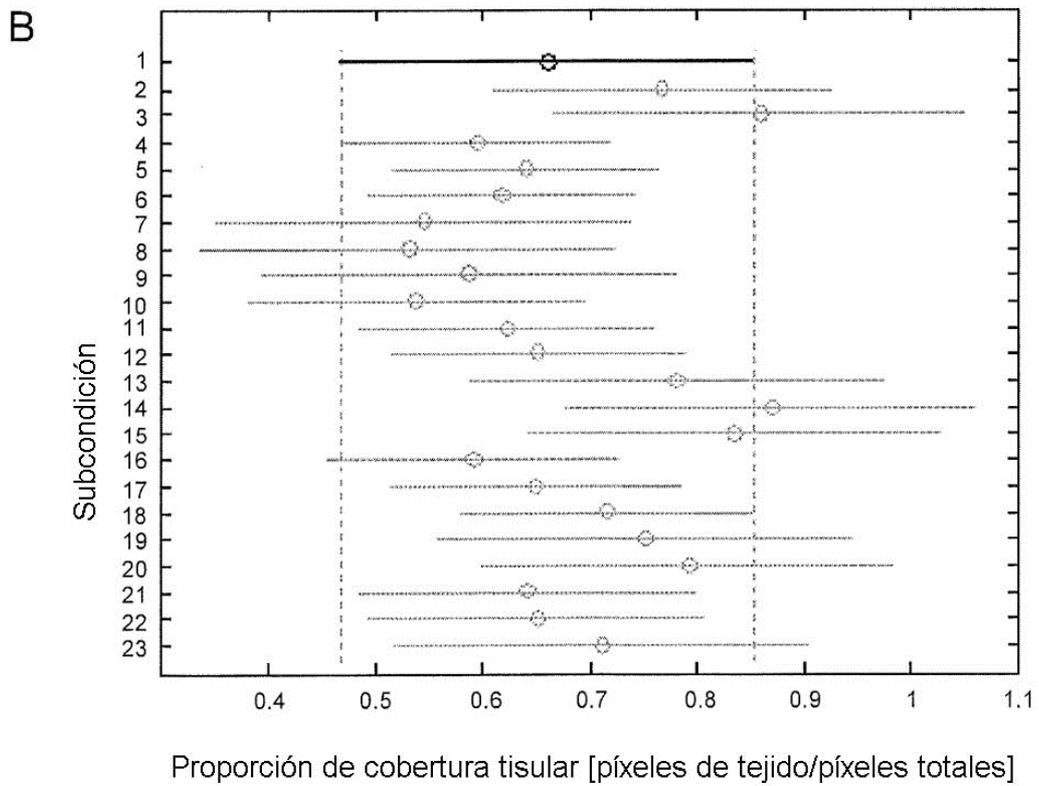
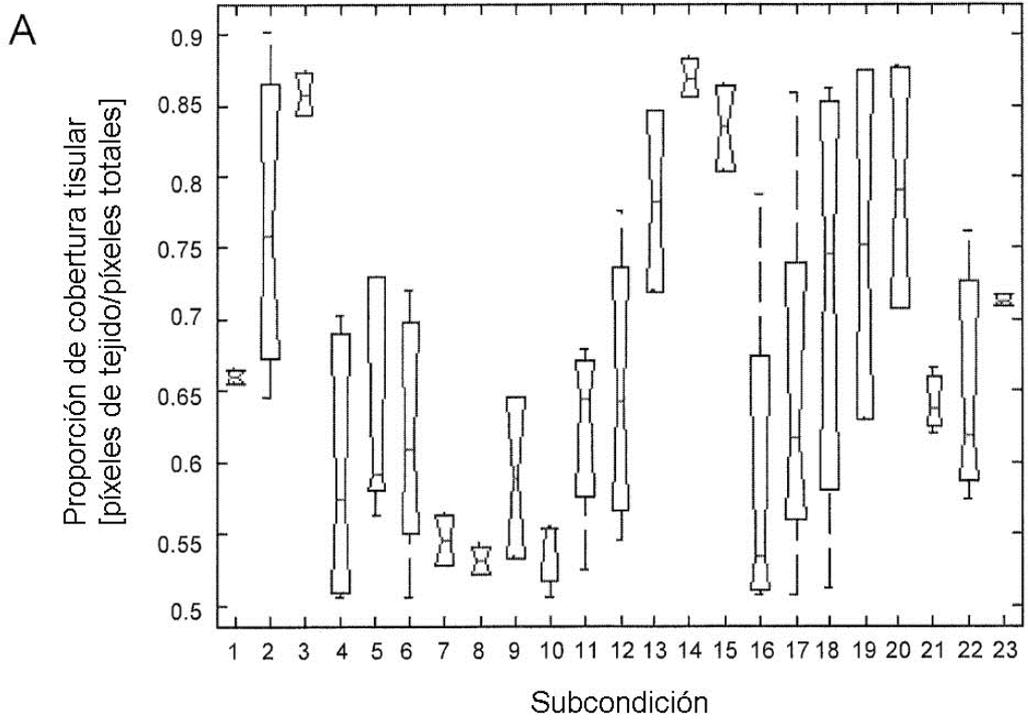


Figura 12

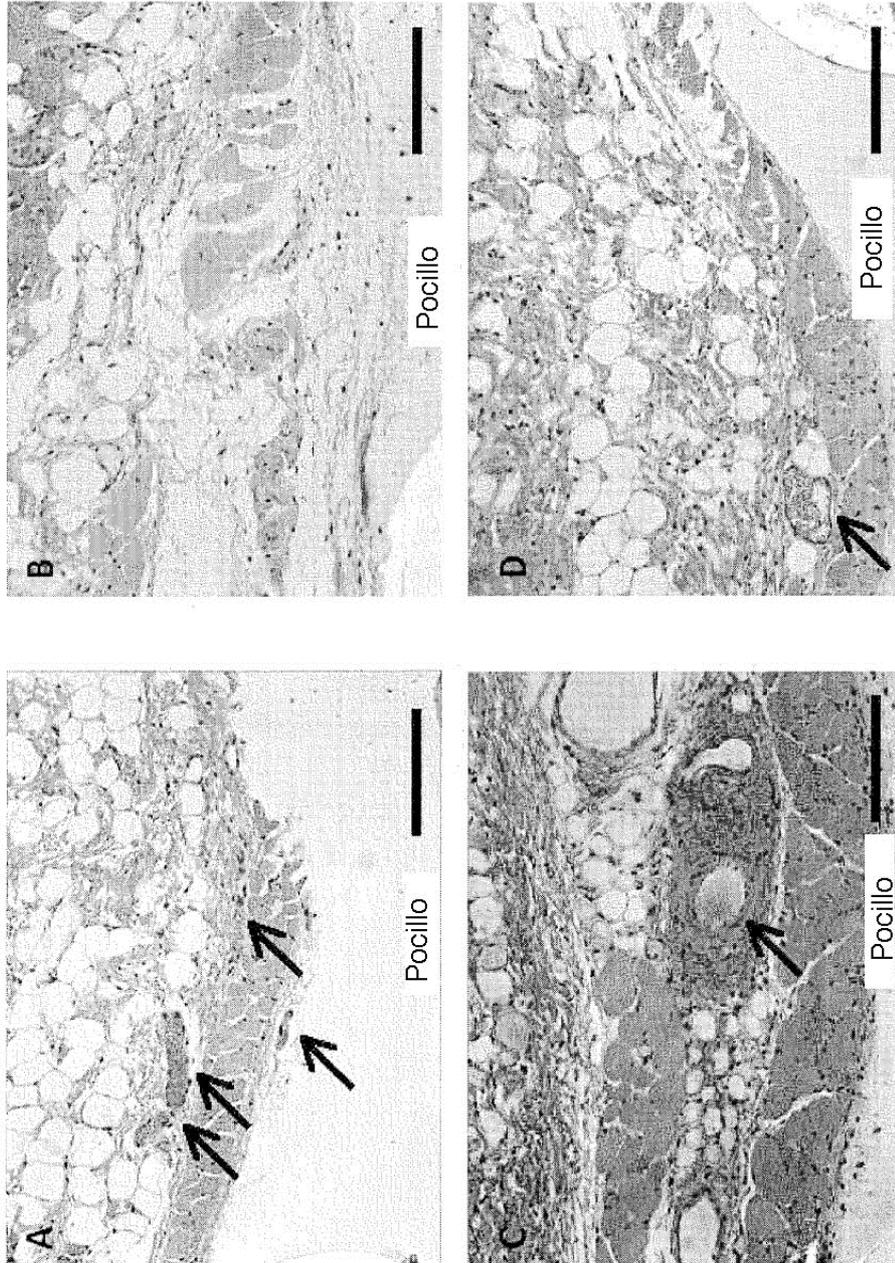
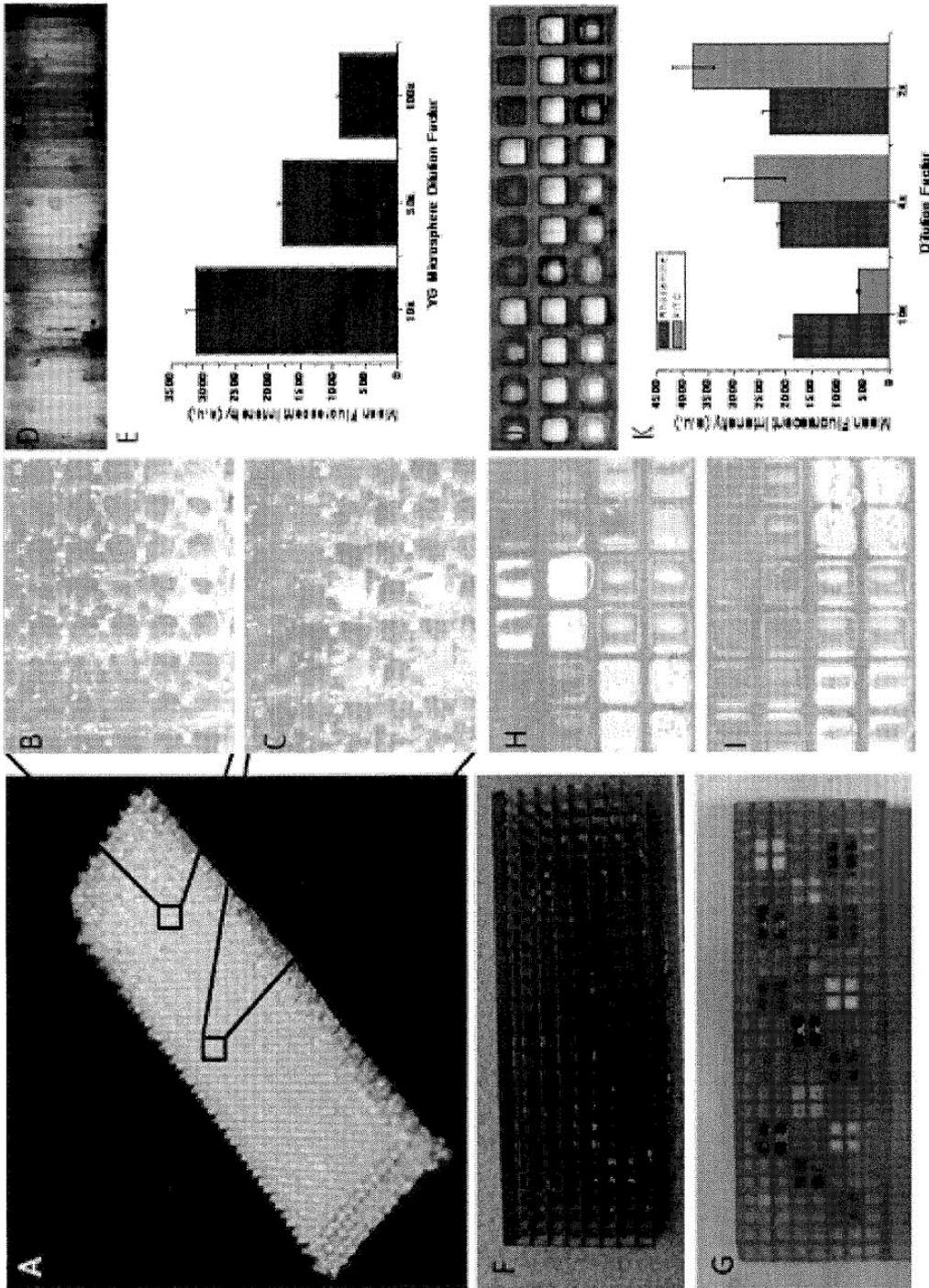


Figura 13

Figure 14



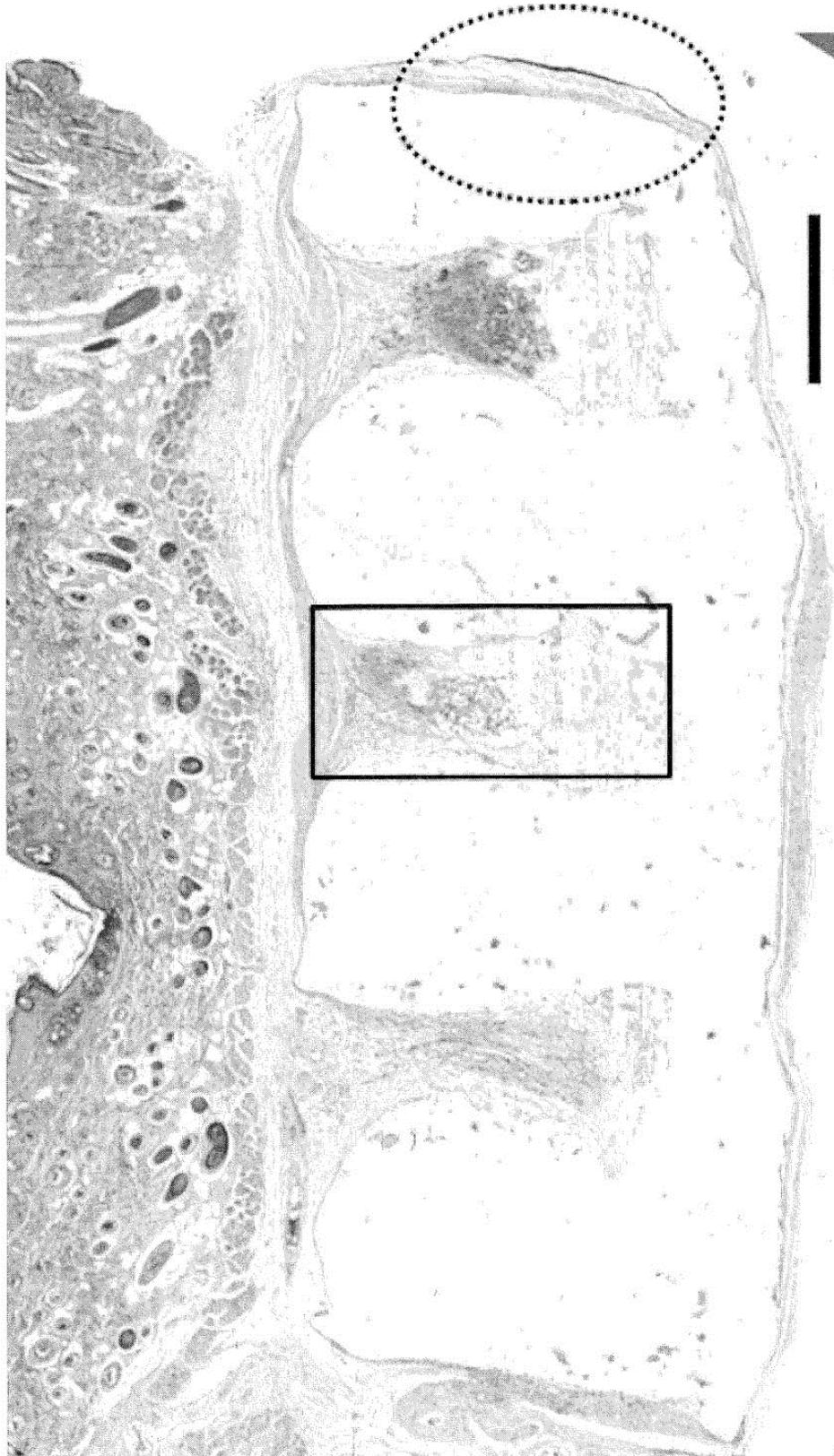
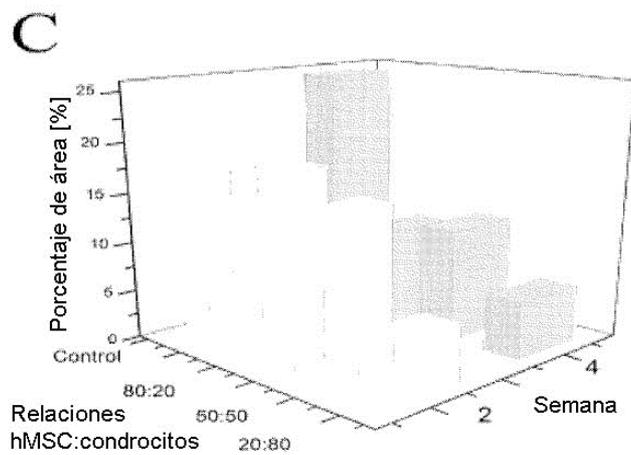
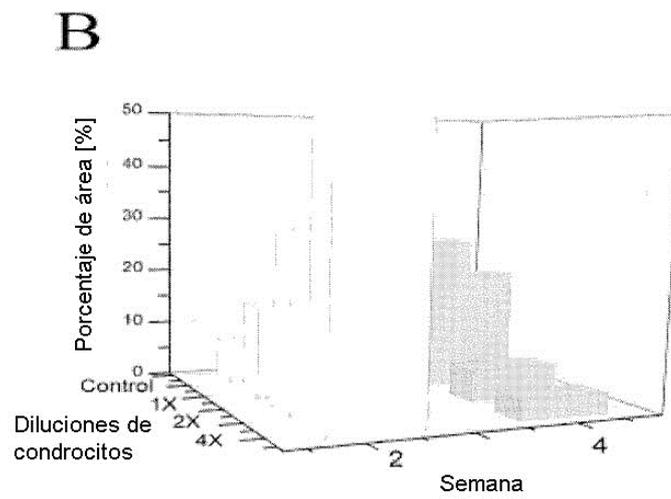
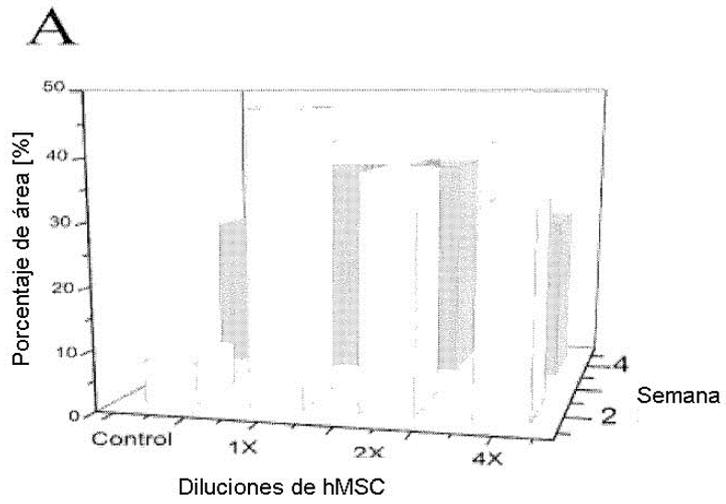


Figura 15

Figura 16



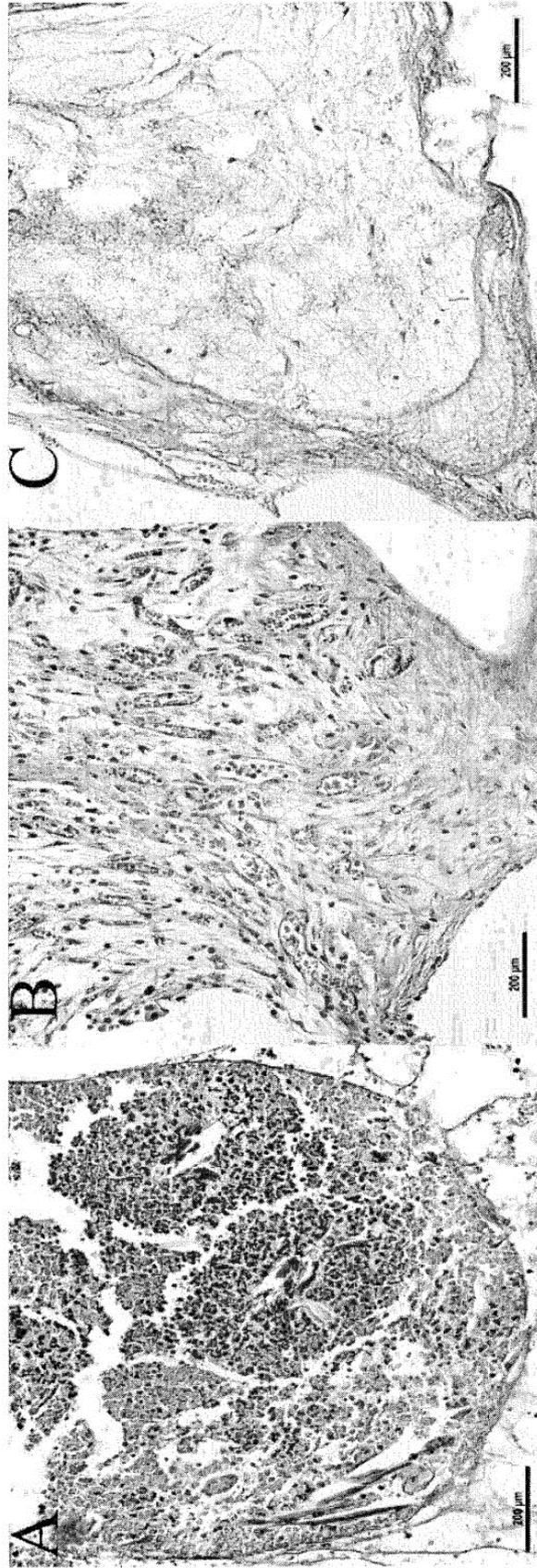


Figura 17

Figura 18

