

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 744 321

51 Int. CI.:	
C12M 3/00	(2006.01)
C12M 1/32	(2006.01)
C12M 1/42	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacior	nal: 19.08.2	016 PCT/EP2016/00	69700
87) Fecha y número de publicación internacional:	23.02.2017	WO17029393	
96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	19.08.2016	E 16757211 (4)	
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea:	05.06.2019	EP 3337888	

54 Título: Biorreactor mecánico

30 Prioridad:	73 Titular/es:
 19.08.2015 GB 201514734 (45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 24.02.2020 	THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW (50.0%) The Gilbert Scott Building University Avenue Glasgow Strathclyde G12 8QQ, GB y UNIVERSITY OF THE WEST OF SCOTLAND (50.0%)
	DALBY, MATTHEW; NIKUKAR, HABIB; PEMBERTON, GABRIEL; CURTIS, ADAM; REID, STUART y CHILDS, PETER (74) Agente/Representante: VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Biorreactor mecánico

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un biorreactor mecánico, es decir, un dispositivo para transferir vibraciones a cultivos celulares con el fin de estimular diversos procesos biológicos. Las vibraciones tienen una amplitud de nanoescala (por ejemplo, menos de 100 nm). En particular, la invención se refiere a un biorreactor para estimular los citoblastos mesenquimales e inducir la osteogénesis, es decir, la expresión aumentada de genes osteogénicos.

Antecedentes de la invención

Los aumentos de la esperanza de vida que se observan en el mundo desarrollado son un valioso indicador del estado de la medicina moderna. Sin embargo, una medida menos cuantificable es la calidad de la vida durante esos años adicionales. La incidencia de lesiones esqueléticas junto con las dolencias relacionadas con la edad tales como la osteoporosis y la artrosis proporcionan una de dichas medidas. Los tratamientos que implican aumentar la densidad ósea o la curación de fracturas son áreas donde el potencial regenerativo de los citoblastos mesenquimales (MSC) podría resultar beneficiosos [1, 2].

20

10

Se ha demostrado ya la osteogénesis controlada de los MSC a través de medios mecánicos por métodos diversos, incluyendo medios pasivos y activos. Los métodos pasivos tales como la topografía alterada del sustrato y la rigidez proporcionan un mecanismo basado en alterar el perfil de la adhesión [3-7], mientras que los métodos activos incluyen la exposición a variaciones de fuerza procedentes de fuentes externas [8-13]. La fuerza centrífuga, las vibraciones y

- 25 el flujo de cizalladura han proporcionado, todos ellos, aumentos en la osteogénesis a través de la modulación externa de la fuerza experimentada por la estructura celular. El trabajo de D Ingber ha planteado una descripción potencial por la naturaleza sensible a la mecánica muy optimizada del citoesqueleto cuando se considera como una única unidad sensorial [14, 15]. Los mecanismos variables que inducen la osteogénesis están todavía explorándose y se acepta ahora que la estimulación de células a macro y microescala, utilizando armazones extracelulares y polímeros
- 30 biomiméticos para inducir la diferenciación, es de uso significativo [16-19]. Sin embargo, existe ahora una compresión creciente de que la estimulación y la manipulación adicional de las células a nanoescala pueden tener un efecto complementario e incluso mayor posteriormente sobre la diferenciación y el control de los citoblastos [20, 21].
- Uno de los componentes clave que estos estudios ha resaltado es la importancia de las adhesiones focales y las
 integrinas como transductores del proceso mecanotransductor osteogénico [22, 23]. Alterar la topografía puede permitir la formación de adherencias focales fibrilares más grandes [24, 25], y el proceso resultante que impulsa la osteogénesis de los MSC puede incluir la señalización de la quinasa de adhesión focal (FAK). Esta cascada sensorial biológica puede posteriormente aumentarse a través de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (incluyendo la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK)) y activar el factor 2 de transcripción relacionado con
 Runt (RUNX2) y osterix. Estos factores de transcripción están vinculados con la diferenciación osteogénica, junto con
- los genes de la osteocalcina (OCN), osteonectina (ONN), fosfatasa alcalina (ALP), [26-28].

Se ha explorado el uso de la vibración como estímulo mecanotransductor con parámetros de vibración variados [29-31]. La vibración de citoblastos del ligamento periodontal a 50 Hz (onda sinusoidal) con aceleración máxima de 3 g
mostró un aumento en los marcadores de osteogénesis [32] mientras que otro estudio de adipocitoblastos estimulados utilizando ondas cuadradas de 50 y 100 Hz con aceleraciones de 3 g mostró un aumento en los niveles de actividad de ALP y deposición mineral, sin embargo, no al mismo nivel producido por el medio osteogénico [33]. Aunque interesantes, ningún estudio menciona la amplitud de la vibración utilizada. Si el complejo de adhesión focal es importante para producir la osteogénesis, entonces las amplitudes de tamaño nanométrico, destinadas a la escala de longitud del complejo de la integrina podrían encontrar una estimulación creciente de la señalización relacionada con

la adhesión focal.

El uso de accionadores piezoeléctricos para producir vibraciones de amplitud nanométrica se ha convertido ahora en un punto central de la investigación [21, 34, 35]. Curtis et al. y Nikukar et al. mostraron que las células endoteliales y
 los MSC son sensibles a amplitudes de decenas de nanómetros. El uso de dispositivos de placas Petri individuales de único accionador mostró la capacidad de producir una vibración vertical precisa sobre la superficie de crecimiento completa.

El resultado de estos estudios ha mostrado que la nanovibración de células endoteliales a frecuencias bajas (1-10 Hz) indica que la expresión de la proteína y la expresión génica vinculadas con un fenotipo endotelial creciente están reguladas en exceso. Además, los experimentos que incorporan ruido blanco o barridos de frecuencia muestran la importancia de una señal coherente en la producción de una respuesta biológica. La estimulación de los MSC a frecuencias mayores (500-1000 Hz), utilizando también nanovibración, ha mostrado la osteogénesis de los MSC. Una ampliación de este estudio realizada por Pemberton, Childs et al. hasta 5000 Hz utilizado en tándem con nanotopografía muestra que los dos estímulos no son aditivos, donde solamente la vibración produce una mayor regulación en exceso de la osteogénesis. Una comparación de 1,3 y 5000 Hz muestra también que, por encima de

1000 Hz, se muestra poca regulación en exceso adicional de los marcadores anteriores [36].

El documento EP2538989 divulga un biorreactor para transmitir vibraciones que estimulan la osteogénesis dirigida.

5 Sumario de la invención

En su forma más general, la presente invención proporciona un biorreactor configurado para transmitir vibraciones uniformes a través de una superficie receptora relativamente grande (con respecto a la amplitud de las vibraciones). Esta es una innovación importante ya que permite que múltiples muestras reciban una idéntica estimulación a

- 10 nanoescala, lo que puede permitir que el proceso se amplíe significativamente. La invención es aplicable a amplitudes de vibración nanoescalares, donde no es evidente diseñar un dispositivo que lleve a cabo esta función consistentemente, ya que muchos materiales presentan deformación natural a una escala que podría enmascarar o inhibir la transferencia de energía de vibración nanoescalar. La invención presenta por tanto un nivel de consistencia de la vibración entre muestras que es único y necesario para una reproducibilidad biológica.
- 15

El biorreactor de la invención puede utilizarse como una plataforma para la osteogénesis consistente de los MSC *in vitro* proporcionando estímulos que son reproducibles y precisos. El diseño del dispositivo es tal que la vibración vertical se administra aislada de otros efectos tales como la rotación, el flujo de cizalladura, la vibración horizontal o el movimiento de las ondas superficiales. La producción de vibración vertical nanoescalar con una amplitud, frecuencia

- 20 y forma de la onda bien definidas permite el análisis cuantitativo de la aceleración oscilatoria a la que están expuestas las células junto con una estimación de las fuerzas máximas aplicadas. Esto permite que los estímulos se pongan en contexto con otros estudios vibratorios y de centrifugación y permitirá la comparación de la osteogénesis entre frecuencias, amplitudes y aceleraciones de las formas de onda.
- Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un biorreactor para transmitir vibraciones que estimulen los efectos mecanotransductores en un tejido biológico, comprendiendo el biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1: un accionador de la vibración; y una placa receptora de muestras acoplada de forma vibratoria al accionador de la vibración, en el que la placa receptora de muestras tiene una pluralidad de ubicaciones para montar muestras, y en el que la placa receptora de muestras está configurada para: proporcionar fijación física a un recipiente
- de muestras en cada una de la pluralidad de ubicaciones para montar muestras, y transmitir vibraciones verticales mecánicas que tienen una amplitud nanoescalar sustancialmente uniforme a través de la pluralidad de ubicaciones para montar muestras. Cuando está en uso, la placa receptora de muestras puede por tanto configurarse para recibir una pluralidad de recipientes de muestra, cada uno de los cuales puede tener una o una pluralidad de muestras de tejido biológico que reciben sustancialmente el mismo estímulo vibratorio. Por ejemplo, las muestras de tejido biológico pueden comprender citoblastos mesenguimales (MSC) que se hacen vibrar para inducir la osteogénesis aunque la
- invención no se limita a este uso concreto.

El biorreactor puede administrar vibraciones nanoescalares uniformes a muestras bidimensionales y tridimensionales.
Por ejemplo, cada muestra puede comprender una capa fina de MSC que forma monocapas óseas tras la estimulación usando el biorreactor de la invención. Como alternativa, cada muestra puede comprender un gel (por ejemplo, colágeno de tipo I o similar) que se ha sembrado con MSC a fin de aumentar la producción de hueso en una configuración tridimensional en el interior del gel.

El biorreactor puede comprender una matriz de accionadores de la vibración acoplados de forma vibratoria a la placa receptora de muestras de tal manera que la vibración es consistente a través de la placa receptora. La matriz puede comprender una pluralidad de módulos accionadores, teniendo cada módulo uno o más accionadores y siendo independientemente acoplables a la placa receptora de muestras. El accionador o cada accionador puede encajarse en la placa receptora de muestras de cualquier manera adecuada y en disposición espacial para transmitir energía vibratoria y minimizar la pérdida de vibración. Por ejemplo, la placa receptora de muestras puede montarse sobre (por

- 50 ejemplo, encima) de los accionadores de la matriz de vibración. El accionador o cada accionador de vibración puede adherirse a la placa receptora de muestras para eliminar cualquier juego entremedias. Sin embargo, la invención no se limita necesariamente a esta localización de los accionadores de la vibración en la matriz. El objetivo de los accionadores de la vibración es transmitir una vibración nanoescalar uniforme a la placa receptora de muestras. La localización y el número de accionadores de la vibración puede seleccionarse u optimizarse para este fin. Por ejemplo,
- 55 la separación entre accionadores de la vibración adyacentes puede minimizarse para asegurar una oscilación uniforme de la superficie superior de la placa receptora de muestras. La localización de los accionadores de la vibración puede ser por tanto independiente de las localizaciones de montaje de la muestra. En particular, no hay necesidad de que un accionador de la vibración esté situado en cada ubicación para montar muestras. La placa receptora de muestras oscila como resultado de la matriz de accionadores de vibración que actúan en combinación, y es esta acción
- 60 combinada la que se transmite a cada recipiente de muestra. Esta configuración difiere de una disposición en la que cada muestra tiene su propia fuente de vibración dedicada. Por ejemplo, con esta configuración, 13 accionadores de vibración pueden hacer vibrar igualmente dos placas de cultivo de 6 pocillos (que contienen 12 muestras) o tamaños de placa más grandes con 12, 24, 96, 384 y 1536 pocillos, lo que proporciona una ampliación del número potencial de muestras que se hacen vibrar consistentemente.
- 65

El accionador de vibración o la matriz de los accionadores de vibración está dispuesta para hacer oscilar la placa

receptora de muestras a amplitudes nanoescalares. En el presente documento, el término "nanoescala" puede utilizarse para indicar una magnitud de 100 nm o menos, preferentemente 30 nm o menos. La expresión "sustancialmente uniforme" se puede utilizar para indicar una variación de 20 % o menos, preferentemente 10 % o menos. Por ejemplo, la presente invención puede administrar una vibración que tiene una amplitud de 30 ± 3 nm a una pluralidad de muestras sobre la placa receptora de muestras.

La matriz de accionadores se puede ser impulsar por una señal común para oscilar a una única frecuencia. La frecuencia puede estar en el intervalo de 1 a 5000 Hz, preferentemente 500 a 1500 Hz. Una frecuencia de 1000 Hz puede ser particularmente preferida para inducir las osteogénesis en los citoblastos mesenquimales (MSC).

10

5

El biorreactor puede incluir un bloque base formado a partir de un material rígido tal como aluminio que puede proporcionar una base segura que resiste la influencia de efectos externos. El bloque base puede proporcionar una gran masa inercial bajo los accionadores para ayudar a dirigir la piezoexpansión lejos de la base, es decir, normal a la superficie superior de la placa receptora de muestras. La matriz de accionadores de vibración pueden montarse

- 15 sobre una superficie superior del bloque base, por lo cual, la placa receptora de muestras puede vibrar con respecto al bloque base. La matriz de accionadores puede disponerse para hacer oscilar la placa receptora de muestras en una dirección normal a la superficie superior del bloque base.
- Puede ser importante tener una fijación física continua entre los accionadores de la vibración y la muestra. Esto puede conseguirse asegurando el recipiente de muestras a la placa receptora de muestras, utilizando, por ejemplo, cualquier medio de unión adecuado, tal como retención, sujeción o adhesión. En una realización, la placa receptora de muestras se puede acoplar magnéticamente al recipiente de la muestra. El acoplamiento magnético puede proporcionar una fijación física continua de una manera eficaz. La placa receptora de muestras puede ser por tanto magnéticamente sensible y el recipiente de muestras puede ser magnético o viceversa. La placa receptora de muestras puede tener
- una construcción multicapa que comprende una capa inferior rígida (por ejemplo, de aluminio) y una capa superior magnéticamente sensible (por ejemplo, de acero inoxidable). El recipiente de muestras puede tener una superficie inferior magnética para encajar la placa receptora de muestras. El recipiente de muestras puede comprender una pluralidad de pocillos para recibir las muestras de tejido biológico, por lo cual, la pluralidad de pocillos está situada en la pluralidad de ubicaciones para montar muestras cuando el recipiente de muestras se monta sobre la placa receptora
- 30 de muestras.

La superficie inferior magnética puede unirse al resto del recipiente de muestra. Por ejemplo, la superficie inferior magnética puede comprender un disco magnético montado en la base de cada una de la pluralidad de pocillos. Estos imanes pueden fijarse usando una capa de adhesivo (por ejemplo, epoxi). El uso de una capa adhesiva de este modo

- 35 puede también aumentar la fijación física, ya que se pueden evitar posibles huecos de aire bajo del recipiente de muestras. Como alternativa, el material magnético puede formarse íntegramente con el recipiente de la muestra, por ejemplo, incorporarse durante el moldeo por inyección. Preferentemente, el material magnético es una matriz Halbach que tiene un campo magnético dirigido hacia el exterior de la muestra, para evitar la exposición de las células en la muestra a un campo magnético que puede alterar el propio proceso biológico.
- 40

Preferentemente, la parte inferior del recipiente de muestra es flexible para facilitar la formación de una capa ininterrumpida e incluso adhesiva. Cada accionador de la matriz de accionadores puede adherirse a la placa receptora de muestras de una manera similar.

- 45 El biorreactor puede incluir un generador dispuesto para suministrar una señal de impulso oscilante a cada accionador de la matriz de accionadores. Cada accionador comprende un elemento piezoeléctrico, por lo cual, la aplicación de la señal de impulso oscilante a través del elemento piezoeléctrico produce una deformación nanoescalar oscilante (es decir, periódica) del accionador.
- 50 Los accionadores pueden conectarse al generador en serie o en paralelo. El generador puede configurarse de manera diferente, depende de la configuración del cableado. Por ejemplo, si los accionadores se conectan en serie, el generador puede comprender una fuente de tensión y un oscilador. La fuente de tensión puede tener una tensión de salida ajustable para controlar la amplitud de la vibración de la matriz de accionadores, y el oscilador se puede ajustar para variar la frecuencia de la vibración. Como alternativa, si los accionadores se conectan en paralelo, el generador
- 55 puede comprender un amplificador de red. El amplificador de red puede tener un volumen amplificador ajustable para controlar la amplitud de la vibración de la matriz de accionadores. En la práctica, los accionadores conectados en paralelo pueden impulsarse mediante cualquier dispositivo amplificador adecuado dispuesto para suministrar una señal de impulsión oscilante.
- La estructura de la placa receptora de muestras y/o el recipiente de muestras puede determinarse usando una modelización por elementos finitos y/o experimentos interferométricos reales. En una realización derivada usando esta técnica, la placa receptora de muestras comprende una placa inferior con un espesor de 6 mm realizada de aluminio pegado (usando epoxi) en la totalidad de su superficie a una capa de acero inoxidable de 6 mm de espesor. Esta estructura puede proporcionar una combinación de rigidez frente a peso que evita los efectos de resonancia no
- 65 deseados y minimiza las variaciones en la amplitud de la vibración sobre la superficie, proporcionando también a la vez una superficie superior magnéticamente sensible.

Breve descripción de los dibujos

5	Los ejemplos de la invención se describirán ahora en detalle con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:
5	La Fig. 1 es una vista en sección transversal esquemática de un aparato de vibración que es una realización de la
	La Fig. 2 es una vista en planta de un diseño del accionador adecuado para su uso en el aparato de vibración de
10	La Fig. 3 es una vista en perspectiva esquemática del aparato de vibración de la Fig. 1; La Fig. 4A muestra un análisis modal de una placa de 6 pocillos simulada a la frecuencia de resonancia más baja; La Fig. 4B muestra un análisis de la respuesta armónica de la placa de 6 pocillos simulada a 1000 Hz (amplitud de
	30 nm); La Fig. 4C muestra un análisis modal de una configuración de placa superior preferida a una frecuencia de
15	resonancia más baja; La Fig. 4D muestra un análisis de la respuesta armónica de la configuración de la placa superior preferida a
	1000 Hz (amplitud de 30 nm); La Fig. 4E muestra una respuesta de frecuencia de una placa de 6 pocillos que muestra amplitudes máxima y
20	mínima; La Fig. 4F muestra una respuesta de frecuencia de una placa superior de material compuesto que muestra
	amplitudes máxima y mínima; La Fig. 5A es una vista en planta de un aparato de vibración de acuerdo con una realización de la invención durante
	la medición interferométrica; La Fig. 5B muestra los datos de calibración para un biorreactor cableado en serie (incluyendo una placa de 6
25	pocillos unida a un imán); La Fig. 5C muestra los datos de calibración para un biorreactor cableado en paralelo (incluyendo la placa de 6
	pocillos unida a imán); La Fig. 5D muestra los datos de medición interferométricos procedentes de la placa superior del biorreactor cuando
30	se cablea en paralelo; La Fig. 5E muestra una comparación de la respuesta de frecuencia para los piezoeléctricos cableados en paralelo (PW) antes de la unión de la placa superior y las placas de 6 pocillos unidas a la superficie de un biorreactor
	cableado tanto en paralelo como en serie (SW) que recibe un volumen amplificador de 70 y una tensión de 80 Varáz máx respectivamente:
35	Las Fig. 6A y 6B muestran los resultados de un cálculo de la aceleración máxima producida por el biorreactor cuando el volumen amplificador se ajusta a 70 sobre dos intervalos de frecuencias;
	Las Fig. 7A a 7D muestran los resultados del análisis de transcripción de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para la expresión génica del ARNm;
	Las Fig. 8A a 8D muestran los resultados de otro análisis de transcripción de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para la expresión génica del ARNm;
40	Las Fig. 8E a 8H son imágenes de salida tras inmunotinción de RUNX2 fosforilado en las muestras del control y estimuladas;
	La Fig. 8I es un gráfico que proporciona una representación cuantitativa de las intensidades de inmunotinción de pRUNX2 de las muestras del control y estimuladas;
45	La Fig. 9A es un gráfico que muestra los resultados de una evaluación reológica del gel de colágeno sin MSC; La Fig. 9B es un gráfico que muestra los resultados de una evaluación reológica del gel del colágeno sembrado
	con MSC; La Fig. 9C muestra una curva de tensión-deformación para las construcciones de gel de colágeno;
50	La Fig. 9D muestra la modelización de la deformación ANSYS de un pocilio de pollestineno modelado, replicando un pocilio de una placa de 6 pocillos cuando se hace vibrar a 1000 Hz con un desplazamiento de 20 nm;
50	La Fig. 9E muestra la deformación de un gel que se nace vibrar en el pocilio de pollestireno modelado de la Fig. 9D;
	La Fig. 9F muestra el estres de cizalladura de un gel que se hace vibrar en el pocilio de pollestireno modelado de la Fig. 9D;
55	La Fig. 9G es un gráfico que muestra la calibración interferometrica del gel para cinco frecuencias de vibración; La Fig. 9H es un gráfico que muestra las mediciones del desplazamiento nanométrico en el intervalo de 500 a 5000 Hz con una tensión establecida de 12 Vmáx-máx:
	Las Fig. 10A y 10B muestran los resultados de una evaluación osteogénica de nanotorsión sobre el gen del hueso y la expresión de la proteína
60	La Fig. 11A es una fotografía de tres geles de colágeno usados para demostrar la aplicabilidad de la invención a muestras tridimensionales:
	La Fig. 11B es un gráfico que muestra las mediciones de la intensidad de los geles de la Fig. 11A; La Fig. 11C muestra el espectro Raman del hueso:
	La Fig. 11D muestra el espectro Raman y el barrido µCT de una muestra del control sin estimular; y la Fig. 11E muestra el espectro Raman y el barrido µCT de una muestra estimulada.
GE	

65

Descripción detallada; opciones y preferencias adicionales

La siguiente descripción explica cómo se puede usar la modelización por elementos finitos para diseñar y optimizar la construcción de un biorreactor, que puede minimizar la incertidumbre de amplitud derivada de resonancias o deformaciones del sustrato. Estos factores son importantes cuando se utilizan amplitudes nanoescalares ya que la

- 5 amplitud de vibración consistente asegura que todas las células del biorreactor experimentan los mismos niveles de aceleración. Como las configuraciones anteriores han mostrado que la estimulación a 35 nm y 1000 Hz produce un fuerte efecto osteogénico, la realización de la invención descrita a continuación está destinada a abarcar esto dentro de su intervalo de trabajo [21]. Durante la construcción, se utilizó la interferometría láser para caracterizar la salida vibratoria desde el dispositivo en diversas etapas. Finalmente, el biorreactor se caracterizó biológicamente, lo que implica la evaluación genética/transcriptómica y proteómica de los MSC expuestos a estímulos nanovibratorios en
- términos de osteogénesis.

La siguiente descripción presenta en primer lugar el diseño, construcción y validación de un biorreactor que es una realización de la invención y que puede la osteogénesis en los MSC. Mediante el uso de la modelización por elementos finitos y la medición interferométrica, se divulga un diseño de biorreactor capaz de producir vibraciones nanoescalares hasta 4000 Hz. La realización se muestra capaz de proporcionar amplitudes vibratorias consistentes (hasta 190 nm a alta frecuencia) a través de una placa de 6 y 24 pocillos. Esto permite llevar a cabo experimentos biológicos de ajuste de parámetros para descubrir una condición osteogénica óptima para el biorreactor.

- 20 La discusión continúa para demostrar que la exposición de los MSC a la estimulación (amplitud de 22 nm a 1000 Hz) aumenta la expresión de los genes osteogénicos (osteocalcina, fosfatasa alcalina, osteonectina y el factor de transcripción osterix) tal como se mide por una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR). Además, se muestra que los datos de transcripción osteogénica reflejan de cerca un aumento en los genes clave (FAK, ERK1 y 2, MAP2K1 y 2) relacionados con la ruta MEK/MAPK, lo que ha demostrado ser una instigación fundamental de la
- 25 osteogénesis piezorrelacionada. La inmunotinción de los factores de transcripción RUNX2 osteogénicos relacionados, en su forma activa o fosforilada, demuestra también que este efecto se extiende posteriormente a las proteínas. La precisión de la estimulación aquí presentada permite el ajuste fino de la osteogénesis estimulada mecánicamente de una manera previamente inalcanzable.
- 30 La Fig. 1 muestra una vista en sección transversal esquemática a través de un biorreactor 100 que es una realización de la invención. El biorreactor 100 comprende un bloque base 102 rígido, por ejemplo, hecho de aluminio, que tiene una matriz de accionadores 104 vibratorios montados sobre la misma. En esta realización, hay treinta accionadores 104 distribuidos sobre una superficie superior 106 del bloque base 102 como se muestra en la Fig. 2. Cada accionador comprende un elemento piezoeléctrico, es decir, un componente que puede deformarse físicamente tras la aplicación
- de un campo eléctrico a través del mismo. Por ejemplo, los accionadores pueden ser piezoaccionadores PL088.30 de Physik Instrumente (Karlsruhe, Alemania), que tienen un perfil bajo y un área de unión relativamente grande (es decir, de 0,2 cm de altura con un área de unión de 1 cm²) para aumentar la unión adhesiva a las superficies superior e inferior minimizando a la vez el riesgo de desprendimiento debido a fuerzas de cizalladura. Cada accionador 104 está fijado al bloque base 102 para que el movimiento vibratorio del accionador se produzca en relación con el bloque base en una dirección normal a la superficie superior 106 del mismo. Cada accionador puede fijarse mediante un adhesivo
- 40 una dirección normal a la superficie superior 106 del mismo. Cada accionador puede fijarse mediante un adhesivo adecuado, por ejemplo, epoxi (no se muestra).

Una placa superior 108 se monta por encima (sobre) la matriz de accionadores. La placa superior es un cuerpo rígido, y puede fabricarse del mismo material que el bloque base, por ejemplo, aluminio. La placa superior se fija a la matriz
de accionadores 104 para que el movimiento vibratorio de los accionadores se transfiera al movimiento de la placa superior. La placa superior se puede fijar a uno o más o todos los accionadores utilizando un adhesivo adecuado (por ejemplo, epoxi).

- La placa superior se dimensiona para evitar la creación de regiones de resonancia cuando los accionadores están vibrando. En esta realización, la placa superior es una estructura multicapa que comprende una capa inferior 110 de 6 mm de espesor de aluminio unida mediante una capa intermedia 112 de epoxi a una capa superior 114 de 6 mm de espesor de acero inoxidable magnéticamente sensible (por ejemplo, acero inoxidable de calidad 420). La capa inferior 110 se fija (es decir, se une) a la matriz de accionadores 104. El uso de dos materiales en la placa superior 108 permite conseguir la minimización del peso (que tiene un efecto sobre la piezomecánica) minimizando a la vez la deformación
- 55 en la nanoescala y permitiendo la unión magnética, como se analiza a continuación.

La capa superior 114 presenta una superficie superior 116 del dispositivo, que actúa como una plataforma para recibir una o más placas 118, cada una de las cuales contiene una pluralidad de pocillos para el mantenimiento de muestras que se van a hacer vibrar. En esta realización, la superficie superior 116 está dimensionada para permitir la unión de

- dos placas 118 de 6 pocillos, teniendo cada una dimensiones de 130 x 178 mm. Es importante que las placas 118 estén en íntimo contacto con la superficie superior para que las vibraciones se hagan pasar de una manera uniforme. En esta realización, las placas 118 se unen magnéticamente a la superficie superior 118. En este ejemplo, la unión magnética se consigue proporcionando una pluralidad de imanes 120 de ferrita, cada uno de los cuales está unido a la base de un pocillo 122 respectivo en una de las placas 118 mediante una capa 124 de adhesivo. La base de cada
- 65 pocillo y/o la base de cada recipiente de muestras recibido en cada pocillo puede ser flexible para facilitar el contacto físico continuo entre el imán y la superficie superior de la placa receptora de muestras. En este caso, es posible que

la capa 124 de adhesivo no sea necesaria. Existen por tanto veinte imanes en este ejemplo. Preferentemente, se proporciona un único imán bajo cada pocillo o bajo cada placa de pocillos. Los imanes pueden ser oblongos (para corresponder con la forma de la placa de pocillos) o en forma de disco (para corresponder la forma de un pocillo). Por ejemplo, cada imán puede ser un disco que tiene un diámetro de 30 mm y un espesor de 3 mm tal como los fabricados

- 5 por Magnet Expert (Tuxford, Reino Unido). El flujo magnético citado en la superficie de estos imanes es de 700 gauss (0,07 T), que, como campo magnético estático, no se considera lo suficientemente alto para alterar la función celular [42]. Sin embargo, estos imanes, que son matrices Halbach, son solo magnéticos por la cara orientada hacia el biorreactor y en la dirección que se aleja del cultivo celular, por lo tanto, cualquier campo magnético residual será mucho más pequeño.
- 10

Los imanes 120 sirven a tres fines. En primer lugar aseguran una transferencia adecuada de amplitud de la vibración a las placas de 6 pocillos. En segundo lugar, permiten una transferencia consistente de la amplitud de vibración a cada pocillo de la placa. En tercer lugar permiten una retirada fácil de la placa al final del tratamiento.

- 15 El uso de adhesivo (por ejemplo, epoxi) para unir la placa 118 de 6 pocillos a sus imanes 120 asegura que cada pocillo está en total contacto físico con la superficie del biorreactor. El adhesivo puede rellenar cualquier hueco de aire que de otra forma pudiera producirse debido a variaciones en la fabricación entre placas individuales.
- El bloque base 102 tiene un puerto conector 126 sobre una superficie lateral del mismo para recibir una señal de estimulación a transportar a cada accionador 104. Como se describe posteriormente, la señal de estimulación se proporciona desde un generador que tiene una configuración diferente dependiendo de si los accionadores están conectados en serie o en paralelo. Cuando los accionadores están conectados en serie, el generador comprende un motor de alta tensión (por ejemplo, Modelo ENV 150, Piezosystemjena, Jena, Alemania), que puede proporcionar 160 V_{máx-máx}. En este caso, el generador incluye un oscilador dispuesto para modular la salida del motor de alta tensión,
- 25 por ejemplo, como una onda sinusoidal. El oscilador puede ser un generador de señales tal como el Modelo 33210A, de Agilent (Santa Clara, CA). Si los accionadores están cableados en paralelo, el generador puede comprender un amplificador de red (Sneaky DS, Linn Products, Glasgow, Reino Unido) para proporcionar una salida de alta potencia. La forma de onda de la señal en este caso se puede proporcionar con un ordenador trabajando en red que tenga instalado el software Linn Kinsky. Por ejemplo, los archivos FLAC de la forma de onda producidos en Audacity 2.0.5
- 30 pueden enviarse a través del amplificador de red. El volumen de salida del amplificador se controla mediante Kinsky en una escala de 0-100 que se utilizó para calibrar la amplitud durante la interferometría como se describe a continuación.
- La Fig. 2 muestra una vista en planta de la superficie superior 106 del bloque base 102 que muestra cómo los accionadores 104 se distribuyen en esta realización. Los accionadores se distribuyen uniformemente sobre la superficie superior 106. La distribución puede observarse como una serie de bloques oblongos anidados. En este ejemplo, los bloques oblongos anidados comprenden un primer conjunto de ocho accionadores alrededor del borde de la superficie superior, un segundo conjunto de cuatro accionadores comprendidos en el primer conjunto, y un conjunto final que comprende un único accionador en la mitad de la superficie superior. El número de bloques oblongos anidados y el número de accionadores de cada bloque oblongo puede seleccionarse según la geometría de la
- 40 anidados y el numero de accionadores de cada bloque oblongo puede seleccionarse segun la georr superficie superior, por ejemplo, junto con la modelización descrita a continuación.
- La Fig. 2 muestra también como la señal de tensión procedente del puerto conector 126 se suministra a los accionadores 104. Un rebaje 128 está mecanizado en la superficie superior en una localización sin un accionador. Un primer conjunto de conexiones cableadas 130 se extiende desde el rebaje 128 hasta un grupo de accionadores localizados más cerca del puerto conector 126. Un canal 132 rebajado transporta un cable 134 desde el rebaje 128 adicionalmente a través de la superficie superior, desde donde se extiende un segundo conjunto de conexiones cableadas 132 rebajado hasta el resto de accionadores situados más allá del puerto conector 126.
- 50

El espesor de las capas epoxi y los accionadores está exagerado en la Fig. 1 con fines explicativos. La Fig. 3 muestra una vista en perspectiva del biorreactor antes de que se monten las placas 118 en el mismo que muestra las dimensiones relativas con más precisión.

- 55 Una ventaja adicional del biorreactor descrito anteriormente es que su geometría permite un fácil mantenimiento de un ambiente estéril para cultivos biológicos prolongados, ya que el biorreactor completo y/o las placas de 6 pocillos son suficientemente pequeños para introducirse en una campana extractora de flujo laminar para adición de medio, alimentación de las células (crecimiento de tejido esquelético) o realización de experimentos en un ambiente esterilizado controlado.
- 60

Además de las resonancias estructurales del biorreactor, los piezoaccionadores tienen una frecuencia de resonancia asociada con los mismos (f_0). Para una carga másica dada (*M*) la frecuencia de resonancia real (f'_0) varía según la Ecuación (1) [37]:

 $f_0' = f_0 \sqrt{\frac{m/3}{m/3+M}}$

(1)

donde m es la masa del accionador. La frecuencia de esta resonancia es importante ya que la amplitud de la vibración aumenta a esta frecuencia. Por ejemplo, suponiendo una carga (M) de 189 g por accionador y una masa del accionador (m) de 0,2 g, la ecuación (1) proporciona una resonancia estimada de 31,4 kHz que está más allá de los límites de los amplificadores utilizados.

Las Fig. 4A a 4F muestran algunos resultados de la modelización por elementos finitos utilizada para determinar las frecuencias de resonancia (utilizando análisis modal) y la deformación (utilizando análisis de la respuesta armónica) de los componentes debidas a la vibración. Se usó el software de simulación ANSYS para llevar a cabo la modelización.

10

5

La Fig. 4A muestra un análisis modal de una placa de 6 pocillos modelada, que muestra que produce un valor de resonancia menor de 3267 Hz. Aunque se produce una resonancia a esta frecuencia, la forma del modo no deforma la base de los seis pocillos de forma que no afectaría la intensidad de la estimulación sobre el área de crecimiento. La Fig. 4B muestra un análisis de la respuesta armónica que confirma que la unión magnética a través de los seis pocillos

- 15 debe mantener la precisión de la amplitud a través de las superficies de crecimiento. La Fig. 4E demuestra que se puede mantener la precisión de la amplitud dentro de los 3.3 nm (11 %) para frecuencias de hasta 3600 Hz.
- Las Fig. 4C y 4D muestran los resultados de la modelización realizada para determinar los materiales deseados y el 20 espesor de la placa superior del biorreactor. Se modelaron algunas combinaciones de materiales con la resonancia más baja indicada en cada caso mediante análisis modal. El análisis de la respuesta armónica realizado a 1000 Hz con una amplitud de 30 nm proporcionó un valor para la diseminación de amplitudes a través de la placa superior debido a la deformación. La Tabla 1 muestra los resultados de esta modelización para diversas construcciones de la placa superior.
- 25
- Tabla 1: Recopilación de datos producidos a partir del análisis de la respuesta modal y armónica en ANSYS. Para cada configuración de la placa superior se obtuvo un valor de la resonancia junto con la diseminación de las amplitudes cuando se hace vibrar a 1000 Hz con una amplitud de 30 nm.

Capa 1	Capa 2	Capa 3	N.º de accionadores	1ª Resonancia [Hz]	Intervalo de amplitud [nm]
6 mm de Al	0,6 mm de St. Acero		5	1953,7	57
6 mm de Al	6 mm de Al	0,6 mm de Acero inox.	5	2879,7	40
6 mm de Al	0,6 mm de Acero inox.		13	6637,8	7
6 mm de Al	6 mm de Acero inox.		13	5270,8	5
6 mm de SiC	0,6 mm de Acero inox.		13	9149,9	2

- 30 Una composición preferida de la placa superior comprende una capa inferior de aluminio con un espesor de 6 mm y una capa superior de acero inoxidable magnéticamente sensible con un espesor de 6 mm unida a la capa inferior con una capa de epoxi con un espesor de 0,1 mm. Estos parámetros proporcionan rigidez para minimizar la deformación a una escala nanométrica y maximizar las frecuencias de resonancia manteniendo a la vez la carga sobre los accionadores en un mínimo. El análisis modal produjo un valor de resonancia más bajo para esta selección de materiales de 5270,8 Hz. 35
 - Se pueden usar otros materiales para proporcionar el mismo o similares beneficios. Por ejemplo, una de las estructuras modeladas tenía una capa inferior realizada de SIC en lugar de aluminio. Esta estructura proporcionó un leve beneficio en términos de consistencia de amplitud sobre el aluminio.
- 40

50

Se varió también el número de puntos de unión de accionadores en el modelo simulado ya que los ensayos iniciales habían mostrado una vibración reducida de la placa superior si el espacio entre los accionadores era demasiado grande. La Fig. 4F muestra la variación de la amplitud con la frecuencia para la configuración de treinta accionadores que se muestra en la Fig. 2. Esta configuración produjo una consistencia de la amplitud de 5 nm (17 %) basada en una vibración de 30 nm a 1000 Hz.

45

El cableado del accionador es también un factor importante que puede afectar a los requisitos del amplificador para la piezomatriz. La red de treinta accionadores que se muestra en la Fig. 2 está conectada mediante un cableado en paralelo (PW). Sin embargo, es también posible conectarla usando un cableado en serie (SW). La elección de la conexión altera la capacitancia eficaz de la red. La corriente máxima IMax, necesaria a una frecuencia de vibración f

puede estimarse mediante la Ecuación (2).

$$I_{Máx.} \approx f \pi C_{Total} U_{máx.-máx.}$$

(2)

La capacitancia eficaz C_{Total} de la matriz de treinta accionadores se calculó de forma diferente dependiendo de la selección del cableado con valores de 85 y 14.300 nF para SW y PW respectivamente. Por consiguiente, la tensión entre máximos $U_{máx.-máx.}$ necesaria para producir una amplitud de vibración deseada depende de la configuración del cableado. Según la tensión nominal citada de los accionadores piezoeléctricos seleccionados usados en la realización descrita anteriormente, la tensión total necesaria para producir amplitudes de vibración de 30 nm sería de 35 y 2,7

Para una amplitud de 30 nm a 5000 Hz se proporciona una corriente máxima y unos requisitos de tensión de 47 mA y
 35 V_{máx-máx} respectivamente cuando se conecta mediante SW. Para PW los mismos requisitos son 606 mA y 2,7 V_{máx-máx} Estos requisitos son tales que se requieren diferentes métodos de amplificación dependiendo de la configuración del cableado utilizada.

V_{máx-máx}, para SW y PW respectivamente suponiendo que no hay pérdidas de amplitud debida a la unión epoxi.

Se utilizaron un amplificador de alta tensión y un amplificador de red de alta potencia para ensayar las configuraciones
 SW y PW respectivamente. Se ha descubierto que tanto la consistencia en la amplitud como la amplitud máxima eran mayores con la configuración PW como se muestra en las mediciones interferométricas descritas a continuación.

La Fig. 5 presenta los resultados de las mediciones de interferometría láser usadas para proporcionar datos confirmatorios para la modelización por elementos finitos. La medición de las amplitudes del accionador sin una placa superior unida proporciona una amplitud promedio para la configuración SW de 24,7 nm con una precisión de 8,3 % entre accionadores (1000 Hz, 80 V_{máx-máx}). Por el contrario, la configuración PW produjo una amplitud de 207,4 nm con una precisión del 9,5 % para los accionadores (1000 Hz, volumen del amplificador - 100). Se encontró que niveles de precisión mayores (7,5 %) tenían un volumen del amplificador menor (60). Se realizaron mediciones similares tras la unión de la placa superior. Ambas configuraciones de cableado presentaron una amplitud de vibración reducida
 cuando la placa superior estaba en su lugar, pero la amplitud de la configuración PW fue todavía mucho mayor que la amplitud producida con la configuración SW.

- La Fig. 5A muestra una vista en planta de la configuración experimental, en la que se montaron 25 fragmentos de sílice en una matriz regular sobre la placa superior para proporcionar una superficie para la reflexión del interferómetro
 láser en ausencia de una placa de 6 pocillos. Cuando está presente una placa de 6 pocillos, se proporciona un fragmento de sílice en la base de cada pocillo. La medición de la amplitud de las placas superiores proporciona un movimiento de 28,2 y 34,6 nm con una consistencia de la amplitud de 11,2 % y 9,3 % a través de 25 puntos de medición utilizando la configuración SW y la configuración PW respectivamente.
- 35 La Fig. 5E muestra una comparación entre los diseños de cableado. Las mediciones de configuración PW se tomaron en un volumen de amplificador de 70. Las barras de error en la Fig. 5E significan la desviación estándar. La Fig. 5D muestra datos adicionales recogidos en esta etapa que relacionan las amplitudes de salida con el volumen del amplificador. La calibración de la superficie superior se llevó a cabo a 1000 Hz.
- 40 Cuando las placas de 6 pocillos se unieron a la placa superior, la medición indicó una reducción adicional en la amplitud, que se esperaba porque se había añadido otra capa entre los accionadores y el punto de medición. Sin embargo, se mostró que la consistencia de la amplitud a través de múltiples pocillos era consistente con una precisión de 21,2 % y 8 % para SW y PW respectivamente en el intervalo de 0-3000 Hz. Como se muestra en la Fig. 5E, a 4-5 kHz la precisión de la vibración disminuye y la amplitud promedio parece aumentar hacia una resonancia.
- Una vez que se estableció la consistencia de la amplitud a través de la base de los pocillos, que proporcionan una superficie de crecimiento del biorreactor, se recogieron los datos de calibración para la tensión de entrada (para la configuración SW) o el volumen de entrada (para la configuración PW). La Fig. 5B muestra los datos de calibración de la tensión de entrada. Se omiten de este gráfico las frecuencias de 4 y 5 kHz ya que su magnitud es mucho mayor que
- 50 el intervalo presentado. La Fig. 5C muestra los datos de calibración del volumen de entrada. Estos datos pueden utilizarse para proporcionar la base a partir de la cual seleccionar la amplitud de la vibración para los estudios celulares posteriores.
- La medición se tomó también utilizando placas de 24 pocillos para determinar si su uso conseguiría el mismo nivel de consistencia de la vibración. Las placas, que se unieron de nuevo con 6 imanes, se midieron en los cuatro pocillos de las esquinas y los cuatro pocillos centrales sobre dos placas mientras se hacían vibrar en el biorreactor SW con 80 V_{máx-máx} (Tabla 2). Con la excepción de 4000 Hz, se descubrió que cada amplitud de vibración era más grande en las esquinas reduciendo la precisión global y la reproducibilidad de los resultados. Estos riesgos pueden evitarse mejorando la relación espacial entre los imanes y los pocillos, utilizando, por ejemplo, 24 imanes pequeños (uno por pocillo) o 6 imanes cuadrados (uno por placa de pocillos).
- 65

5

Frecuencia [Hz]	Promedio [nm]	σ [nm]	σ%]	Esquinas [nm]	σ [nm]	Centro [nm]	σ [nm]
1000	18,1	13,4	74,3	20,0	18,4	16,2	6,2
2000	12,2	8,5	69,5	17,6	8,6	6,7	3,3
3000	11,9	9,1	76,4	13,4	10,2	10,4	8,3
4000	13,2	12,4	94,2	9,7	9,9	16,6	14,3

Tabla 2: Datos de interferometría de placas de 24 pocillos. Se muestra el promedio de 16 pocillos (2 placas) junto con el promedio sobre 8 esquinas y 8 pocillos centrales. Las desviaciones estándar σ se muestran en nanómetros y como un porcentaje de las amplitudes medidas.

- 10 mediciones en 90 y 55 % para SW y PW, respectivamente. Otro hallazgo es el punto donde la meseta de la amplitud está usualmente acompañada por armónicos de la frecuencia de estimulación que aparecen en el espectro de frecuencia.
- Con valores precisos medidos para la amplitud de la vibración en cada frecuencia y de la tensión/volumen de entrada
 es posible proporcionar valores de aceleración y fuerza implicadas en la estimulación. Una vibración sinusoidal permite el cálculo directo de la aceleración máxima mediante la Ecuación (3) usando la amplitud A₀ y la frecuencia *f* [35].

Aceleración_{máxima} =
$$A_0(2\pi f)^2$$

(3)

- 20 Utilizando la segunda Ley de Newton y calculando la masa del medio directamente encima de una célula (área de la superficie celular multiplicada por la altura del medio y por la densidad del medio) es también posible estimar la fuerza ejercida durante la aceleración máxima por las células individuales.
- Los datos interferométricos muestran que la precisión de la amplitud del biorreactor se puede usar para demostrar el amplio intervalo de aceleración que se puede producir por el biorreactor. Este intervalo se muestra para las frecuencias 0-500 Hz en la Fig. 6A y para las frecuencias de 500-5000 Hz en la Fig. 6B basándose en una configuración PW del biorreactor alimentado por un volumen de amplificador de 70. Las barras de errores representan la desviación estándar de las mediciones interferométricas.
- 30 La siguiente sección describe experimentos que demuestran la capacidad del biorreactor descrito anteriormente para estimular la osteogénesis. Usando una técnica qRT-PCR, el ARNm de los controles sin estimular se usó para evaluar la prevalencia de un aumento en los genes relacionados con la osteogénesis mediante la vibración de las muestras usando el biorreactor. A fin de mantener la consistencia a lo largo del experimento y reducir la variabilidad, los controles se cultivaron también con imanes por debajo de las placas, pero no se estimularon por la vibración nanoescalar. Se observo que los cuatro genes evaluados (osterix, fosfatasa alcalina, osteogenicina y osteoperina) un mostraron un
- 35 observo que los cuatro genes evaluados (osterix, fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteonectina) mostraron un aumento en comparación con el control, codificando el gen ALPL la fosfatasa alcalina y codificando el gen BGLAP la osteocalcina que muestran una significancia relativa respecto a los controles.
- La Fig. 7 muestra los resultados tras la estimulación de los MSC sobre el biorreactor vibratorio descrito anteriormente durante 8 días. La Fig. 7A muestra los resultados de la vibración de los MSC a una frecuencia de 1000 Hz en una placa de 6 pocillos. La Fig. 7B muestra los resultados de la vibración de los MSC a 1000 Hz en una placa de 24 pocillos. La Fig. 7C muestra los resultados de la vibración de los MSC a 4000 Hz en una placa de 6 pocillos. La Fig. 7B muestra los resultados de la vibración de los MSC a 4000 Hz en una placa de 6 pocillos. La Fig. 7B muestra los resultados de la vibración de los MSC a 4000 Hz en una placa de 24 pocillos. La posterior expresión génica de osterix, fosfatasa alcalina, osteocalcina y la osteonectina se evaluaron con respecto a un control sin
- 45 estimular. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una amplitud de 5 V con un desplazamiento vertical de 22 nm. Los resultados se obtuvieron usando un test de la t emparejado, y muestran el promedio de tres mediciones, con la desviación estándar indicada por barras de errores. La desviación estándar de los resultados marcado * fue < 0,05 y para los resultados marcados ** fue de < 0,01.</p>
- Las Fig. 7A y 7D, es decir, una vibración de 1000 Hz con una placa de 6 pocillos y una vibración de 4000 Hz con una placa de 24 pocillos, respectivamente, proporcionan objetivamente los mejores resultados. Sin embargo, La Fig. 7A parece ser la más en línea con la regulación en exceso de los genes relacionados con MEK/MAPK (véase la Fig. 8A) y por tanto, proporciona probablemente el resultado biológico más reproducible. La osteocalcina es secretada únicamente por los osteoblastos, lo que respalda la prevalencia de la diferenciación de los citoblastos usando este
- 55 biorreactor vibratorio. Por el contrario, los MSC cultivados en una placa de 24 pocillos con una vibración de 1000 Hz, no mostraron casi regulación en exceso de los mismos genes osteogénicos y 4000 Hz con la placa de 6 pocillos

proporcionaron una estimulación menos consistente de estos genes.

Fue notable entender hasta cierto punto, cómo o por qué se produciría el mecanismo de la osteogénesis usando las vibraciones nanoescalares proporcionadas por el biorreactor. Aunque existen sin duda otras rutas, se cree que

- 5 MEK/MAPK es crítica. La Fig. 8 muestra los resultados tras la estimulación de los MSC en el biorreactor vibratorio durante 8 días. Los MSC estimulados se evaluaron con respecto a un control sin estimular para la expresión de los genes relacionada con la ruta MAPK/ERK, que se considera fundamental para la osteoblastogénesis mecanotransductora iniciada provocada por la vibración, es decir, PTK2 (que codifica FAK), ERK 1 y 2, MAP2K1 y MAP2K2. La Fig. 8A muestra los resultados de la vibración de los MSC a una frecuencia de 1000 Hz en una placa de
- 10 6 pocillos. La Fig. 8B muestra los resultados de la vibración de los MSC a 1000 Hz en una placa de 24 pocillos. La Fig. 8C muestra los resultados de la vibración de los MSC a 4000 Hz en una placa de 6 pocillos. La Fig. 8D muestra los resultados de la vibración de los MSC a 4000 Hz en una placa de 24 pocillos. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una amplitud de 5 V con un desplazamiento vertical de 22 nm. Los resultados se obtuvieron usando un test de la temparejado, y muestran el promedio de tres mediciones, con la desviación estándar indicada por barras de errores. 15
- La desviación estándar para los resultados marcados * fue < 0,05.

Después de 8 días de vibración a 1000 Hz y 4000 Hz con células sembradas en una placa de 6 y 24 pocillos, se usó la gRT-PCR para determinar los niveles del gen PTK2 que codifica la guinasa de adhesión focal (FAK) con respecto al control sin estimular y mediante mecanotransducción se descubrió que estos aumentaban. Tras la cascada

- mecanística, otros genes a lo largo de la ruta MEK/MAPK, incluyendo las quinasas reguladas por la señal extracelular 20 (ERK 1 y 2), mostraron una expresión elevada. Las actividades de las ERK están vinculadas a las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), y posteriormente, se observó también que MAP2K1 y MAP2K2 estaban reguladas en exceso, mostrando MAP2K1 un aumento significativo (véase la Fig. 8A).
- 25 El efector de esta cascada mecanística, es decir, la forma de la proteína activada del factor de transcripción osteogénico fosforilado RUNX2, se evaluó mediante inmunotinción. La Fig. 8E y 8G muestra imágenes de inmunotinción de RUNX2 fosforilado para los controles T1 y T2. Estas imágenes representan niveles sin estimular o basales de expresión proteómica de RUNX2 fosforilado. Las Fig. 8F y 8H muestran imágenes de inmunotinción de RUNX2 fosforilado para las muestras T1 y T2 tras la estimulación a 1000 Hz en una placa de 6 pocillos. Ambas
- 30 muestras muestran un aumento en la expresión de RUNX2 fosforilado producida por estimulación usando el biorreactor de la invención. El aumento mayor se produce en o cerca de los núcleos de los MSC [38, 39]. La Fig. 6l es una representación cuantitativa de las intensidades de inmunotinción de pRUNX2 para una muestra a la que se ha hecho vibrar a 1000 Hz durante 3 días en una placa de 6 pocillos con respecto al control sin estimulación.
- 35 Como era el caso anterior con los genes relacionados con la osteogénesis, los resultados de la Fig. 8A muestran que la condición óptima de los experimentos de configuración de parámetros para la expresión aumentada de la transcriptómica MEK/MAPK fue a partir de los MSC estimulados en una placa de 6 pocillos a una frecuencia de 1000 Hz.
- 40 El aparato de la invención descrito en el presente documento tiene la capacidad de estimular en la nanoescala en tres dimensiones, una técnica que hasta ahora era desconocida y desafiante. Para demostrar la eficacia del aparato de la invención de esta manera, se usó un armazón en 3D biocompatible que por sí mismo no inicia la osteogénesis: colágeno de tipo I. El gel se dispuso para presentar una rigidez baja, ya que los geles de rigidez alta pueden conferir propiedades osteoinductoras. Por ejemplo, una matriz ósea precalcificada que tiene una rigidez de ~40 kPa ha 45 mostrado ser osteoinductora con respecto a los MSC [43, 44].

Las Fig. 9A y 9B son gráficos que muestran el módulo de cizalladura de los geles utilizados en la siguiente descripción sin y con los MSC respectivamente. La Fig. 9A muestra los resultados de una evaluación reológica del gel de colágeno sin MSC. La comparación de los valores de los módulos de cizalladura complejos muestran que se ha formado un gel blando más bien que un estado líquido (es decir, G' > G"). La Fig. 9B muestra datos similares para la construcción de un gel de colágeno que contiene 40.000 osteoblastos MG63/ml (100.000 MSC para una muestra de 2,5 ml). La Tabla

- 50 3 siguiente muestra propiedades de los geles obtenidas de los valores para los módulos de cizalladura tomados a partir de la medición reológica.
- 55

Tabla 3: Propiedades del material de los geles de colágeno, con v sin células

	Módulos de cizalladura, G (Pa)	Módulos elásticos, E (Pa)	Módulos de volumen, K (MPa)	Relación de Poisson, <i>v</i>
Colágeno (sin células)	36 ± 7,4	108 ± 22,2	1800 ± 370	0,499
Colágeno con células	24,5 ± 2,3	73,5 ± 6,3	1225 ± 105	0,499

Los datos en las Figs. 9A y 9B muestran que los geles usados tenían módulos de Young de 108 Pa sin células y 73,5 Pa con células.

Se llevó a cabo el análisis de la respuesta armónica suponiendo que el gel estaba comprendido en un intervalo elástico lineal e incompresible (Relación de Poisson v = 0,5). Para los geles de colágeno bajo deformación, la relación de Poisson describe la relación absoluta entre deformación transversal y longitudinal. Para permitir el análisis, se

- 5 seleccionó una relación de Poisson, v, menos de 0,5. Se ensayaron diversos valores para v para su replicación del resultado interferométrico con un aumento asintótico hacia 0,5 que aumenta la precisión de la simulación (es decir, la capacidad para transmitir una amplitud e vibración completa de 20 nm). El valor utilizado dio como resultado un módulo de volumen de la misma magnitud que el agua. El módulo de volumen describe una resistencia del material a una compresión uniforme y que el módulo de volumen tienda a ser alto en agua parece adecuado cuando se considera el 10
- contenido de agua del colágeno.

En este ejemplo, las placas receptoras de muestras para el gel se modelaron como recipientes de poliestireno cilíndricos. La Fig. 9D muestra la modelización del recipiente solo cuando se hace vibrar a 1000 Hz con un desplazamiento de 20 nm. Existe una deformación mínima. La Fig. 9E muestra la modelización de 2,5 ml de gel en el recipiente cuando se hace vibrar a 1000 Hz con un desplazamiento de 20 nm. Aquí, la modelización predice una amplitud promedio de 29 nm en el borde del menisco y de 18 nm en el centro del gel.

Utilizando los mismos parámetros de modelización, La Fig. 9F muestra el estrés de cizalladura y la deformación en el interior del gel que produjeron los valores máximos de 3,8 mPa y 1,1 × 10⁻⁴ m/m respectivamente a 1000 Hz. Estos valores se encuentran por debajo del límite proporcional del estrés de cizalladura y la deformación que se observaron 20 a través de la medición reológica, como se muestra en la Fig. 9C. Esto respalda la validez de un análisis lineal para modelar la nanovibración a esta frecuencia y sugiere que la nanotorsión produce deformaciones comprendidas en el intervalo elástico lineal del material. Por lo tanto, se predijo que las propiedades viscoelásticas del gel de colágeno

permitían transferir las vibraciones de alta frecuencia a las células sembradas en 3D.

25

15

Se usó de nuevo la interferometría para confirmar las predicciones. El biorreactor se configuró con una placa de 6 pocillos y con células (40.000 células MG63 /ml) sembradas en 2,5 ml de geles de colágeno. Las mediciones se llevaron a cabo en el centro y en el borde externo de los geles. La Fig. 9G muestra una calibración de la amplitud para las frecuencias examinadas, en las que la vibración del gel aumenta linealmente con la tensión de entrada en el biorreactor.

30

La Fig. 9H muestra el comportamiento del gel en términos de frecuencia. Se descubrió que la superficie superior del gel sigue la superficie de la placa de 6 pocillos consistentemente, sin mostrar amortiguación de la vibración hasta 2000 Hz. Las muestras que contenían las células no se desviaron en su respuesta de las de los geles sin células. Comprendido en este intervalo parece existir una amplitud aumentada en el borde del gel en la curvatura del menisco reflejando por tanto los datos previstos. La amplitud de la vibración observada en el borde del gel fue de 35 nm en comparación 24 nm en el centro para 1000 Hz (véase el recuadro en la Fig. 9H).

- Se observaron frecuencias de resonancia en la región de los 2500 Hz, 3500 Hz y 5000 Hz y se observaron en placas 40 de 6 pocillos vacías y rellenas de gel. Esto se observó como un aumento en la amplitud de la vibración en el borde externo de cada pocillo cuando se comparó con el centro junto con una disminución en la precisión de la medición. Se señala que si el relleno del gel se dobla hasta 5 ml, estos datos indican que aunque los geles actúan de forma similar en términos de entrada de tensión diferente, cuando se produce la resonancia y el medio/borde cambia, se observa un efecto de amortiguación de la amplitud.
- 45

50

35

Los resultados indican que los MSC comprendidos en los geles de ~100 Pa pueden recibir desplazamientos nanoescalares reproducibles predecibles. Este entorno es sin embargo drásticamente diferente al plástico duro del cultivo celular (tal como el que se usó para generar los resultados de las Figs. 7 y 8) o los geles mucho más rígidos (por ejemplo, 40 kPa) que se han usado para estimular la osteogénesis [43, 44]. Basándose en esto, la invención puede transmitir estimulación mecánica a una matriz blanda para iniciar la formación del hueso a partir de los MSC en

un entorno de otra manera no inductivo.

Para ensavar esto para los MSC en los geles de -100 Pa, se llevaron a cabo una gama de ensavos de transcripción de proteínas y mineralización. Las Fig. 10A y 10B muestran los resultados de una evaluación osteogénica de 55 nanotorsión sobre el gen del hueso y la expresión de proteínas que revelan un aumento en los transcritos de osteopontina (OPN). Para la Fig. 10A, los MSC se nanotorsionaron a 1000 Hz durante un periodo de 21 días en una matriz de colágeno. Se evaluó el ARNm (OPN) de la osteopontina frente a controles sin estimular usando la qPCR. En este ejemplo, el nivel de siembra fue de 40.000 MSC/ml de gel. Los resultados se obtuvieron usando un test de la t emparejado, y muestran el promedio de tres mediciones, con la desviación estándar indicada por barras de errores.

- La desviación estándar para los resultados marcados * fue < 0,05. Para la Fig. 10B, los MSC se expusieron a 60 nanotorsión a 1000 Hz durante 17 días frente a controles sin estimular para la expresión cuantitativa de la proteína osteocalcina (OCN) utilizando un ensayo Western en células que muestra un aumento significativo por nanotorsión. En este ejemplo, el nivel de siembra fue también de 40.000 MSC/ml de gel. Los resultados se obtuvieron usando un test de la temparejado, y muestran el promedio de seis mediciones, con la desviación estándar indicada por barras
- de errores. La desviación estándar para el resultado marcado *** fue < 0,001. 65

Las Fig. 11A a 11E ilustran otro ejemplo en el que el biorreactor administra vibraciones a una muestra tridimensional. La Fig. 11A muestra una fotografía de tres muestras, cada una de las cuales comprende un gel (por ejemplo, un colágeno de tipo I) que se ha sembrado con 40000 MSC/ml del gel. Las muestras comprenden 2,5 ml del gel montado en un pocillo respectivo del biorreactor y se tiñeron con la coloración de von Kossa para mostrar la presencia de fosfato.

Una muestra 900 del control no se estimuló (se hizo vibrar) por el biorreactor. Una muestra 900 de ensayo se hizo vibrar a 1000 Hz durante 35 días. Una muestra comparativa (que también se estimuló por el biorreactor de una manera similar a la muestra de ensayo) incluyó un medio inductor de osteoblastos (es decir, un alimento del cultivo celular que incluye factores que inducen la diferenciación de los MSC en osteoblastos, tales como dexametasona y ácido ascórbico) para proporcionar un control positivo.

La Fig. 11B es un gráfico que muestra la intensidad medida de las tres muestras. El gráfico muestra una mineralización aumentada en los geles estimulados en comparación con el control.

15

10

5

La Fig. 11C muestra el espectro Raman del tejido óseo. Se usó este perfil como patrón de referencia para caracterizar la dispersión Raman (región de identificación de huellas 500 cm⁻¹ a 1500 cm⁻¹) del modelo de hueso. Se observaron los picos predominantes a -960 cm⁻¹ y -1072 cm⁻¹, correspondientes a PO_4^{3-} v₁ (fosfato del hueso cortical) y estiramiento del enlace CO_3^{2-} , respectivamente.

20

Las Fig. 11D y 11E muestran los espectros Raman capturados para el control y la muestra de ensayo. En la Fig. 11D no se observa el pico del fosfato en la muestra del control, y el barrido μ CT no muestra minerales. Sin embargo, en la Fig. 11E, está presente un pico de fosfato en la muestra de ensayo, y el barrido μ CT confirma que se ha producido la mineralización en el gel. El biorreactor es por tanto adecuado para su uso con muestras tridimensionales.

25

El biorreactor descrito anteriormente es un importante avance que permite ampliar el uso de los estímulos mecánicos de precisión para inducir la osteogénesis. El uso de la modelización por elementos finitos y la medición interferométrica es una combinación complementaria con respecto al diseño y la calibración de dicho dispositivo. El modelo producido en ANSYS sugirió que el biorreactor debe tener una resonancia en la región de 5270,8 Hz manteniendo a la vez una

30 precisión de la nanoamplitud del 17 % a lo largo de la superficie del dispositivo a 1000 Hz. Las mediciones interferométricas de la misma superficie muestran que, en la práctica, se puede conseguir una precisión de la amplitud mayor del 10 %, es decir, se pueden proporcionar amplitudes de vibración de 30±3 nm a lo largo de una superficie extendida.

35 Los datos presentados en el presente documento muestran también una disminución de la precisión de la amplitud y un aumento de la amplitud promedio en las configuraciones del cableado en serie y en paralelo por encima de 3000 Hz, lo que sugiere que una resonancia se encuentra cerca de 5000 Hz para la placa superior. Esta resonancia no aparece en las mediciones sin la placa superior. A lo largo del proceso se observaron los niveles más elevados de precisión de la amplitud con el biorreactor cableado en paralelo. Las mayores amplitudes posibles con esta configuración

40 también sugieren que sería más adecuado investigar el ajuste fino de la osteogénesis de los MSC. Las limitaciones de esta configuración están de nuevo limitadas por la precisión encima de los 3000 Hz y también un límite en la amplitud de 190 nm (50 Hz), sin embargo, la limitación de la amplitud es muy dependiente de la frecuencia. Como se observa en el gráfico de calibración, la vibración a 5000 Hz ya no sigue la curva de calibración similar que alcanza una meseta mucho más pronto que otras frecuencias, que tienden a una meseta por encima de una amplitud 100 nm.

Se cree que la meseta alcanzada bajo esta configuración es el resultado de alcanzar el límite de velocidad de precesión del amplificador de red. A amplitudes mayores para cada frecuencia, los armónicos de la frecuencia en cuestión aparecerán en la salida FFT del interferómetro. Esto se puede producir debido a que la onda sinusoidal se vuelve crecientemente triangular, lo que sucedería al cumplir el límite de velocidad de precesión.

50

El nivel de precisión de la amplitud es también útil para caracterizar el intervalo de aceleración capaz del biorreactor. Suponiendo que la estimulación es una onda sinusoidal, entonces, la plataforma es capaz de alcanzar la aceleración máxima de 20 g. La precisión a esta frecuencia (5000 Hz) es sin embargo cuestionable, lo que se debería tener en consideración si se compara con otros estudios.

55

60

Se descubrió que la consistencia de la amplitud de la vibración utilizando una placa de 24 pocillos era drásticamente menor que la de la placa de 6 pocillos. Esto se refleja en los resultados de biología, que muestran también a veces una precisión reducida. El uso del mismo tipo de imán deja las esquinas de la placa sin una fijación sólida a la superficie, por tanto, un cambio en los imanes utilizados podría eliminar esta diferencia en términos de amplitud y osteogénesis.

Además de esto, los datos biológicos obtenidos en los experimentos de ajuste de parámetros o especificaciones sugieren que la diferenciación osteoblástica eficaz y reproducible de los MSC, que consigue el uso de piezobiorreactor de los inventores, se produce mejor usando una placa de 6 pocillos a una frecuencia de 1000 Hz. Se cree que tener

65 un imán colocado bajo cada pocillo transmite un desplazamiento uniforme consistente mecanotransductivamente, detectado por las células cultivadas. Esto no solo se confirmó por los datos genómicos osteogénicos, sino también por

los datos genómicos de MEK/MAPK que se correlacionan bien, proporcionando una confianza adicional. El hecho de que los inventores hayan observado un aumento en todos los genes investigados relacionados con la ruta MEK/MAPK a nivel transcriptómico es tranquilizador ya que se observó la verdadera expresión biológica de la ruta MEK/MAPK en las proteínas tras una modificación posterior a la traducción, debida principalmente a la fosforilación [40]. Además,

- 5 esta ruta se activaría más comúnmente mediante estímulos químicos a través de la familia de receptores de la tirosina quinasa (RTK)/Ras/Raf, sin embargo, los inventores observaron en vez de esto una respuesta intensa a través de la FAK. Se cree también que una ruta puede tener un efecto supresor sobre la otra sugiriendo que la estimulación química y mecánica de la osteogénesis puede no ser complementaria [41]. De forma interesante, se observó que el aumento en la intensidad del pRUNX2 en las proteínas estaba fuertemente centrado alrededor del núcleo de las células. Esto
- 10 es lógico ya que se podría esperar que un factor de transcripción estuviera localizado próximo y alrededor del núcleo, donde pueda facilitar la promoción de la maquinaria genética de las células.

Aunque se muestra que 1000 Hz es una frecuencia osteoinductora muy fuerte (piezovibratoria) [36] y por tanto, un modo de funcionamiento preferido para el biorreactor de la invención, la invención no se limita al uso en esta frecuencia, ya que puede haber otras frecuencias que pueden producir efectos similares en la misma o diferentes amplitudes.

La confirmación de que los MSC son mecanosensibles a movimientos de menos de una milésima parte de su escala de longitud no solo promete nuevas terapias regenerativas, sino también el desarrollo de nuevos conocimientos fundamentales sobre mecanismos mecanotransductores. mediante la combinación de técnicas interferométricas y de perfilado genómico y proteómico osteogénico, la divulgación del presente documento presenta un novedoso reactor inductor de la osteogénesis.

La capacidad de producir nanoamplitudes con más de un 10 % de precisión sobre un gran intervalo de frecuencias y aceleraciones máximas puede permitir la investigación en el ajuste fino de las respuestas biológicas mecanosensibles (diferenciación de citoblastos). Se prevé que un uso óptimo para este biorreactor sería proporcionar una fuente fácil de células osteoblásticas o incluso tejido esquelético autólogo en una matriz de colágeno 3D que podría introducirse directamente en un sitio específico en un paciente que padece una dolencia esquelética (por ejemplo, osteoporosis, artrosis o fractura de hueso) que da lugar a huesos debilitados.

Referencias

15

40

[1] Wysocki, A., et al., Whole-body vibration therapy for osteoporosis: state of the science. Ann Intern Med, 2011. 155(10): págs. 680-6, W206-13.

35 [2] Conrad, C. y R. Huss, Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. Journal of Surgical Research, 2005. 124(2): págs. 201-208.

[3] Dalby, M.J., Cellular response to low adhesion nanotopographies. International Journal of Nanomedicine, 2007. 2(3): págs. 373-381.

[4] Dalby, M.J., et al., Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. 100(2): págs. 326-338.

- [5] Dalby, M.J., et al., Genomic expression of mesenchymal stem cells to altered nanoscale topographies. Journal of the Royal Society Interface, 2008. 5(26): págs. 1055-1065.
 [6] Kingham, E., et al., Nanotopographical cues augment mesenchymal differentiation of human embryonic stem.
 - [6] Kingham, E., et al., Nanotopographical cues augment mesenchymal differentiation of human embryonic stem cells. Small, 2013. 9(12): págs. 2140-51.
- 45 [7] Kilian, K.A., et al., Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(11): págs. 4872-7.

[8] Liu, J., et al., Hydrostatic pressures promote initial osteodifferentiation with ERK1/2 not p38 MAPK signaling involved. J Cell Biochem, 2009. 107(2): págs. 224-32.

[9] Henstock, J.R., et al., Cyclic hydrostatic pressure stimulates enhanced bone development in the foetal chick femur *in vitro*. Bone, 2013. 53(2): págs. 468-77.

[10] Kacena, M.A., et al., Experiments with osteoblasts cultured under hypergravity conditions. Microgravity Sci Technol, 2004. 15(1): págs. 28-34.

[11] Zhao, L.G., et al., The MEK5/ERK5 pathway mediates fluid shear stress promoted osteoblast differentiation. Connect Tissue Res, 2014. 55(2): págs. 96-102.

55 [12] Prodanov, L., et al., Substrate nanotexture and hypergravity through centrifugation enhance initial osteoblastogenesis. Tissue Eng Part A, 2013. 19(1-2): págs. 114-24.
[13] Luu, Y.K., et al., Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. J Bone Miner Res, 2009. 24(1): págs. 50-61.
[14] Mammoto, A., et al., A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. Nature, 2009.
60 457(7233): págs. 1103-U57.

[15] Ingber, D., How cells (might) sense microgravity. The FASEB Journal, 1999. 13(9001): págs. 3-15.

[16] Lan Levengood, S.K., et al., The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity. Acta Biomater, 2010. 6(8): págs. 3283-91.

- [17] Cheng, L., et al., Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. 33(3): págs. 1254-60.
 - [18] Chan, O., et al., The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute

biomaterials. Acta Biomater, 2012. 8(7): págs. 2788-94. [19] Habibovic, P., et al., Osteoinduction by biomaterials -- physicochemical and structural influences. J Biomed Mater Res A, 2006. 77(4): págs. 747-62. [20] Berry, C.C., et al., The interaction of human bone marrow cells with nanotopographical features in three 5 dimensional constructs. Journal Of Biomedical Materials Research Part A, 2006. 79A(2): págs. 431-439. [21] Nikukar, H., et al., Osteogenesis of mesenchymal stem cells by nanoscale mechanotransduction. ACS Nano, 2013. 7(3): págs. 2758-67. [22] Salter, D.M., J.E. Robb, y M.O. Wright, Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: Evidence for specific integrin function in mechanotransduction. Journal of Bone and Mineral Research, 10 1997. 12(7): págs. 1133-1141. [23] Kim, S.H., et al., Erk 1/2 activation in enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells in poly(lacticglycolic acid) by cyclic hydrostatic pressure. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. 80A(4): págs. 826-836. [24] Sawada, Y. v M.P. Sheetz, Force transduction by Triton cytoskeletons, J Cell Biol, 2002, 156(4); págs, 609-15. [25] Vogel, V. y M. Sheetz, Local force and geometry sensing regulate cell functions. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. 15 7(4): págs. 265-75. [26] Jeong, H.M., et al., Bromopropane compounds inhibit osteogenesis by ERK-dependent Runx2 inhibition in C2C12 cells. Archives of Pharmacal Research, 2014. 37(2): págs. 276-283. [27] Xu, D.H., et al., Salvianolic acid B promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells through activating ERK signaling pathway. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014. 51: págs. 1-9. 20 [28] Kozawa, O., D. Hatakeyama, y T. Uematsu, Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. Journal of Cellular Biochemistry, 2002. 84(3): págs. 583-589. [29] Kim, I.S., et al., Human mesenchymal stromal cells are mechanosensitive to vibration stimuli. J Dent Res, 2012. 25 91(12): págs. 1135-40. [30] Wehland, M., et al., The impact of altered gravity and vibration on endothelial cells during a parabolic flight. Cell Physiol Biochem, 2013. 31(2-3): págs. 432-51. [31] Gaston, J., et al., The Response of Vocal Fold Fibroblasts and Mesenchymal Stromal Cells to Vibration. PLoS ONE, 2012. 7(2): pág. e30965. 30 [32] Zhang, C., et al., Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Arch Oral Biol, 2012. 57(10): págs. 1395-407. [33] Tirkkonen, L., et al., The effects of vibration loading on adipose stem cell number, viability and differentiation towards bone-forming cells. J R Soc Interface, 2011,8(65): págs. 1736-47. [34] Ito, Y., et al., Effects of vibration on differentiation of cultured PC12 cells. Biotechnol Bioeng, 2011. 108(3): 35 págs. 592-9. [35] Curtis, A., et al., Cell Interactions at the Nanoscale:Piezoelectric Stimulation. IEEE Trans Nanobioscience. 2013. 12(3): págs. 247-254. [36] Gabriel D. Pemberton, S.R., Peter Childs, Habib Nikukar, P Monica Tsimbouri, Nikolaj Gadegaard, Adam SG Curtis y Matthew J Dalby, Nanoscale stimulation of osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells: 40 nanotopography and nanokicking. Nanomedicine [In Press], 2014. [37] Properties of Piezo Actuators - Dynamic Operation. [citado en agosto de 2014]; Disponible de: http://piceramic.com/piezo-technology/properties-piezo-actuators/dynamic-operation.html. [38] Celil, A.B. y P.G. Campbell, BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. Journal of Biological Chemistry, 45 2005. 280(36): págs. 31353-31359. [39] Zhu, F.C., et al., The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. Journal of Cellular Physiology, 2012. 227(6): págs. 2677-2685. [40] Burack, W.R. y T.W. Sturgill, The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. Biochemistry, 1997. 36(20): págs. 5929-5933. [41] Macagno, J.P., et al., FAK Acts as a Suppressor of RTK-MAP Kinase Signalling in Drosophila melanogaster 50 Epithelia and Human Cancer Cells. Plos Genetics, 2014. 10(3). [42] Miyakoshi, J., The review of cellular effects of a static magnetic field. Science and Technology of Advanced Materials, 2006. 7(4): págs. 305-307. [43] Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. y Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell 55 126, 677-689 (2006).

[44] Wen, J.H., et al. Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. Nat Mater (2014).

REIVINDICACIONES

1. Un biorreactor para transmitir vibraciones nanoescalares que estimulen los efectos mecanotransductores en tejidos biológicos, comprendiendo el biorreactor:

5

un accionador de la vibración; y

una placa receptora de muestras acoplada de forma vibratoria al accionador de la vibración,

en donde el accionador de vibración está dispuesto para hacer oscilar verticalmente la placa receptora de muestras a amplitudes nanoescalares,

10 en donde la placa receptora de muestras tiene una pluralidad de ubicaciones para montar muestras, y en donde la placa receptora de muestras está configurada para:

proporcionar fijación física a un recipiente de muestras en cada una de la pluralidad de ubicaciones para montar muestras, y transmitir vibraciones verticales mecánicas que tienen una amplitud nanoescalar sustancialmente uniforme a través de la pluralidad de ubicaciones para montar muestras.

15

2. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una matriz de accionadores de la vibración acoplada de forma vibratoria a la placa receptora de muestras, en el que la placa receptora de muestras está montada sobre la matriz de los accionadores de vibración.

20

3. Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el accionador o cada accionador de vibración está adherido a la placa receptora de muestras.

4. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el accionador o cada accionador de vibración forma parte de un recipiente de muestras respectivo.

5. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 2 que incluye un bloque base, en donde la matriz de los accionadores de la vibración está montada sobre una superficie superior del bloque base, por lo cual, la placa receptora de muestras puede vibrar con respecto al bloque base.

30

6. Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la placa receptora de muestras está fijada con contacto físico continuo al recipiente de muestras.

7. Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la placa receptora de muestras se puede
 acoplar magnéticamente al recipiente de muestras.

8. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la placa receptora de muestras tiene una construcción multicapa que comprende una capa inferior rígida y una capa superior magnéticamente sensible.

- 40 9. Un biorreactor de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 que incluye un recipiente de muestras que tiene una pluralidad de pocillos para recibir muestras de tejidos biológicos, en donde el recipiente de muestra tiene una superficie inferior magnética para encajar la placa receptora de muestras, por lo cual, la pluralidad de pocillos están dispuestos en la pluralidad de ubicaciones para montar muestras.
- 45 10. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la superficie inferior magnética comprende un disco magnético montado en la base de cada una de la pluralidad de pocillos.

 Un biorreactor de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que incluye un generador dispuesto para suministrar una señal de impulsión oscilante al accionador o a cada accionador de vibración, y en el que el accionador o cada accionador de vibración comprende un elemento piezoeléctrico, por lo que, la aplicación de la señal de impulso oscilante a través del elemento piezoeléctrico produce una deformación periódica del accionador.

12. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la matriz de los accionadores de la vibración consiste en una pluralidad de accionadores conectados en serie con el generador.

55

65

13. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el generador comprende una fuente de tensión y un oscilador, y en el que la fuente de tensión tiene una tensión de salida ajustable para controlar la amplitud de la vibración de la matriz de accionadores.

60 14. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la matriz de los accionadores de vibración consiste en una pluralidad de accionadores conectados en paralelo al generador.

15. Un biorreactor de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el generador comprende un amplificador, y en el que el amplificador tiene un volumen del amplificador ajustable para controlar la amplitud de vibración de la matriz de accionadores de vibración.





FIG. 3

ES 2 744 321 T3

























26















