

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 973**

51 Int. Cl.:

A61L 27/56 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2016** **PCT/EP2016/070500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017** **WO17037108**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2016** **E 16763469 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3344305**

54 Título: **Matrices de nichos sintéticos para cultivo de células madre**

30 Prioridad:

04.09.2015 IT UB20153414

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2020

73 Titular/es:

POLITECNICO DI MILANO (33.3%)
Piazza Leonardo da Vinci 32
20133 Milano, IT;
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(33.3%) y
FONDAZIONE CASSA DI RISPARMIO DELLE
PROVINCE LOMBARDE (33.3%)

72 Inventor/es:

RAIMONDI, MANUELA TERESA;
CERULLO, GIULIO;
OSELLAME, ROBERTO y
REMUZZI, ANDREA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 743 973 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

Matrices de nichos sintéticos para cultivo de células madre

La presente invención se refiere a un soporte para un cultivo celular, en particular de células madre.

5 De manera más particular, la presente invención se refiere a una estructura tridimensional que comprende matrices de nichos sintéticos.

Dicha invención tiene aplicación en particular en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería tisular.

Antecedentes de la invención

10 La medicina regenerativa adopta las células vivas en los tratamientos desarrollados para reparar tejidos celulares lesionados o enfermos. Siempre que tales células estén asociadas con matrices que soportan su regeneración, la estrategia regenerativa es denominada como ingeniería tisular.

El objetivo es reemplazar órganos o tejidos lesionados mediante el cultivo de células tomadas de pacientes en un soporte en cultivos adecuados para la formación de un tejido genomanipulado a ser implantado en el paciente.

15 La estrategia básica generalmente adoptada consiste en aislar una población de células de un paciente y expandirla *in vitro*, sembrar las células en un soporte adecuado conocido como "construcción". Esta estructura porosa guía el desarrollo del tejido y proporciona soporte estructural temporal hasta el momento en el que se implanta en el paciente, después de lo cual, el soporte se deja degradar o permanecer en su lugar.

20 Las células aisladas, de hecho, no tienen la capacidad de mantener la arquitectura tisular ya que carecen de un apoyo que las estimule. Además de proporcionar simplemente apoyo, la construcción ha de ser capaz de promover el crecimiento y la diferenciación de las células que se adhieren a la misma, y ha de haber determinado las características mecánicas que varían en función del tipo de célula que está siendo cultivada.

Partiendo de las interacciones entre la matriz extracelular y las células que la construcción ha de simular, ha de tener las siguientes propiedades biológicas:

- 25 - Citocompatibilidad: esta es la característica más importante que ha de poseer una construcción con el fin de realizar estudios *in vitro*. Junto con esta propiedad, también se requiere la biocompatibilidad; después de haber sido implantada, la construcción ha de ser no tóxica y ha de ser capaz de absorber las moléculas de la matriz extracelular (MEC) de tal manera que con el tiempo la reemplacen. Los estudios *in vivo* también requieren un buen grado de biodegradabilidad con el fin de permitir que los residuos de construcción sean expulsados del organismo sin causar acumulaciones no deseadas en el área de implantación.
- 30 - Tridimensionalidad: la construcción ha de ser capaz de recrear el entorno tridimensional (3D) de la MEC. Los poros han de tener un tamaño de tal manera como para permitir que tanto las actividades celulares como el paso de nutrientes. Las construcciones con alta porosidad y tamaños de poro amplios son, por lo tanto, deseables, sin que ello comprometa la estabilidad de las estructuras y la adhesión de las células.
- 35 - Rigidez: el módulo de elasticidad y los procedimientos de degradación tienen una importancia fundamental puesto que influyen tanto en la resistencia mecánica de la construcción como en la diferenciación y proliferación de las células.

Otra característica necesaria es que la construcción no ha de afectar al análisis de muestras. Las señales de la construcción en ocasiones enmascaran o alteran las señales de las células, especialmente durante las mediciones por microscopía óptica (fluorescencia y otros tipos), comprometiendo de esta manera seriamente el estudio de los resultados de los cultivos.

40 Gracias a su capacidad de diferenciarse en diferentes fenotipos y a ser expandidas *in vitro*, las células madre son una posible solución a varios problemas en la medicina regenerativa, tales como la escasez de órganos para trasplantes.

La imposibilidad actual para mantener las células madre indiferenciadas, particularmente las células madre adultas, en un cultivo prolongado plantea un límite importante en su aplicación potencial en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería tisular.

45 Promover y soportar la autorrenovación *in vitro* es esencial en el desarrollo y el mantenimiento de líneas de cultivo con células madre. De hecho, siempre que un acondicionamiento adecuado para mantenerlas como tal sea deficiente, estas células tienden inexorablemente a diferenciarse.

El mantenimiento de la troncalidad *in vitro* ha sido promovido convencionalmente por medios químicos a través de la adición de sustancias adecuadas al medio de cultivo.

50 Un mayor conocimiento de estas células ha llevado recientemente a la aparición de un concepto innovador basado únicamente en el acondicionamiento físico.

En particular, actualmente se están estudiando vínculos entre el comportamiento de las células madre y los patrones de superficie del cultivo de soporte.

En el cuerpo humano, las células madre adultas se encuentran en el interior de los tejidos en sitios conocidos como nichos de células madre que constituyen el microentorno en el que las células viven, se proliferan, y se diferencian.

- 5 Del mismo modo, una construcción artificial debe ser capaz de controlar la proliferación y, más importante aún, la diferenciación celular: las células pueden permanecer en estado quiescente hasta que un estímulo externo las induce a dividirse y a diferenciarse en células especializadas.

10 La ingeniería de nichos de células madre también ofrece un medio excelente de arrojar luz sobre los mecanismos que regulan el comportamiento celular *in vivo*, dado que proporciona células con un espacio en el que están confinadas y artificialmente estimuladas para mantener la troncalidad, exactamente como sucede en el organismo humano. Esto permitiría el guiado del comportamiento de las células madre a través de solamente la interacción mecánica, proporcionando de esta manera una base sólida para el uso de la inducción de la troncalidad en la práctica clínica.

Por lo tanto, se desea una construcción que permita que las células madre proliferen al mismo tiempo que permanezcan en su estado indiferenciado.

- 15 Son conocidas las construcciones en 3D en polímeros naturales y polímeros sintéticos.

Los polímeros naturales adoptados hasta ahora que han sido capaces de hacer contribuciones efectivas para el mantenimiento de la troncalidad incluyen ácido hialurónico, colágeno, y quitosano.

20 Las construcciones de material polímero sintético usadas para promover la troncalidad están generalmente compuestas de polímeros biodegradables, tales como ácido poliláctico (APL), ácido poliglicólico (APG) y su forma de copolímero, APLG.

Las construcciones tradicionales no ofrecen verdaderamente a las células un entorno de cultivo 3-D, dado que la mayoría de las construcciones tienen poros con dimensiones de órdenes de magnitud superior a las de las células, con el resultado de que las células no perciben la tridimensionalidad de estas estructuras cuyas superficies son esencialmente bidimensionales en una escala micrométrica.

- 25 Por tanto, es necesario modular artificialmente en un microescala la interacción entre las células y el soporte sobre el que se siembran mediante la fabricación de estructuras tridimensionales con dimensiones controladas en las escalas de una única célula.

La única tecnología de fabricación conocida que permite obtener este tipo de estructura es la polimerización láser con dos fotones (2PP), que permite la creación de estructuras 3D con una precisión submicrométrica.

- 30 Las técnicas denominadas de microfabricación no tradicional permiten obtener construcciones con una microestructura controlada, y sobre todo, predefinida, permitiendo a menudo que la estructura sea desarrollada a partir de un modelo de diseño asistido por ordenador (DAO).

Las técnicas más ampliamente adoptadas son litográficas, tales como fotolitografía, litografía blanda, estereolitografía, litografía de rayos X, y litografía electrónica (litografía por haz de electrones).

- 35 La fotolitografía es una de las tecnologías más importantes en la fabricación de estructuras a microescala, y es un procedimiento usado para eliminar selectivamente partes de una película o un sustrato fino. Se usa un haz de luz para transferir un patrón geométrico de una fotomáscara a una sustancia química fotosensible (resina fotosensible o fotorresistente) depositada sobre el sustrato. La fotomáscara es una lámina, usualmente de cuarzo, que está recubierta con una metálica con el fin de generar áreas de transparencia u opacidad en el patrón geométrico a reproducir. Los
40 tratamientos químicos o físicos posteriores modelan el patrón en el material. La exposición transfiere el patrón de las características deseadas por medio de la fotomáscara colocada entre el sustrato, cubierta por un material fotosensible (fotorresistente), y la fuente de luz. Posteriormente, el material puede ser eliminado desde el sustrato usando técnicas químicas (ataque químico). La fotolitografía es una técnica intrínsecamente bidimensional (2D).

- 45 La técnica de sinterizado selectivo por láser (SSL) permite en su lugar la fabricación de estructuras tridimensionales a través de la acción de un haz de láser capas de material en forma de polvo. La construcción es diseñada y se produce un modelo DAO tridimensional; el procedimiento de fabricación es muy similar al de la impresión en 3D: se usa una fina capa de polvo y se irradia por un láser infrarrojo (normalmente un láser de CO₂) con el fin de sinterizar las partículas en la forma deseada y crear una capa inicial de la estructura. La estructura es reduce entonces y el procedimiento se repita hasta que la construcción sea completada; y el polvo no sinterizado sea eliminado. Varios estudios han
50 demostrado la posibilidad de fabricar construcciones de policaprolactona (PCL) y compuestos de a base de calcio-fosfato que poseen las características mecánicas y morfológicas adecuadas para el crecimiento celular.

Sin embargo, esta técnica ofrece una resolución espacial del orden de cientos de micrómetros y por tal razón no es adecuada para fabricar construcciones 3D de dimensiones compatibles con las de las células.

La única técnica de fabricación conocida que proporciona un control submicrométrico sobre la geometría de la construcción en 3D es 2PP, que puede ser usada para obtener estructuras con geometría controlada respecto a la precisión submicrométrica al irradiar un material fotosensible con un haz de láser infrarrojo pulsado altamente focalizado. La absorción simultánea de dos fotones láser desencadena un procedimiento fotoquímico que causa la polimerización del volumen focal, permitiendo de esta manera la definición dentro del material de un elemento de volumen (píxel de volumen, vóxel) con una resolución transversal y longitudinal inferior a la longitud de onda.

Gracias a su enorme potencial, la técnica 2PP cumple con la necesidad de crear construcciones tridimensionales cuya geometría y patrones micro/nanosuperficiales son altamente controlables. En los últimos años, un número creciente de investigadores ha adoptado esta técnica en la fabricación de construcciones para el crecimiento celular. La mayoría de los estudios en la literatura científica tienen por objeto demostrar la biocompatibilidad del material usado y evaluar el comportamiento de las células con respecto a las características de las construcciones desarrolladas; las aplicaciones clínicas de estructuras fabricadas usando 2PP, en su lugar, no están disponibles aún. Numerosos estudios llevados a cabo en construcciones fabricadas usando 2PP (Karl-Heinz Haas y Herbert Wolter. *Synthesis, properties and applications of inorganic-organic copolymers*. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 4(6):571-580, 1999; Thomas Weiß, Ronald Schade, Thorsten Laube, Albrecht Berg, Gerhard Hildebrand, Ralf Wyrwa, Matthias Schnabelrauch, y Klaus Liefelth. *Two-photon polymerization of biocompatible photopolymers for micro-structured 3d biointerfaces*, *Advanced Engineering Materials*, 13(9):B264-B273, 2011) confirman el potencial de esta tecnología, que permite la creación de estructuras para el crecimiento de células madre y el estudio del comportamiento de las células a tenor de futuras aplicaciones clínicas en medicina regenerativa.

La técnica 2PP es por tanto prometedora para aplicaciones de naturaleza biológica en la que han de prepararse estructuras 3D con resoluciones espaciales de solo unos pocos micrómetros, y en particular, para ingeniería tisular, en la que el desarrollo de técnicas que permiten el control de muchos aspectos diferentes de comportamiento celular, tal como adhesión, migración, proliferación y diferenciación es muy importante.

Las estructuras obtenidas a través de 2PP tienen un enorme potencial en la medicina regenerativa: una microestructura ordenada, simple compuesta por microfibras paralelas ya es capaz de dirigir físicamente la regeneración de tejido neural (Vasileia Melissinaki, AA Gill, Ildia Ortega, Maria Vamvakaki, Anthi Ranella, JW Haycock, C Fotakis, M Farsari, y F Claeysens. *Direct laser writing of 3d scaffolds for neural tissue engineering applications*. *Biofabrication*, 3(4):045005, 2011) or guiding the orientation of human fibroblasts (LE Sima, EC Buruiana, T Buruiana, A Matei, G Epurescu, M Zamfirescu, A Moldovan, SM Petrescu, y M Dinescu. *Dermal cells distribution on laser-structured ormosils*. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 7(2):129-138, 2013).

2PP ha permitido la fabricación de estructuras ultraprecisas y ordenadas con geometría controlada a escala celular (10 µm) y una resolución espacial extremadamente alta (inferior a 1 µm).

Esta técnica ya se ha empleado para fabricar construcciones expresamente diseñadas para una interacción celular. Durante los últimos veinte años, de hecho, los factores biofísicos han demostrado que son capaces de influir en la respuesta biológica de las células en cultivo, incluso en ausencia de factores bioquímicos (Manuela Teresa Raimondi. *Engineered tissue as a model to study cell and tissue function from a biophysical perspective*. *Current drug discovery technologies*, 3(4):245-268, 2006).

Las construcciones biopoliméricas fabricadas por 2PP imitan adecuadamente el microentorno celular en términos de arquitectura, pero a menudo carecen de la estabilidad mecánica necesaria.

Cierta literatura de patente se refiere a la fabricación de construcciones 3D, también para el cultivo celular.

El documento WO2012018304, por ejemplo, desvela un procedimiento de fabricación de una construcción tridimensional que comprende células encapsuladas. El procedimiento usa fotolitografía láser con dos fotones. En este procedimiento, las células se encapsulan durante la formación de la estructura 3D con el fin de evitar la necesidad del procedimiento de siembra de células. La construcción no se sometió a ensayo en células madre sino en células endoteliales y hepáticas, por lo tanto, no se abordó el problema del mantenimiento de la pluripotencia de células madre.

El documento WO2009048314 desvela estructuras 3D fabricadas a través de fotopolimerización con láser en la que proliferan las células. Sin embargo, estas estructuras pueden ser implantadas *in vivo* para la regeneración de hueso y cartílago y no sustratos *in vitro* en cultivos celulares. Por lo tanto, se diseñan para la creación de entornos osteoinductivos y osteoconductores.

El documento US20070249044 desvela un sistema 3D para un cultivo celular que comprende microestructuras suspendidas en un gel de cultivo celular. Estas son estructuras poliméricas usadas para el cultivo de fibroblastos. Aquí también, sin embargo, no se aborda la cuestión del crecimiento de células madre.

El documento WO2012041522 describe un procedimiento de producción de estructuras 3D en capas que se puede usar en un cultivo celular. El problema de crear nichos sintéticos para el crecimiento de células madre no se aborda.

Es conocido el uso de una técnica 2PP en la preparación de sustratos 3D que son útiles en la ingeniería tisular.

Por ejemplo, Malinauskas, M., Danilevicius, P., Baltriukiene, D., Rutkauskas, M., Zukauskas, A., Kairyte, Z., Bickaускаite, G., Purlys, V., Paipulas, D., Bukelskiene, V., y Gadonas, R. en "3D artificial polymeric scaffolds for stem cell growth fabricated by femtosecond laser", 2010, Lithuanian Journal of Physics, Vol. 50, N.º 1, pág. 75-82, describen construcciones 3D para la proliferación de células, además de células madre. Ovsianikov, A., Malinauskas, M., Schlie, S., Chichkov, B., Gittard, S., Narayan, R., Löbler, M., Sternberg, K., Schmitz, K.-P., y Haverich, A., en "Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly (ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications", 2011, Acta Biomaterialia, 7 (2011) 967-974, estudiaron estructuras 3D para aplicaciones en ingeniería tisular. Maciulaitis J., Deveikyte M., Rekstyte S., Bratchikov M., Darinskas A., Simbelyte A., Daunoras G., Laurinaviciene A., Laurinavicius A., Gudas R., Malinauskas M., Maciulaitis R. en "Preclinical study of SZ2080 material 3D microstructured scaffolds for cartilage tissue engineering made by femtosecond direct laser writing lithography". Biofabrication. 23 de marzo de 2015; 7(1), estudian microconstrucciones artificiales 3D para el cultivo de condrocitos para formar tejido similar a un cartílago.

Todas estas estructuras 3D se han diseñado para su uso como construcciones en las que las células se pueden insertar y proliferar con el fin de crear tejidos artificiales que son lo más similares posible a los tejidos naturales. En estas estructuras 3D, las unidades individuales que componen la construcción se comunican por completo unas con otras: por lo tanto, las células son libres de migrar de una unidad a otra de la construcción. Esto influye altamente en su comportamiento. Si bien se mostró la biocompatibilidad de tales construcciones y su idoneidad para su uso en ingeniería tisular, no se abordó el problema de mantener las células madre en un estado indiferenciado. Por el contrario, estos estudios abordan el problema de diferenciar las células en células del tejido deseado.

Por lo tanto, las construcciones adecuadas para promover la proliferación de células madres mientras que al mismo tiempo impiden o desacelerando su diferenciación son todavía muy deseadas. Además, las construcciones de la técnica anterior tienen una pequeña extensión y, por tanto, no abordan los problemas de estabilidad mecánica que surgen cuando han de cubrirse las superficies de tamaño milimétrico. En segundo lugar, la ausencia de confinamiento físico en el interior de las unidades individuales en las construcciones tradicionales nunca ha permitido demostrar el mantenimiento de la troncalidad celular, sino, en su lugar, su diferenciación en el interior de dichas estructuras.

El efecto de diversas geometrías de construcción en el comportamiento de células madre mesenquimales ha sido estudiado recientemente.

Trabajos de Raimondi y col., (Three-dimensional structural niches engineered via two-photon laser polymerization promote stem cell homing. Manuela T. Raimondi, Shane M. Eaton, Matteo Laganà, Veronica Aprile, Michele M. Nava, Giulio Cerullo, Roberto Osellame: Acta Biomaterialia, 2013, Vol. 9, pág. 4579-4584; Optimization of direct laser-written structural niches to control mesenchymal stromal cell fate in culture. M.T. Raimondi, M.M. Nava, S. M. Eaton 2, A. Bernasconi, K. C. Vishnubhatla, Giulio Cerullo, R. Osellame: Micromachines, 2014, Vol. 5, pág. 341-358) describen estructuras, referidas como nichos sintéticos, compuestas de una resina polimérica conocida como SZ2080 que fue expresamente desarrollada por 2PP (Materials Processing: Two-photon fabrication. M. Farsari, B.N. Chichkov: Nature Photonics, 2009, Vol. 3). Estas estructuras se denominan nichos sintéticos ya que reproducen artificialmente el entorno de los nichos de las células madre. La morfología definitiva de la construcción fue seleccionada por optimización de parámetros tales como "retorno linfocítico dirigido", es decir, la capacidad del nicho para promover la entrada de las células y su mantenimiento dentro del mismo, junto con la proliferación y adhesión celular. Los primeros estudios acerca de esta construcción 3D se llevaron a cabo usando células madre mesenquimales (CMM) multipotentes aisladas de la médula ósea tomada de fémures de rata. Los resultados obtenidos confirman que la matriz es capaz de mantener una morfología con núcleos celulares más redondeados que en los cultivos planos 2D. El resultado más significativo es que después de un cultivo prolongado (3 semanas), las células muestran diferencias en el comportamiento entre los entornos 2D y 3D: una marcada diferenciación celular hacia el fenotipo óseo tiene lugar fuera del nicho, de hecho, siempre que en el interior del nicho, las células sean negativas para tinción para diferenciación realizada y presenten una expresión Ki67 superior que en un cultivo monocapa, y esto es indicativo de un mantenimiento de la capacidad proliferativa superior. La geometría de nicho optimizada fue capaz de suministrar las células madre con una relación área superficial/volumen superior que les permitió adherirse y proliferar mientras se mantienen la multipotencia (Raimondi y col., 2013, 2014).

En vista de las aplicaciones potenciales en la práctica clínica, el uso de señales puramente mecánicas para guiar el comportamiento de células madre tiene la importante ventaja de minimizar el uso de moléculas bioquímicas, p. ej., factores de crecimiento, reduciendo de esta manera los riesgos para el paciente planteados por su administración.

Sin embargo, un problema que todavía queda por resolver es cómo aumentar significativamente el área superficial cubierta por los nichos sintéticos.

Estudios previos sobre estructuras similares llevaron a la hipótesis de que la biodinámica se ve influenciada no solo por la geometría sino también por la distancia entre los nichos sintéticos individuales.

En estudios realizados por Raimondi y col., (2013 y 2014), por ejemplo, los patrones de nicho se fabricaron con diferentes distribuciones en el espacio con una configuración hexagonal. De manera más particular, las estructuras de muestra se fabricaron, en las cuales 6 nichos fueron dispuestos en los vértices de un hexágono con lados de 200-600 µm y otra estructura se colocó en el centro de tal manera que todos eran equidistantes. En ensayos con CMM, se

observaron nichos microestructurados por ser capaces no solo de promover el retorno linfocítico dirigido de células madre no también de guiar la formación de agregados celulares.

5 Nava y col., (Interactions between structural and chemical biomimetism in synthetic stem cell niches. Michele M Nava, Manuela T Raimondi, Caterina Credi, Carmela De Marco, Stefano Turri, Giulio Cerullo y Roberto Osellame. Biomed. Mater. 10 (2015) 015012) describen nichos sintéticos dispuestos en un patrón triangular a una distancia de 200 μm recubiertos con hidrogel y sometidos a ensayo con células madre mesenquimales de rata.

10 Las estructuras descritas en el estado de la técnica mencionado anteriormente tienen el inconveniente de dejar una gran cantidad de espacio de superficie de soporte libre de nichos sintéticos (véase la Figura 7). En dicha área superficial libre, las células se comportan de una manera bidimensional, por lo tanto, se diferencian rápidamente, perdiendo su troncalidad.

Con el fin de permitir el uso comercial de las estructuras 3D como sustratos de cultivo a gran escala, y por lo tanto para el cultivo de millones de células, la superficie de soporte cubierta por nichos sintéticos ha de ser lo mayor posible.

15 Los nichos sintéticos propuestos en el estado de la técnica no resuelven el problema ya que los nichos cubren un área superficial limitada del 10 % del área superficial de soporte total disponible para la adhesión celular. Por lo tanto, pueden usarse para el cultivo 3D de cantidades muy pequeñas de células, y esto pone un límite serio en aplicaciones industriales y comerciales.

El aumento del área superficial cubierta por microestructuras requiere una estructura que minimice la contribución de las superficies planas entre los nichos individuales.

20 Por lo tanto existe la necesidad de fabricar una sola gran estructura, aún con una microestructura, capaz de albergar en sí misma el mayor número posible de células con el fin de eliminar el comportamiento bidimensional por completo o al menos en la mayor medida posible.

25 Con el fin de obtener una mayor densidad de superficie de construcción, se produjo un conjunto de nichos sintéticos en el que se produjo una red cristalina por el emparejamiento de nichos individuales que cubren completamente una región circular con un diámetro de 6 mm. Esto permite maximizar el área cubierta por la construcción y cubrir el 96 % de la superficie total.

Sin embargo, la fabricación de este tipo de estructura produce varios defectos debido a la retracción del material polimérico que se deforma la estructura, y también debido a la cavitación, que da lugar a la formación de burbujas y la consiguiente ruptura de la estructura (véase la Figura 4B-C).

30 En particular, La construcción de una estructura individual mayor que aloja múltiples nichos sintéticos plantea el problema de la retracción del polímero durante la expansión (Figura 4B) que crea estrés y deformación mecánicos. Las excesivas dimensiones de la superficie cubierta por las estructuras plantean el riesgo de dañar algunas áreas de los nichos con repercusiones en el resto de la estructura.

Es más, estos daños estructurales comprometen la interacción entre las estructuras y las células.

35 Por este motivo, todavía existe la necesidad de desarrollar matrices intactas uniformes, definidas e inquebrantables que mantienen la estructura tridimensional necesaria para la proliferación celular y al mismo tiempo maximizan la superficie sobre la que las células pueden proliferar a la vez que permanecen indiferenciadas.

Ahora se ha descubierto que mediante la agrupación de nichos sintéticos en matrices separadas, cualquier ligera retracción que se produce en el polímero que compone los nichos sintéticos no arruinar toda la estructura, debido particularmente a que no se superpone a la retracción de las matrices adyacentes gracias a la distancia entre sí.

40 Por lo tanto, se ha descubierto una estructura de cultivo celular 3D, denominada en el presente documento como supermatriz, compuesta por matrices de nichos sintéticos con una configuración determinada que presenta las ventajas de una estructura más fuerte y más estable que la descrita en la técnica anterior, en particular, una estructura en la que no hay deformaciones o defectos presentes y en la que al mismo tiempo la estructura tridimensional de los nichos artificiales se mantiene (véase, por ejemplo, la Figura 4D y la Figura 5 A-B).

45 De hecho, en la estructura de acuerdo con la presente invención, los daños causados por la retracción del polímero descrito anteriormente no se producen.

50 Es más, el uso de una supermatriz de nichos sintético compuesta de esta forma asegura, por ejemplo, que cualquier alteración y/o desprendimiento de una matriz de nicho no dañe las matrices de nicho cercanas de tal manera que incluso cuando se observa un comportamiento bidimensional de las células sembradas en tal área, puede considerarse insignificante ya que no influye en el desarrollo del cultivo en otras matrices.

El objeto de la estructura 3D de la presente invención también permite obtener nichos artificiales reproducibles.

Es más, gracias a su estabilidad, estas supermatrices se pueden volver a usar.

5 El uso de la supermatriz de acuerdo con la invención como un sustrato para un cultivo de células multipotentes o pluripotentes permite el mantenimiento de la potencia sin insertar de forma continuada factores químicos que acondicionan las células en el medio de cultivo. La diferencia entre el uso de factores químicos y el uso de nichos mentiras sintéticos reside, de hecho, en la diferentes duración del cambio de diferenciación: las células permanecen generalmente pluripotentes solo si los factores químicos se insertan frecuentemente, mientras que con el uso de la supermatriz de acuerdo con la invención, son capaces de mantener tanto la multipotencia como la pluripotencia incluso después de muchas divisiones de la primera célula madre sembrada.

Las supermatrices de acuerdo con la invención son por lo tanto adecuadas para el cultivo de cualquier tipo de célula madre, en particular células madre adultas, más en particular células madre mesenquimales, y embrionarias.

10 De manera más particular, la eficacia de tales supermatrices de nichos sintéticos ha sido evaluada en células madre mesenquimales adultas (multipotentes) y en células madre embrionarias (pluripotentes).

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es una supermatriz que comprende al menos dos matrices de nichos sintéticos,

15 en la que cada matriz comprende $n \times m$ nichos sintéticos, en la que n y m , idénticas o diferentes entre sí, tienen un valor ≥ 1 , siempre que uno de m o n es ≥ 2 y con un valor máximo de m y n que permite mantener la estructura del nicho sintético individual intacta de modo que la retracción del material no causa alteraciones significativas, y en el que la distancia (d) entre una matriz de nicho sintético y la otra es superior a cero, y en el que cada matriz de cada nicho sintético tiene una o más paredes en común con el(los) otro(s) nicho(s) sintético(s) de la matriz.

20 Preferentemente, dicho valor máximo de n y m es 100.

Preferentemente, m y n son idénticos y cada matriz tiene una forma cuadrada.

En una realización a modo de ejemplo de acuerdo con la invención, m y n son iguales a 5, de modo que cada matriz de nicho sintético es una matriz de 5×5 (5 nichos sintéticos $\times$ 5 nichos sintéticos).

25 En una realización preferida, la altura de la supermatriz está comprendida entre 30 y 100 μm . Esto permite el uso de todas las técnicas conocidas para el análisis de las células, independientemente de sus diferencias en términos de dimensión, deformabilidad y cinética de adherencia al sustrato entre las diversas poblaciones de células madre.

La supermatriz de acuerdo con la invención es obtenida usando la técnica de polimerización láser con dos fotones (2PP).

30 Asimismo es un objeto de la invención un sustrato o soporte para cultivo celular que comprende al menos una supermatriz de acuerdo con la invención.

Dicho soporte es, por ejemplo, una placa mono- o multipocillos o un matraz.

El uso de la supermatriz de acuerdo con la invención para el cultivo de células madre, particularmente *in vitro*, es otro objeto de la presente invención.

Dichas células son preferentemente células madre adultas. En otra realización, son las células madre embrionarias.

35 En otra realización, la supermatriz de acuerdo con la invención se usa para un implante *in vivo* en un sujeto con el fin de promover la regeneración de tejidos.

Un objeto adicional de la invención es el uso de la supermatriz de la invención o del soporte de cultivo que lo comprende para el análisis de cultivo celular, en particular, en el campo del diagnóstico.

40 La supermatriz de acuerdo con la invención tiene la principal ventaja de permitir el aumento de la superficie disponible para el cultivo celular cubierto por nichos.

Esto permite una extensión de su uso tanto en la investigación biológica a gran escala como en las aplicaciones clínicas de las células cultivadas como productos terapéuticos.

El uso de dicho supermatriz permite obtener una estructura tridimensional intacta en la que no se causa ningún daño por la retracción del polímero durante la expansión.

45 Gracias al mantenimiento de un entorno perfectamente en 3D, los nichos sintéticos de acuerdo con la invención pueden inducir conformaciones de núcleos para prevenir o retrasar significativamente la diferenciación de células madre, a diferencia de la encapsulación o siembra en sustratos poliméricos 3D naturales, que no garantizan el mismo grado de control geométrico.

En comparación con las estructuras 3D conocidas, tales como las de Maulinaskas y col., 2010 y 2011, por ejemplo,

en la supermatriz de acuerdo con la invención, cada nicho sintético está rodeado por un perímetro externo que es permeable a la difusión de moléculas pero obstaculiza la migración de las células de un nicho sintético a los adyacentes. Esto permite abordar y resolver el problema de mantenimiento de la pluripotencia y el retraso de la diferenciación de las células madre.

- 5 Es más, al contrario de la observación en la técnica anterior, se ha observado que dicho retraso de la diferenciación tiene lugar sin acondicionamiento químico, demostrando de este modo que en la supermatriz de acuerdo con la invención, las señales mecánicas son necesarias y suficientes para promover la pluripotencia e inhibir la diferenciación.

Además, dicha supermatriz permite reducciones en los tiempos de producción, un requisito esencial para la ampliación a escala del procedimiento y en particular para la producción en masa.

- 10 Como una ventaja adicional, la misma supermatriz se puede usar de nuevo en experimentos posteriores sin requerir la producción de nuevas muestras de estructuras para cada nuevo uso.

Además, gracias a la compleción de la reproducibilidad, se obtienen estructuras idénticas entre sí: matrices 3D en colágeno, quitosán, ácido hialurónico o polímeros sintéticos lugar de presentar marcadas variaciones estructurales incluso en condiciones equivalentes de producción.

- 15 La supermatriz de acuerdo con la invención es particularmente útil en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería tisular, en el que pueden usarse para proporcionar un número de células suficiente para aplicaciones que implican la repoblación de órganos descelularizados o tratamiento *in situ*, por ejemplo.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 20 En el contexto de la presente invención, el término supermatriz significa una estructura tridimensional que comprende más de un nicho sintético o matrices de nichos sintéticos.

En el contexto de la presente invención, la expresión nicho sintético significa una estructura tridimensional sintética adecuada para reproducir las restricciones geométricas a la que son sometidas las células en su microentorno nativo (el nicho de células madre). En particular, un nicho sintético está rodeado por un perímetro externo que es permeable a la difusión de moléculas pero obstaculiza la migración de las células de un nicho sintético a los adyacentes (confinamiento físico). "Nichoide", como sinónimo de nicho sintético, también se usará en lo precedente de la presente descripción. Para una descripción a modo de ejemplo de un nicho sintético, se puede hacer referencia a los artículos de Raimondi y col., 2014, en Micromachines, y 2013, en Acta Biomaterialia.

- 30 En el contexto de la presente invención, la expresión células madre significa células primitivas, no especializadas que son capaces de transformarse en varios tipos de células corporales a través de un procedimiento conocido como diferenciación celular.

En el contexto de la presente invención, la expresión células madre mesenquimales significa células madre adultas que se encuentran en la médula ósea que pueden diferenciarse en todos los tipos de célula de tejido musculoesquelético, incluyendo osteocitos, condrocitos, miocitos y fibroblastos.

- 35 En el contexto de la presente invención, la expresión célula madre multipotente significa células que son capaces de dividirse y diferenciarse en una cualquiera de las tres capas germinales: endodérmica (revestimiento del estómago, tubo digestivo, pulmón), mesodérmica (músculo, huesos, sangre, urogenital), o ectodérmica (tejido epidérmico y células del sistema nervioso).

- 40 En el contexto de la presente invención, la expresión células madre multipotentes significan células capaces de diferenciarse en un número limitado de linajes celulares; estas células también se conocen como "células progenitoras".

Figuras

Figura 1. Representación a modo de ejemplo de una supermatriz de acuerdo con la invención caracterizada por matrices de 5x5 nichos sintéticos, separados por una distancia d.

- 45 Figura 2. Realización a modo de ejemplo de una matriz formada por 15 nichos sintéticos, en la que $n = 5$ y $m = 3$.

Figura 3: matriz mínima (2 x 1).

Figura 4. (A) Supermatriz que muestra problemas vinculados a la microfabricación. (B) Efecto de retracción, con deformación de la estructura; (C) Efecto de cavitación; (D) Realización a modo de ejemplo de la supermatriz de acuerdo con la invención, caracterizada por una configuración de matriz separada. Los agregados visibles son células madre embrionarias (ME) murinas en el día 3 de cultivo.

50

Figura 5. Las fotos por microscopio óptico (A) y MEB (B) de una realización a modo de ejemplo de la supermatriz de acuerdo con la invención.

Figura 6. A-B) Realización a modo de ejemplo de un nicho sintético usado en una supermatriz de acuerdo con la invención, vista completa (A) y seccional (B). El nicho es un paralelepípedo, formado por una rejilla de contención externa fabricada por líneas paralelas horizontales, espaciadas de forma idénticas, y por una red cristalina 3D interna de geometría y tamaño variables. La estructura de red cristalina en la que $a = 100 \mu\text{m}$, $c = 10 \mu\text{m}$, $d = 2c$ y $e = 3c$. Las líneas paralelas en las paredes están espaciadas por $f = 5 \mu\text{m}$. C-D) Representación gráfica de cómo están diseñados los nichos individuales.

Figura 7: Foto de microscopio óptico de una realización a modo de ejemplo de nichos individuales: cada construcción se encuentra a $300 \mu\text{m}$ de la siguiente.

Figura 8: Foto de microscopio MEB de una realización a modo de ejemplo de una supermatriz formada por 5×5 matrices de nichos sintéticos.

Figura 9: Foto de microscopio óptico de una realización a modo de ejemplo de una serie de nichos sintéticos en los que una red cristalina continua producida por el emparejamiento de nichos individuales cubre por completo una región, con daños causados por la retracción (contracción) del polímero durante la fase de "desarrollo" de fabricación.

Figura 10: MEm en el interior de un nicho. Foto de microscopio MEB de células MEm en el día 3 de cultivo. Las tres fotos muestran la misma región pero fueron adquiridas desde diferentes ángulos. (A) vista superior (inclinación de 0°), la forma en la que un agregado de células, denominado cuerpo embrioides, se adhiere fuertemente a las estructuras es claramente evidente: la deformación estructural se debe casi seguramente a la retracción celular durante la fase de deshidratación puesto que *in vivo*, en microscopía de contraste de fases, nunca se ha observado una deformación similar. (B) Inclinación de 30° . (C) Detalle de la foto tomada con inclinación de 30° : el cuerpo embrioides se adhiere al nivel de nicho intermedio en el lado frontal, mientras se adhiere al nivel de base en el lado posterior; el cuerpo embrioides, por tanto, no descansa en la superficie inferior del soporte de cultivo, como sucede normalmente en los soportes planos 2D.

Figuras 11.1-11.4. Simulación computarizada de la escritura de láser de una realización a modo de ejemplo de la supermatriz de acuerdo con la invención.

Figura 12: Representación a modo de ejemplo de una placa de cultivo de múltiples pocillos recubierta con las supermatrices de la invención.

La supermatriz de acuerdo con la invención está formada por matrices de nichos sintéticos.

Una realización de la supermatriz de acuerdo con la invención se representa en la Figura 1.

Cada matriz está formada por un cierto número $n \times m$ de nichos sintéticos.

En cada matriz, cada nicho sintético tiene una o más paredes en común con el(los) otro(s) nicho(s) sintético(s) de la matriz.

En una realización preferida, cada nicho sintético de la matriz tiene dos o más paredes en común con los otros nichos sintéticos de la matriz.

Una realización a modo de ejemplo de una matriz de nichos sintéticos se representa en la Figura 2.

La matriz puede tener diversas formas. En una realización preferida, tiene una forma cuadrada.

En la matriz, m y n tienen un valor ≥ 1 , siempre que al menos uno de m o n es ≥ 2 .

Por lo tanto, la matriz mínima es una matriz 2×1 , como se muestra en la figura 3. En esta matriz mínima, cada nicho sintético tiene una o más paredes en común con el otro nicho.

El valor máximo de m y n es aquel que permite obtener una matriz sin rupturas o deformaciones tales que comprometan la estabilidad de la supermatriz. Esto puede ser evaluado fácilmente por un experto en la materia con el conocimiento de las técnicas comúnmente conocidas en el sector, en particular para la fabricación de nichos.

Por ejemplo, este valor máximo de m y n es igual a 100.

La distancia entre una matriz de nichos sintéticos y la siguiente se define por el valor d .

Dicha distancia d es siempre superior a cero, por lo tanto, las matrices están espaciadas necesariamente unas de otras.

Preferentemente, dicha distancia es el mínimo obtenible usando las técnicas de fabricación de hoy en día.

La estructura de un nicho sintético individual es conocida, por ejemplo por Raimondi y col., 2014 y 2013.

En una realización preferida (Figura 6), cada nicho sintético individual tiene una sección cuadrada con lados de 90 μm (b), una altura de 100 μm (a), y con 6 capas de redes cristalinas apiladas. En cada red cristalina, los poros tienen dimensiones que varían entre 10 μm y 30 μm . Las paredes de confinamiento alrededor del perímetro del nicho, fabricadas de varillas paralelas a una distancia de 5 μm (f) unas de otras, también se proporcionan. Las varillas del nicho sobresalen alrededor de un micrómetro más allá de la estructura.

Las dimensiones del nicho individual pueden variar según el tipo específico de célula que se está cultivando, mientras se mantiene al mismo tiempo la estructura tridimensional. Un experto en la materia puede determinar las modificaciones que deben realizarse al nicho en la base del tipo de célula.

Por ejemplo, la anchura y la profundidad del nicho pueden variar entre 20 y 500 μm con poros que varían de 5 a 100 μm , preferentemente de 10 μm a 30 μm . La altura puede variar de 5 a 500 μm , preferentemente de 30 μm a 100 μm . Cada nicho puede tener varias capas de redes cristalinas, por ejemplo de 2 a 10 capas, preferentemente de 4 a 6 capas. Las paredes de confinamiento están fabricadas preferentemente de varillas paralelas a una distancia una de la otra que puede variar, por ejemplo, de 2 a 30 μm , preferentemente de 2 a 10 μm , más preferentemente de 5 μm .

En una realización preferida, la altura de la supermatriz es de 30 μm , en particular, siempre que se use para el cultivo de células madre mesenquimales. Dicha altura permite que todas la técnicas de microscopía conocidas para el análisis celular se apliquen a las células que crecen en los nichos.

En caso de cultivar células madre altamente proliferativas, tales como las células madre pluripotentes (p. ej., embrionarias), es preferible una altura de más de 30 μm .

Las supermatrices de acuerdo con la invención se fabrican normalmente sobre un soporte plano.

Dicho soporte plano se fabrica normalmente de un material ópticamente transparente al láser de dos fotones, preferentemente vidrio o un polímero, por ejemplo de la familia de las poliolefinas.

En una realización de la invención, el soporte plano en el que se fabrican las supermatrices de nichos es modificado química o físicamente con el fin de reducir al mínimo la adhesión celular a las áreas de soporte externas y por debajo del área en la que están presentes las estructuras 3D. En una realización preferida, el soporte de cultivo plano está recubierto con un agente que reduce la humectabilidad de la superficie de cultivo de células, por ejemplo por un agente antiincrustante, tal como un perfluoropolíeter.

Opcionalmente, las supermatrices de acuerdo con la invención están rodeados por una corona circular de polidimetilsiloxano (PDMS) o un material equivalente caracterizado por una biocompatibilidad y estabilidad elevadas. El PDMS se produce a través de una técnica conocida en el sector al mezclar dos componentes diferentes: una base y un agente de reticulación en una relación en peso de 10:1, de manera tal que permita la polimerización. El PDMS obstruye tanto física como químicamente la adhesión de las células fuera del área en la que están presentes las estructuras 3D.

Opcionalmente, las paredes de los nichos de la supermatriz están funcionalizados con moléculas.

En una realización preferida, estas moléculas proporcionan una señal inductiva para el mantenimiento de la pluripotencia o facilitan la adhesión de las células a la estructura.

En una realización de la invención, cada nicho en la estructura puede recubrirse con sustancias o moléculas apropiadas, por ejemplo para el fin de modificar la respuesta de las células cultivadas. Por ejemplo, cada nicho puede ser recubierto con hidrogeles a base de ácido hialurónico y a base de gelatina con el fin de simular una elasticidad diferente en la matriz celular, según lo descrito en un artículo publicado por Nava y col., en 2015.

La supermatriz de acuerdo con la invención se fabrica usando la técnica conocida de polimerización láser con dos fotones.

En cuanto al uso de dicha técnica para producir nichos sintéticos, se puede hacer referencia a los siguientes trabajos: Raimondi MT, Eaton SM, Nava MM, Lagana M, Cerullo G, Osellame R. Two-photon laser polymerization: from fundamentals to biomedical application in tissue engineering and regenerative medicine. J Appl Biomater Funct Mater. 26 de junio de 2012; 10(1):55-65; Raimondi y col., 2013, y Raimondi y col., 2014, ambos anteriormente mencionados.

Los protocolos específicos para la producción de una supermatriz de acuerdo con la invención pueden variar sobre la base del tipo de célula que se cultiva. Un experto en el campo es capaz de definir tales especificaciones técnicas sobre la base de sus conocimientos generales en el campo.

Por ejemplo, en relación con el cultivo de células madre mesenquimales, se puede hacer referencia al trabajo publicado por Raimondi y col., en 2013.

Una realización a modo de ejemplo del procedimiento para obtener una supermatriz de acuerdo con la invención se

describe a continuación.

El material usado para la producción es una resina. Preferentemente, es una resina fotopolimerizable. Dicha resina es normalmente un material fotosensible híbrido orgánico/inorgánico que se polimeriza cuando es iluminado por láser. En este sentido, se puede hacer referencia, por ejemplo, a un artículo de Raimondi MT, Eaton SM, Nava MM, Lagana M, Cerullo G, Osellame R. Two-photon laser polymerization: from fundamentals to biomedical application in tissue engineering and regenerative medicine. J Appl Biomater Funct Mater. 26 de junio de 2012; 10(1):55-65.

Preferentemente, la resina es una resina fotopolimerizable conocida como SZ2080. Esta resina es conocida (Ovsianikov A, Viertl J, Chichkov B, Oubaha M, MacCraith B, Sakellari I, y col., Ultra-low shrinkage hybrid photosensitive material for two-photon polymerization micro-fabrication. ACS Nano 2008;2:2257-62) y ha sido desarrollada recientemente. Su uso es preferible gracias a sus buenas cualidades ópticas y estabilidad mecánica. Los dos componentes principales de SZ2080 son metacriloloxipropiltrimetoxisilano (MAPTMS) y propóxido de zirconio (ZPO). El índice de refracción de resina puede modificarse al variar la relación molar entre estos dos componentes, y aumenta proporcionalmente con el aumento de ZPO.

El procedimiento de producción de supermatrices comprende tres fases principales: cocción, escritura por láser, y desarrollo.

Durante la fase de cocción, las muestras se preparan por endurecimiento de la resina anteriormente mencionada.

Un fotoiniciador ha de incorporarse en la resina para permitir la absorción con dos fotones. Un fotoiniciador preferido es IRG (Irgacure 369, 2-bencil-2- dimetil-1-(4-morfolinofenil)-butanona-1), el cual no es citotóxico. Otro posible fotoiniciador es BIS (4-4'bis(dietilamina)benzofenona).

Las propiedades químicas específicas tanto de la resina como la geometría de las construcción que soporta la supermatriz han de tomarse en consideración.

La solución de resina y fotoiniciador se deposita por colada por goteo, por ejemplo, en un volumen que varía de 30 a 50 µl, en el soporte sobre el que se ha de obtener la supermatriz, tal como un cubreobjetos, por ejemplo, o directamente en el interior de placas de cultivo de múltiples pocillos en las que se sembrarán las células.

La muestra se coloca después en una placa. Este procedimiento (cocción) es necesario para la solidificación de la resina en el sustrato de vidrio y para asegurar que los disolventes en el que se disuelve se evaporan. De esta manera, su consistencia cambia de líquido a semisólido.

La muestra se somete acto seguido al procedimiento de escritura.

La muestra se coloca generalmente en una cámara de carcasa especial conectado a un sistema de movimiento compuesto por un transductor de posición piezoeléctrico controlado por software.

Se usa un sistema de láser pulsado ultracorto para escribir. Cualquier láser usado habitualmente en la técnica 2PP puede ser usado. Por ejemplo, se puede hacer referencia a Raimondi y col., 2013.

Por ejemplo, puede usarse un láser disponible comercialmente, tal como el modelo Femtoregen producido por HighQ Company, un modelo basado en un oscilador con iterbio (Yb) con bloqueo de modo seguido de un amplificador.

El láser tiene normalmente una duración de pulso en el intervalo de 10 fs y 10 ps, y una longitud de onda en el intervalo de 400 y 1300 nm.

Preferentemente, el láser es usado a una potencia en el intervalo de 12 y 21 mW y con una velocidad de escritura de 1000 µm/s.

Las etapas que permiten la traslación de la muestra montada en un portamuestras que está conectado sólidamente con el sistema de movimiento 3D se usan para permitir que se escriban geometrías complejas en la resina.

Los comandos de movimiento son dados por el software a través del código G, un lenguaje de uso común en máquinas mecánicas numéricamente controladas.

En una realización de la presente invención, el programa informático está escrito de tal manera que llena el área superficial circular definida en los parámetros con todas las varillas, primero; a continuación, se escriben todas las estructuras cristalinas en los diferentes niveles, primero en una dirección y luego en la otra antes de terminar el procedimiento con las paredes de confinamiento que encierran cada estructura individual. La supermatriz se obtiene mediante la programación del software de tal manera que se escriban una serie de matrices de nichos, con la limitación de la escritura únicamente en el interior de un cuarto de círculo, y luego repetirlo en las cuatro direcciones con el fin de completar la superficie. Véanse las Figuras 11.3 y 11.4, por ejemplo.

El movimiento de la muestra en comparación con la del haz de láser puede programarse usando un diseño asistido por ordenador (DAO)/ sistema de mecanizado asistido por ordenador (MAO) o la unión y el uso integrado de sistemas

informáticos para, DAO, y MAO.

Cada componente del sistema puede ser gestionado por ordenador personal (OP).

Un experto en la materia es capaz de compilar los diversos software que permiten establecer la escritura por láser de acuerdo con la fabricación deseada y el conocimiento general en el campo.

- 5 Tras la fase de escritura, la muestra se somete a la fase de desarrollo, es decir, a la eliminación de la fracción de resina no polimerizada.

El desarrollo tiene lugar normalmente al sumergir la muestra en una solución de desarrollo seleccionada sobre la base de la resina fotosensible usada. Por ejemplo, una solución de isopropanol y pentanona 50:50 puede usarse durante aproximadamente 10-15 minutos (la duración depende de la cantidad de material usado y de la complejidad de las estructuras creadas).

10

El soporte así obtenido puede usarse para el cultivo celular.

Antes de su uso, se esterilizan preferentemente usando procedimientos conocidos en el sector; véase, por ejemplo, Raimondi y col., 2014.

15

La siembra del soporte con las células a cultivar puede llevarse a cabo usando técnicas conocidas en el sector. A partir de la base de este conocimiento general, un experto en la materia es capaz de ajustar la temporización y los demás parámetros para el cultivo celular.

Por ejemplo, para el cultivo de células madre mesenquimales, se puede hacer referencia a Raimondi y col., 2013.

La supermatriz de acuerdo con la invención se puede usar ventajosamente en un sistema de cultivo celular a gran escala con amplias aplicaciones industriales y comerciales.

20

Preferentemente, dicha supermatriz es usada para recubrir el fondo de un pocillo de cultivo, dicho pocillo es parte, por ejemplo, de una placa de cultivo de mono- o multipocillos.

Una realización a modo de ejemplo de una placa de cultivo multipocillos cuyo fondo está recubierto con supermatrices de nichos sintéticos de acuerdo con la invención se representa en la figura 12.

25

Opcionalmente, la superficie de la placa de cultivo se puede funcionalizar con moléculas adecuadas antes de ser recubiertas con las supermatrices. Por ejemplo, puede modificarse química o físicamente con el fin de minimizar la adhesión celular a las áreas de soporte externas y por debajo del área en las que están presentes las estructuras 3D. En una realización preferida, la placa de cultivo está recubierta con un agente que reduce la humectabilidad de la superficie de cultivo de células, por ejemplo está recubierta con un agente antiincrustante tal como perfluoropoliéter.

30

Los soportes que contienen las supermatrices de acuerdo con la invención se pueden usar para cualquier tipo de cultivo celular que requiere una estructura tridimensional con el fin de aumentar el volumen ocupado por las células.

En una realización preferida, los soportes que contienen las supermatrices de acuerdo con la invención se usan para el cultivo de células madre.

Dichas células madre pueden ser multipotentes o pluripotentes.

35

De manera más particular, estas pueden ser células pluripotentes, tales como las células madre embrionarias o células pluripotentes inducidas, es decir, células somáticas adultas que son fabricadas hasta regresión con respecto a las células madre pluripotentes a través de técnicas de modificación por ingeniería genética.

Preferentemente, estas son células madre adultas, es decir, células madre que están presentes en los adultos humanos. Las células madre adultas pueden extraerse de diferentes tipos de tejido de organismo adulto, tal como cordón umbilical, bolsa amniótica, sangre, médula ósea, placenta, y tejido adiposo.

40

El uso de supermatrices de acuerdo con la invención para el cultivo de células madre mesenquimales es particularmente preferente. Estas pueden extraerse, por ejemplo, de la médula ósea o de otras partes del cuerpo, tales como el cordón umbilical o tejido adiposo, de voluntarios donantes adultos.

Cualquier soporte de cultivo celular que comprende la supermatriz descrita en el presente documento está dentro del ámbito de la presente invención.

45

Las células cultivadas en las supermatrices de la invención pueden ser usadas a gran escala en la medicina regenerativa o para la producción de tejidos a implantar *in vivo*.

Asimismo, pueden usarse como un producto terapéutico para modular la inflamación en enfermedades degenerativas o para evitar el rechazo inmunitario en un trasplante de órganos.

Por ejemplo, una vez que se ha obtenido un número crítico de células, pueden fabricarse para diferenciarse o mantenerse indiferenciadas, según lo requerido por la necesidad terapéutica, y luego se inyectan a un paciente para tratar las enfermedades actualmente incurables, tales como enfermedad de Parkinson, por ejemplo.

5 También, los elementos secretadas por dichas células cultivadas, que son conocidos como "secretomas", pueden usarse como productos terapéuticos, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades degenerativas.

Por ejemplo, el número crítico de células mencionadas anteriormente puede suspenderse en un cultivo con el fin de producir una gran cantidad de "secretomas" que pueden inyectarse en pacientes de forma repetitiva, por ejemplo para reducir la respuesta inflamatoria en las enfermedades degenerativas como la enfermedad de Crohn, artrosis, artritis reumatoide y enfermedad de Alzheimer.

10 Las supermatrices de acuerdo con la invención también son útiles como herramientas de laboratorio y en investigación biológica a gran escala gracias a la posibilidad de cultivar un número elevado de células madre que se van a mantener indiferenciadas para su uso en un sustrato para análisis celular.

15 Por último, las supermatrices de acuerdo con la invención también pueden usarse como soportes 3D que se implantarán *in vivo* en un sujeto con el fin de promover la regeneración de tejidos o un órgano a través de las repoblación celular y microvascular. Esto puede llevarse a cabo usando procedimiento habitualmente conocidos en el campo.

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: microfabricación de la matriz nichoide para células madre

20 *Materiales y procedimientos*

Una resina fotorresistente SZ2080 con el fotoiniciador Irg seleccionado por su autofluorescencia reducida en gran medida, se usó para fabricar los nichos por medio de 2PP. Con el fin de preparar la muestra antes de la escritura, la cocción tuvo que ser realizada con el fin de solidificar la resina fotorresistente (a 105 °C durante 1 hora). El montaje experimental usado para la fabricación incluía: un láser de femtosegundo de escritura basada en Yb, un obturador mecánico, un control de potencia, y una lente objetivo. Los pulsos del láser de femtosegundo pasan primero a través del control de potencia que consiste en una placa birrefringente seguido de un polarizador lineal. Los pulsos se concentraron después usando una lente objetivo en el interior de la resina fotorresistente, y la posición de la muestra en comparación con la del haz se desplazó con el uso de una etapa de movimiento de 3 ejes controlada por ordenador.

30 Con el fin de estudiar el efecto de los nichos sobre el destino de las células madre, primero un 10 % y luego hasta un 88 % de una superficie circular (véase la Figura 7 y la Figura 8, respectivamente) se recubrió con nichos.

El programa informático para la fabricación de nichos se escribió en código G con el fin de rellenar la superficie circular definida en los parámetros con la totalidad de las varillas primero (Figura 11.1) y luego la totalidad de las estructuras cristalinas en los diferentes niveles, primero en una dirección y luego en la otra (Figura 11.2) antes de terminar el procedimiento con las paredes de confinamiento que encierran cada estructura individual.

35 La supermatriz nichoide fue fabricada mediante la programación de una serie de nichos, con la limitación de la escritura únicamente en el interior de un cuarto de círculo (Figura 11.3), y luego repetirlo en las cuatro direcciones con el fin de completar el cubreobjetos (Figura 11.4).

40 Tras la escritura por láser, las muestras se sumergieron en una solución 50:50 de isopropanol y pentanona de tal manera como para eliminar la parte no polimerizada de la resina fotorresistente. Los nichos se observaron a través del microscopio óptico y MEB y luego se rodearon con una corona circular de polidimetilsiloxano (PDMS) con el fin de obtener una superficie no ensuciada para las células alrededor del área circular recubierta con nichos. La corona circular no es esencial para la fabricación de la supermatriz de acuerdo con la invención.

45 Los análisis biológicos y funcionales se realizaron a través de una serie de pruebas convencionales (ensayos clonogénicos, función celular, y de inmunofluorescencia) con el fin de someter a ensayo el mantenimiento de la pluripotencia de las CMM.

Validación biológica de nichos individuales usando CMM humanas

50 Se llevaron a cabo estudios sobre CMM derivadas de médula ósea humana (MOh) cultivada en el sustrato de nicho sintético. La morfología, proliferación, y clonogenicidad de las células cultivadas en los nichos se analizaron con el fin de demostrar el mantenimiento de la multipotencia en comparación con ambas células cultivadas en estructuras de control (sustratos de vidrio planos) y con células aisladas y criopreservadas del pase 0 al momento de uso (células P0).

Por último, con el fin de verificar el mantenimiento de la multipotencia, después de 3 semanas de cultivo, la

inmunofluorescencia para el marcador CD146, uno de los posibles marcadores de multipotencia, se analizó usando clasificación celular activada por fluorescencia (CCAF). La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se usó para analizar la expresión de un grupo de genes implicados en el compromiso osteogénico de CMM, que es el destino espontáneo de CMM-MOH *in vitro* (P-C. Tseng, T-H. Young, T.-M. Wang, H-W. Peng, S-M. Hou, y M-L. Yen. Spontaneous osteogenesis of MSC cultured on 3D microcarriers through alteration of cytoskeletal tension. Biomaterials, 33(2):556-564, 2012).

Aislamiento celular y protocolo de cultivo

La médula ósea fue extraída a partir de 2 donantes sanos de 18 y 65 años respectivamente durante los procedimientos de cirugía ortopédica rutinarios con el consentimiento de las juntas éticas locales (Hospital de la Universidad de Basilea) después de obtener el consentimiento informado de los donantes. Es aspirado de médula ósea se depositó en un matraz convencional y se cultivó durante una semana en α -MEM con la adición de 20 % de SBF, 1 % de piruvato de sodio, 1 % de PSG (penicilina G y 0,1 mg/ml de estreptomycin) y 1 % de HEPES. El medio de cultivo se cambió regularmente dos veces a la semana hasta confluencia. Las CMM se recuperaron de la médula ósea aprovechando su tendencia a adherirse firmemente a las placas de cultivo, mientras que se eliminaron las otras células no adherentes. Las células adherentes se desprendieron con tripsina-EDTA (0,5-0,2 g/l; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), se contaron, y criopreservaron en α -MEM suplementado con 30 % de SBF y 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) hasta su uso. Los cubreobjetos con patrones de 2PP (haciendo referencia en lo sucesivo simplemente como muestra 2PP) se lavaron a fondo, se mantuvieron 12 horas en agua desionizada, se desinfectaron durante 12 horas en etanol al 7 %, se lavaron varias veces en agua desionizada estéril, y luego se esterilizaron en UV. Cada muestra se colocó en una placa de cultivo celular de 24 pocillos de fijación ultrabaja (costar 3473, Corning, Corning, NY, Estados Unidos de América). Las células criopreservadas se reanimaron, se suspendieron en medio completo y se sembraron directamente en los pocillos con una densidad de 10.000 células/cm². Las células se incubaron durante 21 días con medio recién reemplazado dos veces a la semana.

En cuanto al análisis biológico, después de 3 semanas de cultivo, las células se separaron usando tripsina-EDTA y se contaron con el fin de llevar a cabo el análisis a continuación.

Análisis biológico, inmunofluorescencia, y RT-PCR

El análisis morfológico se llevó a cabo bajo un microscopio convencional (IX50, Olympus, Tokio, Japón) equipado con una cámara de vídeo de alta resolución enfriada. Para evaluar la clonogenicidad (la capacidad de las células para formar colonias), después de tres semanas de cultivo en las estructuras 2PP de muestra, las células se separaron, se contaron, y se volvieron a sembrar por triplicado en placas de Petri. En cada placa, 600 células se cultivaron en medio completo cambiado dos veces por semana. Después de 2 semanas de cultivo, las células se lavaron en PBS, se fijaron con 3,7 % de paraformaldehído en PBS y se tiñeron con violeta cristal durante 10 minutos. El tinte se recogió y las placas se lavaron con agua y se dejaron secar. La capacidad de la clonogenicidad se calculó como el porcentaje entre el número de colonias contadas manualmente y el número de células sembradas. El número de células clonogénicas (es decir, las células capaces de formar colonias (UFC), se calculó como el producto del número total de células triptinizadas después de 3 semanas de cultivo y el porcentaje de capacidad de clonogenicidad.

Con el fin de realizar PCR en tiempo real, el ARN total fue extraído de las células usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), tratado con ADN-asi y transcrito inversamente en ADNc según el procedimiento convencional. La PCR en tiempo real se realizó usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 77000 (Perkin Elmer / Applied Biosystem, Rotkreuz, Suiza), y los niveles de expresión de los genes de interés RUNX2, sialoproteína ósea (SPO) y PPAR-gamma se normalizaron para la GAPDH como gen de referencia. Este gen es, de hecho, aquel que se transcribe y traduce activamente a un nivel relativamente alto.

Para el análisis por CCAF, las células cultivadas en las estructuras 2PP de muestra durante tres semanas se resuspendieron en 200 μ l de BSA al 0,5 % en PBS (tampón CCAF) con anticuerpos unidos con fluorocromos para la proteína en cuestión. Los anticuerpos se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Los anticuerpos usados fueron CD146-PE e IgG1-PE (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Todos los anticuerpos fueron usados con una dilución 1:50. Las células se lavaron 2 veces con tampón CCFA, se volvieron a suspender en PBS, y se analizaron por CCFA (Becton, Dickinson and Company).

Para llevar a cabo el análisis de fluorescencia y el examen por microscopio confocal, las células se fijaron en paraformaldehído al 2 %, se permeabilizaron con 0,2 % de tritón, se bloquearon con 2 % de soroalbúmina de cabra (SAC) en PBS, y se marcaron por fluorescencia. El ADN se tiñó por incubación con 4',6'-diamidino-2-fenilindolhidrocloruro (DAPI) en solución a 10 μ g/ml. Un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 566 nm) se usó para identificar la integrina de la membrana CD146.

La adquisición de imágenes y reconstrucción en 3D se realizaron a 20 x y 60 x usando un microscopio láser confocal (Nikon A1R, Japón).

Los ensayos adipogénicos se llevaron a cabo usando un protocolo convencional (A. Barbero, S. Ploegert, M. Heberer, e I. Martin. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. Arthritis Rheum, 48(5):1315-1325, 2003).

Asimismo, los ensayos osteogénicos se llevaron a cabo usando el protocolo convencional descrito en la literatura (N. Jaiswal, S.E. Haynesworth, A.I. Caplan, y S.P. Bruder. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. J Cell Biochem, 64(2):295-312, 1997).

Resultados

5 Resultados de fabricación

Se fue capaz de confirmar que la mejor configuración posible para recubrir la superficie circular de cubreobjetos con nichos individuales colocados a distancias regulares uno de otro es aquella que conduce a la obtención de un patrón hexagonal.

10 Después de desarrollar un procedimiento que permite la fabricación de nichos artificiales, el área eficazmente ocupada por los nichos en relación con el área total sembrada se verificó cuantitativamente. Un análisis geométrico mostró que el área cubierta por nichos espaciados 300 μm era solo del 10 %, mientras que el área aumentó dramáticamente cuando los nichos se espaciaron solamente 200 μm o incluso 100 μm .

15 Un intento de eliminar completamente la distancia entre un nicho individual y otro se realizó creando una única matriz de nichos, en la que el mismo tipo de nicho se repitió pero con paredes compartidas, y por lo tanto, muchos más nichos llenaron todo el cubreobjetos. Hasta 1484 nichos se fabricaron en una matriz con un radio de 2 mm (M2) y 3396 nichos en una matriz con un radio de 3 mm (M3). De esta manera, hasta el 97 % del área disponible puede ser cubierta (no 100 %, debido a que el círculo perfecto no se dibuja y una configuración graduada permanece en los bordes).

20 Desafortunadamente, no todos los nichos eran aceptables puesto que por diversas razones tienden a deteriorarse durante la fase de desarrollo de fabricación, se caen por su propio peso, se separan, o simplemente no mantienen la geometría lineal estable que se le es impuesto por el software.

Las matrices M2 y M3 presentan el problema de la contracción del polímero durante la expansión (Figura 9), que causó el estrés mecánico y la deformación, que dio la razón para dividir la estructura en matrices más pequeñas (por ejemplo de 450 μm de lado, espaciadas 20 μm). Las dimensiones excesivas de la superficie cubierta por las estructuras corrían el riesgo de dañar ciertas partes del nicho, con repercusiones en todo el resto de la estructura.

25 Al separar la matriz más grande en matrices más pequeñas, en su lugar, la ligera contracción del polímero no arruinar toda la estructura y además tal contracción no se añade a la contracción en las áreas adyacentes. Esto llevó a la necesidad de crear un supermatriz fabricada de matrices más pequeñas de nichos sintéticos, capaz de proporcionar estructuras tridimensionales eficazmente más sólidas y estables sin deformación y en la que los tres niveles apilados de los nichos estaban presentes (Figura 5A-B). Esta conformación es la única que proporcionó nichos artificiales repetibles para la mayoría de las estructuras de muestra desarrolladas.

30 El intento de ampliar el área superficial recubierta al 100 % de los cubreobjetos se abandonó debido a que las dimensiones excesivas de las estructuras fabricadas causaron la contracción del polímero con deformación estructural e inestabilidad como resultado.

Resultados del cultivo de CMM en nichos individuales a escala

35 Uno de los hallazgos más significativos de análisis biológico es que no se observó formación alguna de agregados entre nichos. La densidad celular media fue estadísticamente superior en el 67 % de los nichos que en las superficies de vidrio.

40 Tras haber establecido las dimensiones y haber obtenido los nichos estructuralmente estables, la vitalidad y la adhesión de las células a sus interiores puede analizarse y su proliferación, diferenciación y migración pueden observarse. Los estudios anteriores habían notificado que durante la fase de proliferación, las células se concentran en mayor número en las áreas centrales de las colonias, y en particular, en el volumen interior de los nichos y en sus paredes externas. La morfología de las CMM humanas derivadas de médula ósea cultivadas en estructuras de muestra obtenidas por una técnica 2PP se evaluó sobre la base de estos resultados previos.

45 Se observó que las células madre cultivadas en nichos proliferan en la superficie plana del vidrio que les rodea y dentro de la misma. A diferencia de lo observado en el interior de los nichos, no se observó formación alguna de agregados celulares en los vidrios circundantes.

Después de 3 semanas de cultivo, las células se contaron para cada condición de cultivo ensayada.

Es posible afirmar que los nichos proporcionan células madre con un aumento en la relación del área superficial/volumen que favorece su adherencia y ofrecen mucho más espacio para la proliferación.

50 Por este motivo, el sistema de nichos sintéticos es capaz de guiar la formación de agregados incluso con células CMM-MOh. Esta tendencia espontánea para formar agregados no es específica de la especie. Las diferencias en los valores de densidad celular, por el contrario, pueden en su lugar ser específico de la especie.

Los ensayos clonogénicos se realizaron en células cultivadas tanto en estructuras de muestra por 2PP y en muestras de sustrato de vidrio. Incluso si no se observó significación estadística, hubo un mayor número promedio de células mantenidas clonogénico en muestras 2PP que sobre en vidrio. En comparación con las células cultivadas en sustratos de vidrio, las células expandidas en sustratos de 2PP mostraron un diámetro de colonia significativamente mayor, lo cual supone un índice del potencial clonogénico.

Después del acondicionamiento del medio en células cultivadas por 2PP, la expresión de los genes RUNX2 y SPO, así como PPAR-gamma, fue significativamente superior que la medida en los controles de vidrio.

En conclusión, las CMM humanas expandidas en el sustrato de nicho sintético mantuvieron su potencial proliferativo, capacidad clonogénica y potencial de diferenciación de bilinaje de manera más eficaz que las células expandidas sobre sustratos de vidrio y en algunos aspectos eran comparables a las células no expandidas.

Conclusiones

La extensión de la superficie de cultivo cubierta por nichos individuales al 10 % de la superficie de cultivo resultó ser de importancia fundamental para conseguir un mayor número de células para los análisis, aunque la contribución de las áreas sin nichos condicionados los resultados experimentales. Se puede afirmar que los nichos pueden guiar la formación de agregados mientras se mantiene un potencial proliferativo y multipotencia de CMM más eficaz que las superficies 2D.

Por lo tanto, los nichos, y de una manera particularmente ventajosa, el sustrato extendido, puede ser usado para el cultivo y la expansión de CMM indiferenciadas.

Una vez que se ha obtenido un número crítico de células, pueden acondicionarse para diferenciarse o mantenerse indiferenciadas como es requerido por las necesidades de tratamiento, y luego inyectarse a un paciente para tratar las enfermedades actualmente incurables, tales como enfermedad de Parkinson, por ejemplo.

El sustrato de nicho artificial permite una reducción de los efectos de las superficies 2D que afecta a los resultados biológicos. Esto demuestra que la geometría 3D y la consiguiente procedimiento de adhesión celular es una fuente importante de estimulación, tal vez la más importante, en la determinación del mantenimiento de la multipotencia de CMM.

Ejemplo 2

CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DE LA SUPERMATRIZ NICHODE EN LA PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS SIN ACONDICIONAMIENTO QUÍMICO

Materiales y procedimientos

Células

Los experimentos sobre la supermatriz nichode se llevaron a cabo usando células madre embrionarias murinas (cMEM). Al no ser dependientes a la adhesión, estas células son altamente clonogénicas y se caracterizan por su tamaño reducido (10 μm de diámetro) causado por una región citoplasmática limitada, por lo que promueven de esta manera un retorno perfecto en el interior de los nichos artificiales. Las cMEM usadas forman parte de la línea R1 y se obtuvieron de Nagy Lab en el Instituto del Monte Sinaí, Toronto, Canadá. Los cultivos de células *in vitro* se mantuvieron en una incubadora de atmósfera controlada a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. El medio de cultivo se compone de la siguiente manera: DMEM (Gibco, 11960), 10 % de SBF descomplementado (Gibco, 16141), 1 % de L-glutamina (Invitrogen, 25030024), 1 % de aminoácidos no esenciales (Invitrogen, 11140035), 1 % de piruvato de sodio (Gibco, 11360), 1 % de penicilina-estreptomina (Invitrogen, 15140122), 0,1 % de β -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma M7522) y 1000 U/ml LIF (Millipore, ESG1107). El mantenimiento de la línea fue promovido por la presencia de células alimentadoras: en este caso, se usaron fibroblastos de embriones de ratón CD1 primarios después de haber sido tratados en p3 con mitomicina-C (Roche, 10107409001), un agente alquilante que induce la formación de una reticulación en el nivel de ADN, al evitar de esta manera evitar la duplicación y, por lo tanto, la proliferación celular. Este tratamiento es esencial a fin de permitir un control preciso de la densidad de estas células en cultivo. La expansión de los fibroblastos embrionarios de ratón (FER) hasta p3 se llevó a cabo en un medio específico compuesto de DMEM, 10 % de SBF, 1 % de penicilina-estreptomina y 1 % de aminoácidos no esenciales. Tras haber sido aislados del animal y tratados con mitomicina, se sembraron en placas de matraces (Corning, USA) y se pretrataron con 0,1 % de gelatina porcina con una densidad que varía de entre 6,5-10,5 $\cdot 10^3$ células/cm². En términos generales, si la línea es estable, las cMEM se siembran en MEF con una densidad de 26,5 $\cdot 10^3$ células/cm² (o más simplemente, dos millones en un T75). El medio se cambió cada dos días hasta que se alcanzó la confluencia. El procedimiento de separación consistió en una fase de incubación inicial con tripsina (0,05 % en medio R1) a 37 °C durante 3 minutos, una segunda etapa de centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos, y por último, la resuspensión del sedimento en medio completo R1 (R1+LIF) seguido de nueva siembra en matraces en presencia de MEF. La crioconservación se realizó con DMSO (dimetilsulfóxido), que sirve como un agente anticristalizante, y el posterior almacenamiento en atmósfera de nitrógeno líquido a temperaturas que nunca debería exceder de los -140 °C. El medio de crioconservación se compuso del 10 % de DMSO, 10 % de SBF, y 80 % de medio R1 completo con la adición de LIF. Todas las operaciones de manipulación

de cultivos descrito hasta ahora deben ser realizadas bajo una campana de cultivo de tejidos (Jupiter, Cell Bio): un flujo constante de aire en el intervalo de 545-550 m³/h permite llevar a cabo operaciones en condiciones estériles. La esterilidad se garantiza por un filtro HEPA colocado corriente abajo del flujo de entrada diseñado para retener el 99,97 % de las partículas con más de 0,3 µm de diámetro.

5 Nichos artificiales

En comparación con los experimentos realizados por Raimondi y col., (2013 e 2014) que presentan nichos individuales distribuidos espacialmente de forma diferente en los patrones hexagonales, la configuración se ha modificado con el fin de obtener una densidad mayor de superficie de nichos. Se produjeron dos nuevos conjuntos de nichos: la primera generación tenía una matriz continua de nichos sintéticos producidos por el emparejamiento de nichos individuales que cubría totalmente una región circular de 6 mm de diámetro. Esta región fue rodeada por una corona de polímero PDMS que permite la maximización del área cubierta por los nichos en comparación con la superficie bidimensional del sustrato de vidrio, permitiendo de esta manera la cobertura del 96 % de la superficie total (véase la Figura 4A). Estas muestras presentan muy a menudo varios daños debido a la contracción del material, que deforma la estructura, y con respecto a la cavitación, que da lugar a la formación de burbujas y la consiguiente ruptura de la matriz (véase la Figura 4B-C). La dificultad en la obtención de matrices definidas, uniformes e intactas dio lugar a la producción de la segunda generación de conjunto de nichos.

Tras la primera generación, con el fin de reducir la tensión residual que determina reducción volumétrica durante la expansión, se decidió reducir el área superficial escrita por láser de 96 % a 88 % de la superficie cubierta usando una nueva configuración de supermatriz fabricada de múltiples matrices más pequeñas de 5x5 nichos. Manteniendo la configuración 2PP inalterada, se observó que esta solución era suficiente para obtener una supermatriz prácticamente perfecta. Es más, la segunda generación permitió una reducción en el tiempo requerido para obtener las muestras: 14 horas frente a las 17 horas requeridas por el primero.

Estructura de controles 2D

La muestra bidimensional es la estructura de control negativo adoptada en nuestro experimento, lo que significa que en esta condición particular se esperó que las células perdieran por completo su capacidad de autorrenovación y generación de la expresión de los genes característicos del fenotipo diferenciado. El vidrio se seleccionó para la estructura de control 2D. Para duplicar la misma condición que la de la muestra nichoide, la estructura de control también tenía una corona de PDMS. La corona se obtiene mediante el vertido de la solución de base y de reticulación (10:1) en un molde de metal que se inserta en un horno durante la etapa de cocción llevada a cabo a 80 °C durante 30-45 minutos como es requerido por la dureza que ha de darse a la corona. El tratamiento de aire-plasma se lleva a cabo bajo una campana de cultivo de tejidos, con un ionizador con el fin de exponer y cargar los grupos hidroxilo (-OH), que, de este modo, son capaces de unirse entre sí por enlaces iónicos con el átomo de silicio en grupos siloxano del vidrio.

Esterilización y siembra

El mismo procedimiento de esterilización se usó para esterilizar los nichos y las estructuras de control 2D, e incluso si es más bien simple, se requiere que se realice un tiempo bastante prolongado de dos días. Se usó un procedimiento más corto que el procedimiento adoptado por Raimondi y col. (2014). Las muestras se colocaron inicialmente en placas de cultivo de 24 pocillos con baja adherencia de tal manera que las células fueran capaces de adherirse solo cuando estaba presente el nichoide o el cristal de la estructura de control 2D. El procedimiento comenzó con 4 lavados en agua desionizada con una duración de 5 minutos: se recomienda humedecer los pocillos antes de comenzar las operaciones de esterilización debido a las muestras de pocillos de baja adhesión exhibieron una marcada tendencia a flotar. Este procedimiento continuó durante 1,5 horas en una solución de etanol al 70 % con 4 lavados con una duración de 5 minutos en D-PBS al 1 % (Gibco, 14200-067) + penicilina-estreptomicina (Pen-Estrep). En ese momento, se realizó un acondicionamiento con un medio completo R1, y las muestras se dejaron en una campana de cultivo de tejido durante la noche con una lámpara de UV encendida. El día después de la exposición a UV, las muestras estaban listas para ser sembradas: la siembra se realizó con una densidad de 10.000 células/cm². Todas las operaciones se realizaron en condiciones estériles.

Caracterización de la expresión génica

Las muestras fijadas en los tres intervalos de tiempo de medición establecidos fueron examinadas por microscopía de fluorescencia. La proteína asociada con el gen fue reconocida a través de los anticuerpos primarios que se unieron directamente a la diana. La visualización bajo microscopía de fluorescencia fue permitida por un fluoróforo unido al anticuerpo secundario que poseía afinidad para el anticuerpo primario al que se une. Los marcadores de troncalidad y diferenciación se usaron acto seguido para la distinción.

Marcadores de troncalidad: Oct4 (factor de transcripción-4 de unión a octámero), este es el gen que caracteriza el estado de troncalidad en las cME.

Marcadores de diferenciación: Actinina de músculo liso (α-SMA); NKX2-5, proteína homeobox NKX2-5; GATA-4; SOX-17; βIII-Tubulina.

Marcadores de la matriz: Osteocalcina; Colágeno tipo I. Técnica de análisis microscópico

Las muestras se analizaron usando varias técnicas de microscopio en función de lo que iba a ser observado, el grado de detalle a alcanzar, y si el cultivo a examinar iba a mantenerse vivo o no. Los tipos de análisis microscópico adoptados fueron microscopía de contraste de fases, microscopía confocal, y microscopio electrónico de barrido (MEB).

Análisis estadístico

Se hicieron 15 fotos de medición en los intervalos de 3, 7 y 14 días por marcador y por muestra (la estructura de control 2D, la estructura nichoide, y la matriz de riñón) durante la fase de adquisición de imágenes por microscopía confocal. Los análisis estadísticos se realizaron en un solo experimento entre las diversas muestras disponibles para un marcador determinado.

Análisis morfológico

Además del análisis de fluorescencia y la respectiva cuantificación, también se llevaron a cabo las evaluaciones con respecto a las modificaciones morfológicas a las que los cultivos se sometieron durante las dos primeras semanas de mantenimiento *in vitro*. El primer tipo de cuantificación a este respecto es la medición de los diámetros de las colonias presentes en toda la muestra para todos los tres tipos de construcción.

Resultados

Evaluación morfológica

Análisis estructural de curso temporal

El grado al que el sustrato de adhesión puede influir drásticamente en el comportamiento celular y fabricar colonias asumiendo diferentes formas dependiendo del entorno circundante es bien conocido. El análisis morfológico-estructural llevado a cabo usando microscopía de contraste de fases y MEB llevó a la definición de cómo los sustratos en cuestión; la estructura de control 2D y nichoide; contribuyen de diversas maneras a la organización estructural de los cultivos celulares con el tiempo.

Estructura de control 2D

El vidrio no es el sustrato de cultivo ideal para este tipo de células; las pequeñas colonias, de hecho, claramente visibles con la microscopía de contraste de fases en el día 3 de cultivo, tienen formas esféricas con bordes claramente definidos, apenas irregulares indicativos del hecho de que las pocas células que permiten la adhesión son encontradas en la base de la colonia, que, sin embargo, prefieren un desarrollo vertical en lugar de horizontal. En torno al día 10 de cultivo, los cuerpos embrioides (Ces) alcanzan un tamaño que se caracteriza por una altura que varía de 40 a 60 μm con el que ya no se prefiere un desarrollo vertical. Alcanzar el tamaño crítico conduce a la pérdida de configuración redonda y la consecuente disgregación del CE: las células comienzan por lo tanto a colonizar el sustrato libre circundante y alcanzan la confluencia en el tiempo de 2-3 días. La interacción directa con el sustrato promueve un grado mucho más marcado y específico de diferenciación que el del crecimiento en la configuración de CE. La distribución de las células sobre la superficie durante el cultivo demuestra un tipo de comportamiento similar al de las colonias: inicialmente, estas están presentes en un número mucho mayor en la corona externa cerca de la corona de PDMS. Esto se debe principalmente al efecto de la corona durante la siembra: durante el llenado del pocillo en el que se coloca la muestra, de hecho, se produce un efecto de burbuja en el interior de la corona que empuja las células hacia la parte externa de la región de cultivo en la que se adhieren con eficacia; por este motivo, la región central está escasamente colonizada. La distribución en toda la superficie que permanece no homogénea hasta la difusión celular derivada de la disgregación del CE que lleva a confluencia.

Nichoïdes

El entorno de nicho tridimensional ejerce un efecto diferente en los cultivos que en la estructura de control 2D. Después de la siembra, las células se precipitan dentro del medio hasta alcanzar el nicho: algunas células caen directamente en los poros en el lado superior y se adaptan a la estructura 3D, haciendo uso de sus podios y protuberancias (véase la Figura 10), mientras que otras, en las que los poros son más pequeños, se detienen en el lado superior sin penetración.

Esto conduce a la creación de dos situaciones diferentes: las células en el interior del nicho proliferan, percibiendo un entorno 3D diseñado para mantener la troncalidad, mientras que las células crecen fuera en forma de CE como si estuvieran presentes en un sustrato 2D normal.

Observando el cultivo con microscopía de contraste de fases, estas dos situaciones son claramente distinguibles: las colonias en el interior del nicho tienen diámetros característicos comparables con el tamaño del propio nicho debido al efecto de contención que ejerce en cinco de las seis direcciones de desarrollo, mientras que las colonias fuera del nicho, que no experimentan ningún efecto limitativo, crecen hasta alcanzar el tamaño crítico. Esto último, cuando se observa en un curso temporal, puede verse moviéndose en el lado superior, variando su conformación e interactuando

con las otras células que se han adherido en el lado superior. Teniendo en cuenta estos aspectos, se decidió tomar en consideración durante el análisis de la expresión génica por microscopía confocal solamente las colonias dentro de los nichos caracterizados por un número limitado de células y reducidas dimensiones: solo estas células, de hecho, perciben el entorno 3D y serán capaces de mantener la pluripotencia.

- 5 Se observaron dos tipos adicionales de comportamiento. El primero depende del hecho de que la estructura ejerce un límite físico en cinco de sus seis caras y por lo tanto permite que las células proliferen y migren del lado superior, un evento que ocurre aproximadamente en el día 6 de cultivo: a partir del momento en que las células superen este límite, se comportan exactamente como se ha descrito anteriormente. El hecho es que una vez que se ha formado el CE, posee una cierta afinidad por las células en el nichoide y realiza una contribución parcial a su migración. El segundo tipo de comportamiento se refiere a los mismo CE: en este caso también, su desarrollo se detiene una vez que se ha alcanzado su dimensión crítica, hasta el punto en el que se disgregan. Las células que provienen del CE caen de nuevo en la estructura y repueblan los nichos.

- 10 Con el fin de evaluar la posible reutilización de los nichos que se acaban de limpiar, se decidió incluirlos en el experimento de fluorescencia junto con otros tipos de muestra. A tal fin, las estructuras de muestra se volvieron a esterilizar por procedimiento convencionales y luego se volvieron a sembrar. La estructura no sufrió modificaciones de ningún tipo en el segundo uso, lo que sugiere que cualquier daño presente ha de atribuirse única y exclusivamente al procedimiento productivo y no al cultivo celular.

Análisis de diámetro de las colonias

- 20 Debido a que no representa ningún obstáculo para el desarrollo de colonias, la estructura de control 2D promueve constantemente diámetros promedio mayores a los de las colonias en el nichoide con el tiempo. Es más, las dos configuraciones de nicho parecen afectar al crecimiento de la misma manera. Un aspecto importante es la relación entre el diámetro de colonias promedio y la dimensión característica del nicho. El hecho de que estas dos dimensiones siguen siendo similares es una importante indicación del hecho de que las colonias están eficazmente en el interior del nicho puesto que ejercen, como se ha mencionado previamente, un efecto de contención física: esto es innegablemente cierto para la medición realizada en el primer intervalo de tiempo. Después de aproximadamente 7 días, sin embargo, una parte de las colonias comienza a crecer más allá del área de contención de 90 μm , y después de 14 días, la formación de CE llega a ser predominante con el desarrollo de colonias por encima del lado superior del nicho.

Evaluación del marcador de troncalidad y diferenciación

- 30 El ajuste se llevó a cabo cultivando CME_m en cubreobjetos cuadrados de 18x18 mm que tienen las mismas características mecánicas y superficiales que el sustrato de vidrio de las estructuras de control 2D y los nichos.

Los marcadores definitivos usados fueron por lo tanto, OCT4, GATA4, NKX2-5, y αSMA . Los tres marcadores de diferenciación caracterizan las colonias de cardiomiocitos de diversas maneras.

Ej01: Nichoides de primera generación

- 35 En este primer experimento, se usaron nichoides de primera generación, en otras palabras, aquellos con superficies dentro de la corona de PDMS escrita y ocupada por completo por la estructura. También se sometieron a ensayo los nichos obtenida a través de tripsinización usada en una prueba anterior.

- 40 Se observó que marcador cardíaco NKX2-5 no se expresa en todas las condiciones de cultivo. En cuanto a los otros dos marcadores de diferenciación, la tendencia expresión resultó ser como se esperaba y ya se encuentra evaluada cualitativamente sobre el vidrio en la prueba de calibración. GATA4, de hecho, muestra la expresión de arriba-abajo-arriba clásica en la estructura de control 2D, y como ya se ha observado, presenta niveles altos en T0, mientras que αSMA aumenta en términos de área conforme continúa el cultivo. Los nichoides, en su lugar, demuestran tendencias muy diferentes para los dos marcadores, pero comparten la característica de reducción. A pesar de un nivel inicial de GATA4 comparable con el de la estructura de control, la expresión del gen en mediciones sucesivas se extinguió completamente en el nicho. Por lo que en su lugar respecta a αSMA , se demostró que el nicho disuadía tal expresión, incluso si en un cultivo del día 14 estaba presente en grado mínimo, pero mucho menor que en la estructura de control 2D, sin embargo. Un aspecto importante es que los resultados de los marcadores de diferenciación obtenidos con lo nichoides nuevos y reusados fueron comparables por completo, y esto significa que la estructura mantiene sus propiedades incluso cuando se vuelve a utilizar.

- 50 Después de analizar las tendencias de los marcadores de diferenciación, se estudió la influencia de los sustratos en la troncalidad celular. El resultado más importante se observó en el día 7 de cultivo: en el nivel de porcentaje de superposición entre los marcadores y DAPI y el nivel de intensidad media, de hecho, se observó que el nicho promovía niveles más altos de expresión de OCT4 que las otras dos estructuras de control en estudio. Esto confirma que la estructura 3D del nichoide es necesaria y suficiente (dado que no se proporcionó acondicionamiento químico) para mantener la pluripotencia. En el día 14 de cultivo, tal efecto ya no es debido al fenómeno de que la colonias han excedido el límite físico que determina la pérdida de la interacción con el entorno 3D controlado descrito anteriormente. En cuanto a los marcadores de diferenciación, nichos nuevos y reusados presentan resultados totalmente

comparables.

En conclusión, se demostró que el nicho promovía la pluripotencia más que las otras dos estructuras de control de dos mientras que también inhiben la diferenciación. La estructura de control 2D demostró los comportamientos esperados, al promover la expresión de GATA4, y sobre todo, α SMA, que se ubicó en los lados de las colonias en contacto con el vidrio, confirmando que la rigidez del sustrato es fundamental para su promoción.

Ej02: supermatriz nichoide

El mismo protocolo experimental se aplicó en el segundo experimento que implicaba el uso de la supermatriz de acuerdo con la invención (que comprende matrices de nichos distintos). Los resultados confirman lo del experimento anterior, con la ventaja fundamental de que permite una ampliación significativa del cultivo de células madre sin los problemas causados por la ruptura debida a la contracción e incluso una sorprendente estabilidad estructural.

Conclusiones

La imposibilidad de la técnica anterior para mantener las células madre adultas indiferenciadas en un cultivo prolongado pone un límite notable en su potencial de aplicación en el campo de la medicina regenerativa e ingeniería tisular. El grado al que los sustratos con estructuras tridimensionales definidas que imitan el microentorno nativo de los nichos de células madre promueven tanto el mantenimiento de la multipotencia de las células madre adultas en un cultivo prolongado y un estado de tensión isótropa ha sido demostrado recientemente. Uno de los resultados más relevantes (Ejemplo 1) se logró mediante la siembra de CMM en nichos de geometría controlada obtenidos mediante la técnica 2PP: se demostró que la densidad celular en el interior del nicho sintético era 67 % superior a la de la región externa, de hecho. Es más, las células contenidas dentro del mismo no expresaron marcadores de diferenciación, sugiriendo de esta manera que el nicho promueve un mantenimiento significativo de la troncalidad.

En otro experimento, se evaluó el efecto de los nichos sintéticos sobre una población celular más reactiva con mayor potencia la diferenciación que las CMM: células madre embrionarias murinas (cME_m). Con el fin de evaluar el efecto de nichos sintéticos en la pluripotencia y la diferenciación, se cultivaron dos sustratos distintos: los nichos y una estructura de control 2D (vidrio). A los cultivos se les dejó continuar durante 14 días sin ningún acondicionamiento químico (LIF). Los resultados muestran que el nicho promovió el mantenimiento de la pluripotencia con la expresión de OCT4 en un grado mucho mayor que la estructura de control presente, mientras que al mismo tiempo inhibía la diferenciación, caracterizado por los marcadores como GATA4, α SMA, y NKX2-5 que, en su lugar, fueron expresado en el control de vidrio. Esto demuestra también que el nicho sintético es capaz de ejercer un estado de tensión favorable para el mantenimiento de la pluripotencia de cME_m.

Incluso de manera más significativa, la supermatriz de acuerdo con la invención mantiene las mismas características del nicho individual, con la ventaja fundamental de ofrecer una superficie mucho más grande combinada con una estabilidad estructural elevada que aumenta de manera considerable la capacidad del cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Una supermatriz de nichos sintéticos que comprende al menos dos matrices de nichos sintéticos,
 en la que cada matriz comprende $n \times m$ nichos sintéticos, en la que n y m , idénticos o diferentes entre sí, tienen un valor ≥ 1 , a condición de que uno de m o n sea ≥ 2 y con un valor máximo de m y n que permite mantener la estructura del nicho sintético individual intacta de modo que la retracción del material no causa alteraciones significativas, y
 en la que la distancia (d) entre una matriz de nicho sintético y la otra es superior a cero y
 en la que, en cada matriz, cada nicho sintético tiene una o más paredes en común con el(los) otro(s) nicho(s) sintético(s) de la matriz.
2. La supermatriz según la reivindicación 1, en la que dicho valor máximo para n y m es 100.
3. La supermatriz según la reivindicación 1 o 2, en la que m y n tienen el mismo valor.
4. La supermatriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la altura de la supermatriz está comprendida entre 30 y 100 μm .
5. La supermatriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que está fabricada de una resina fotopolimerizable.
6. La supermatriz según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que las paredes de uno o más de dichos nichos sintéticos están cubiertas con moléculas que proporcionan una señal que induce un mantenimiento de la pluripotencia y/o con moléculas que facilitan la adhesión de las células al nicho.
7. Un soporte para el cultivo de células que comprende al menos una supermatriz de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. El soporte según la reivindicación 7 que está fabricado de vidrio o de un polímero.
9. El soporte según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que la superficie sobre la que se fabrican las supermatrices está recubierta con un agente que reduce la humectabilidad de dicha superficie, preferentemente un agente antiincrustante.
10. El soporte según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que es una placa de cultivo mono- o multipocillos o un matraz.
11. Una placa de cultivo multipocillos en la que el fondo de dicha placa está cubierto por una o más supermatrices de nichos sintéticos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
12. Uso de la supermatriz de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o del soporte de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10 para el cultivo *in vitro* de células.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que dichas células son células madre, preferentemente células madre multipotentes o pluripotentes.
14. Uso de la supermatriz de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o del soporte de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10 en el análisis de muestras celulares, en particular en el campo de diagnóstico.
15. La supermatriz de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso para un implante *in vivo* en un sujeto con el fin de promover la regeneración de un tejido o de un órgano mediante repoblación celular.

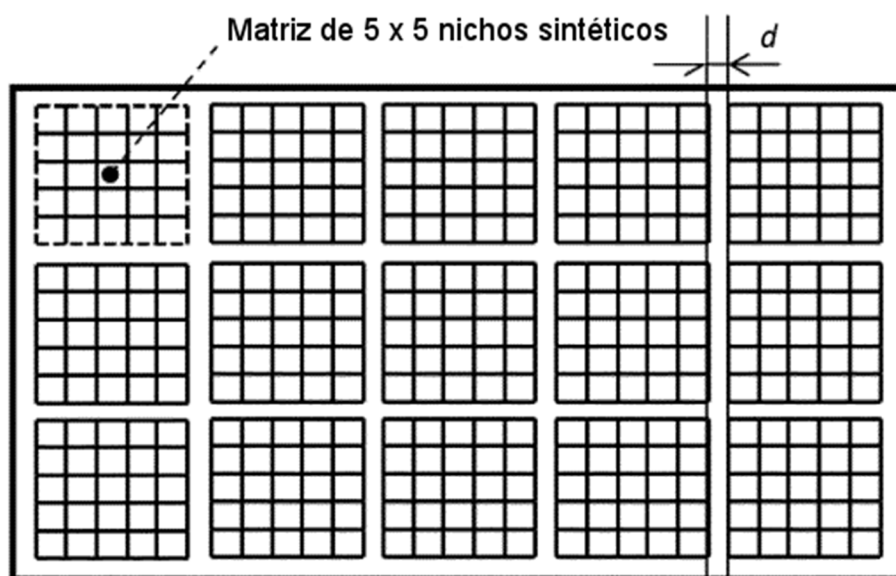


FIGURA 1

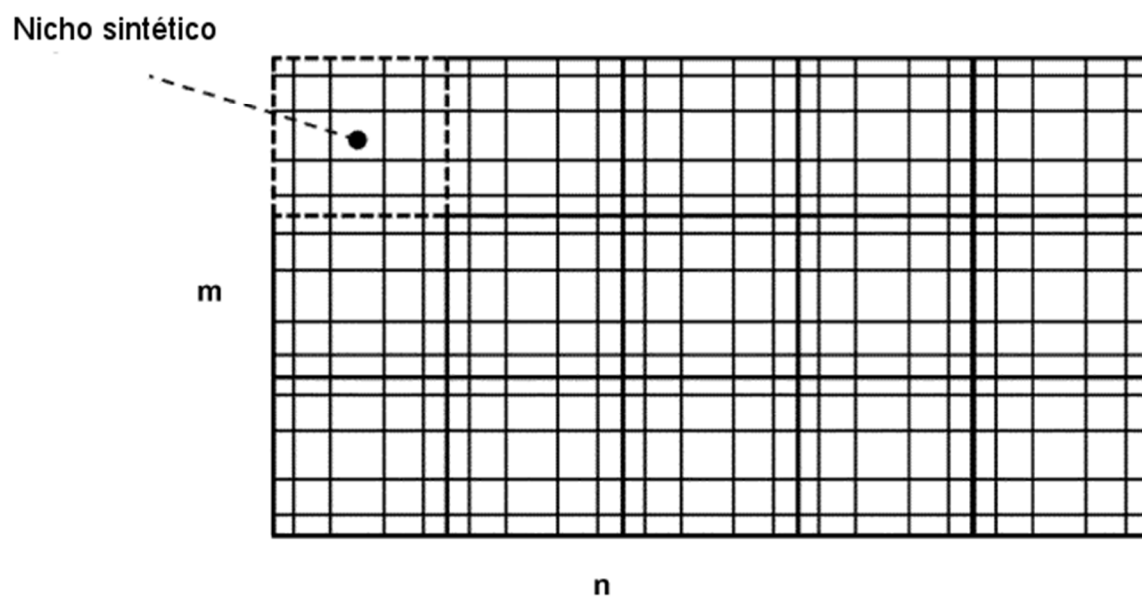


FIGURA 2

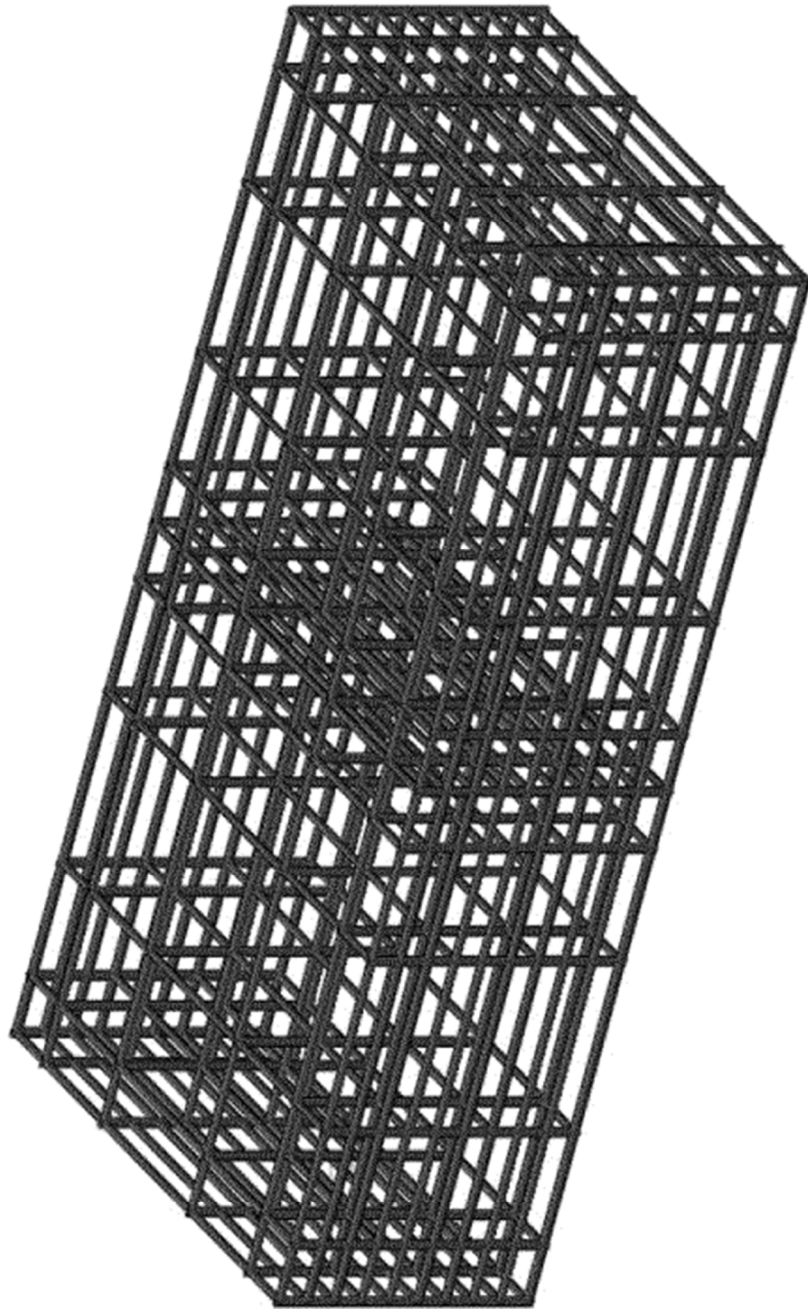


FIGURA 3

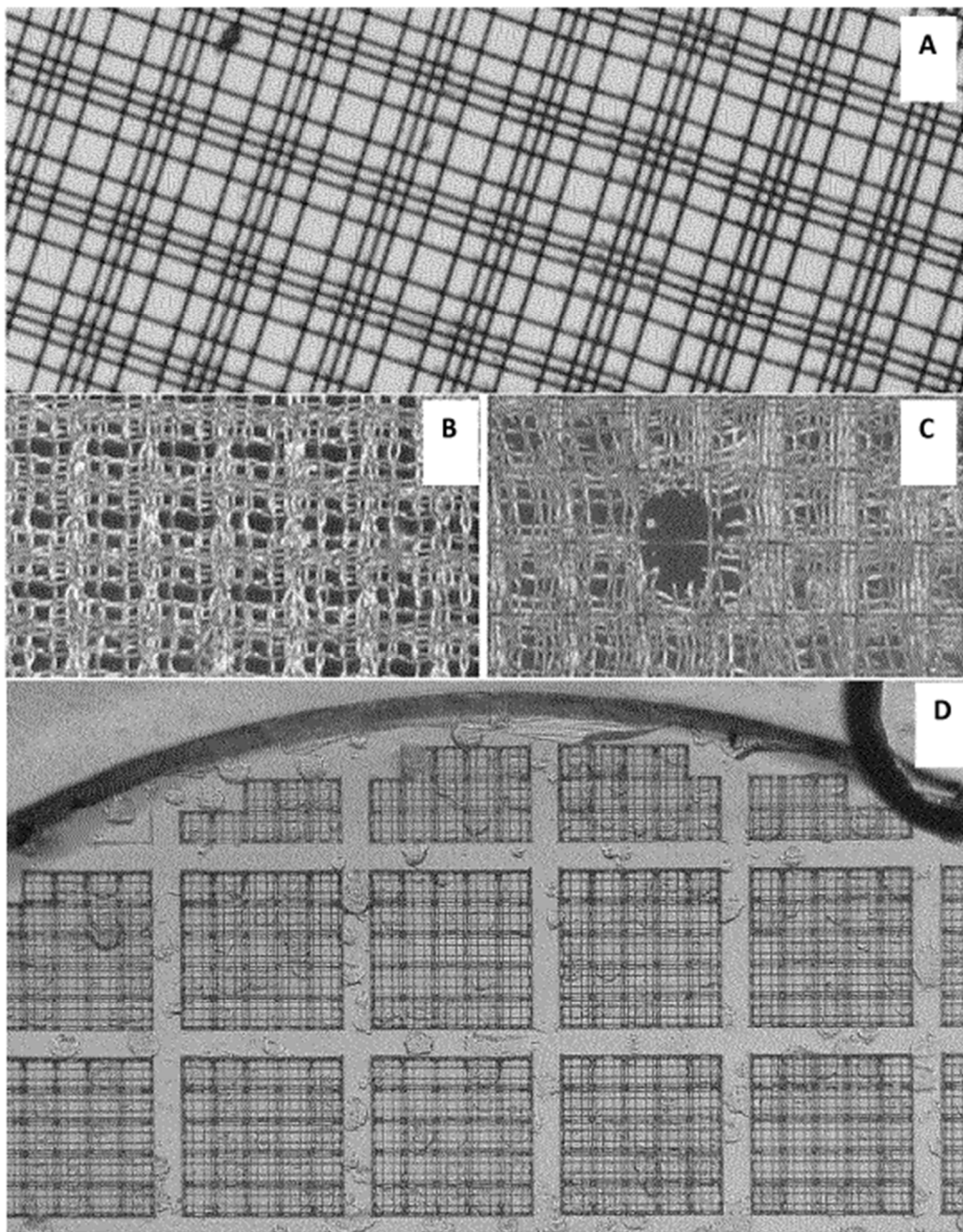


FIGURA 4

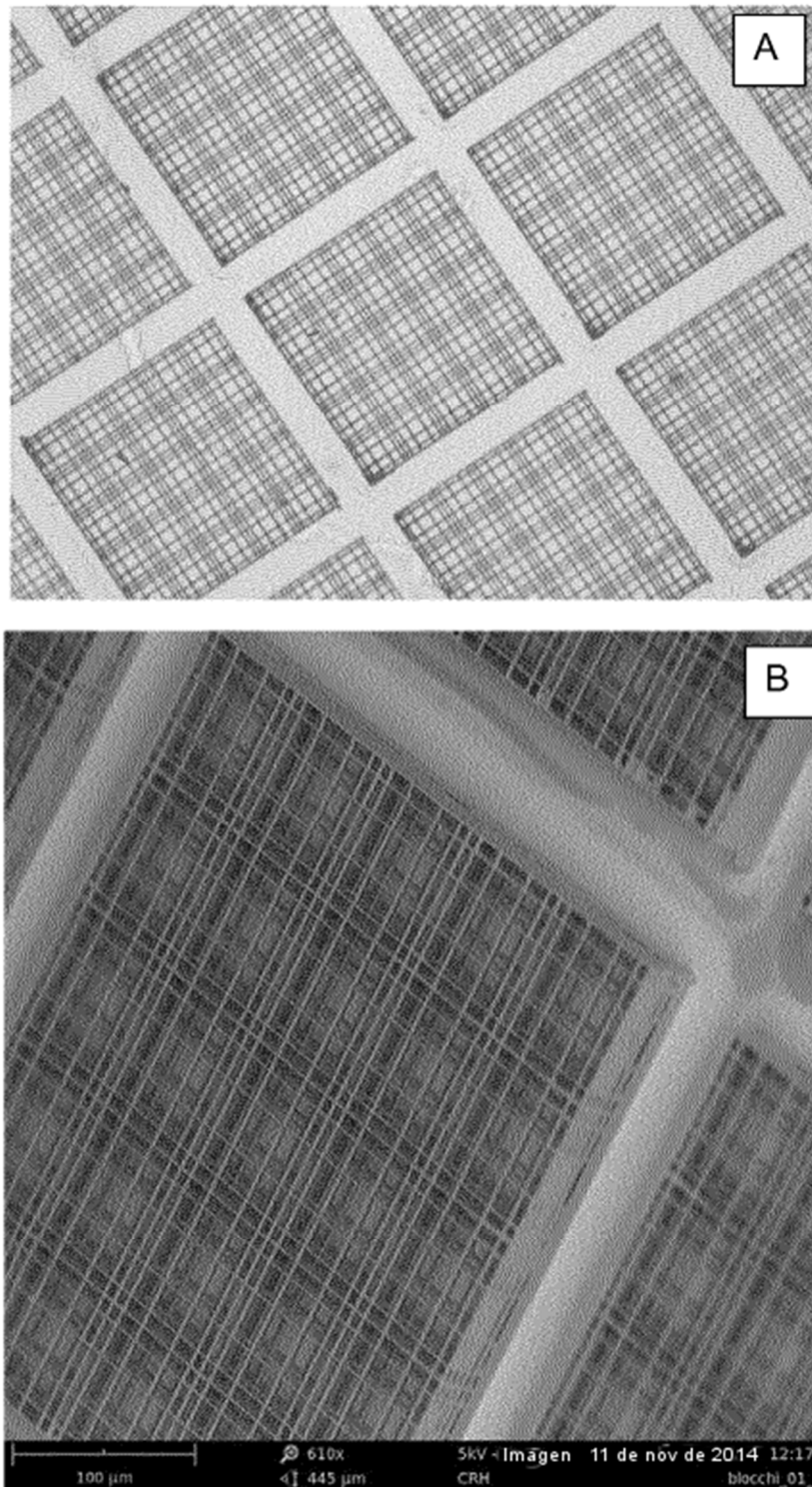


FIGURA 5

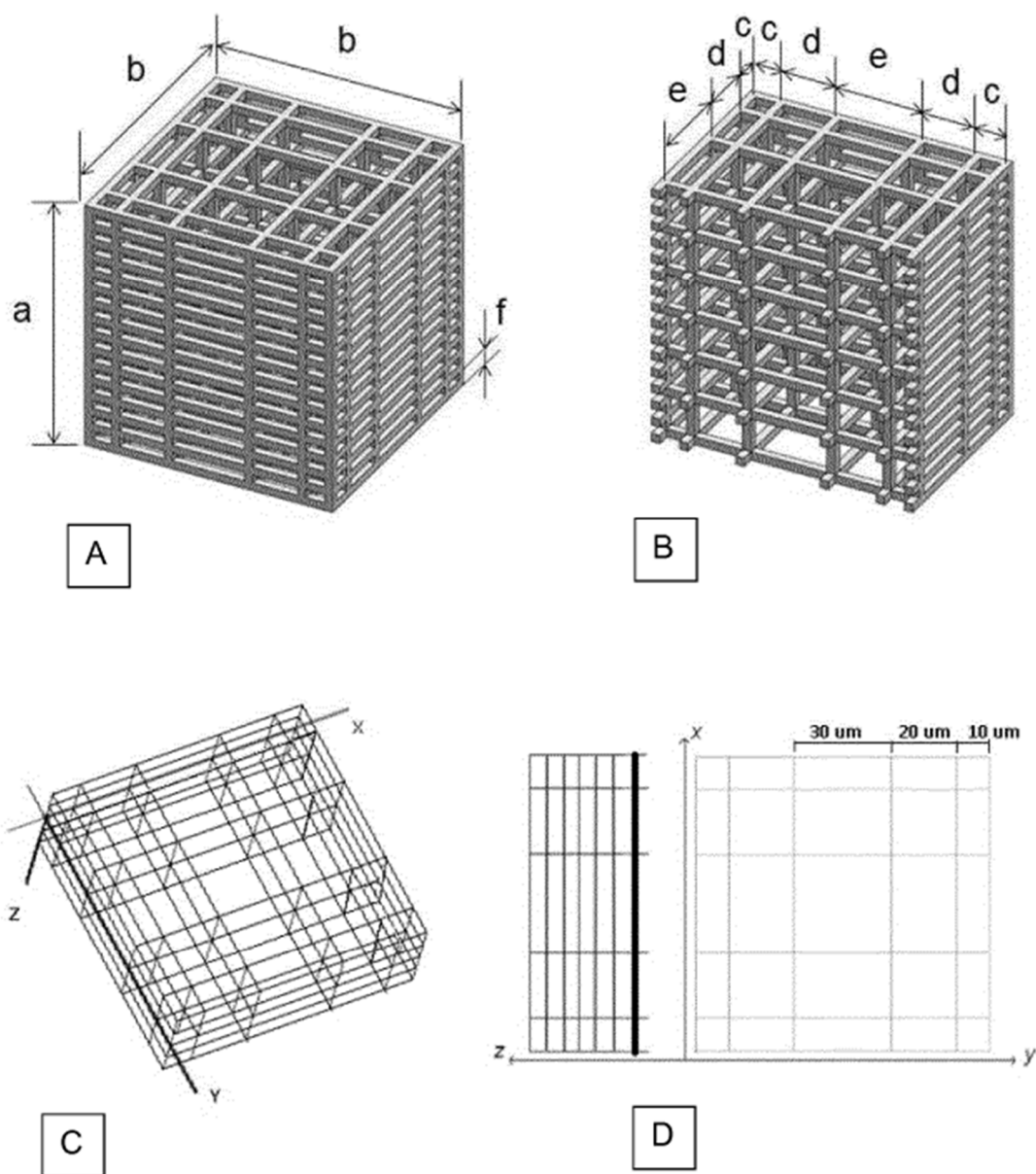


FIGURA 6

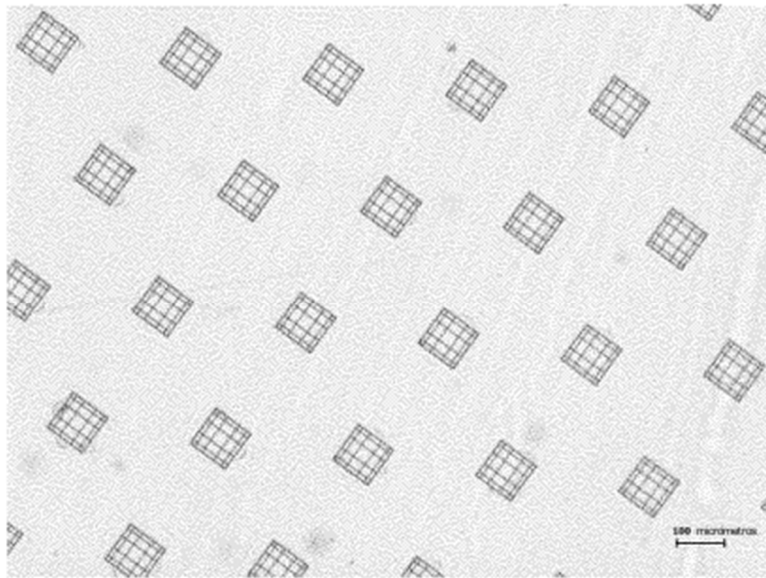


FIGURA 7

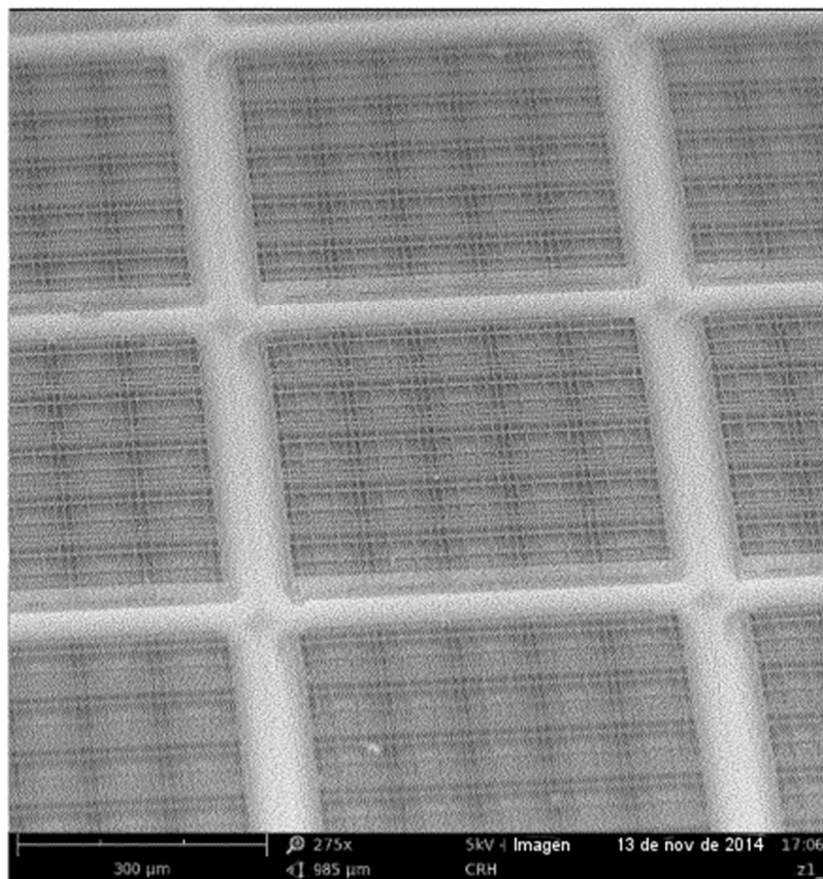


FIGURA 8

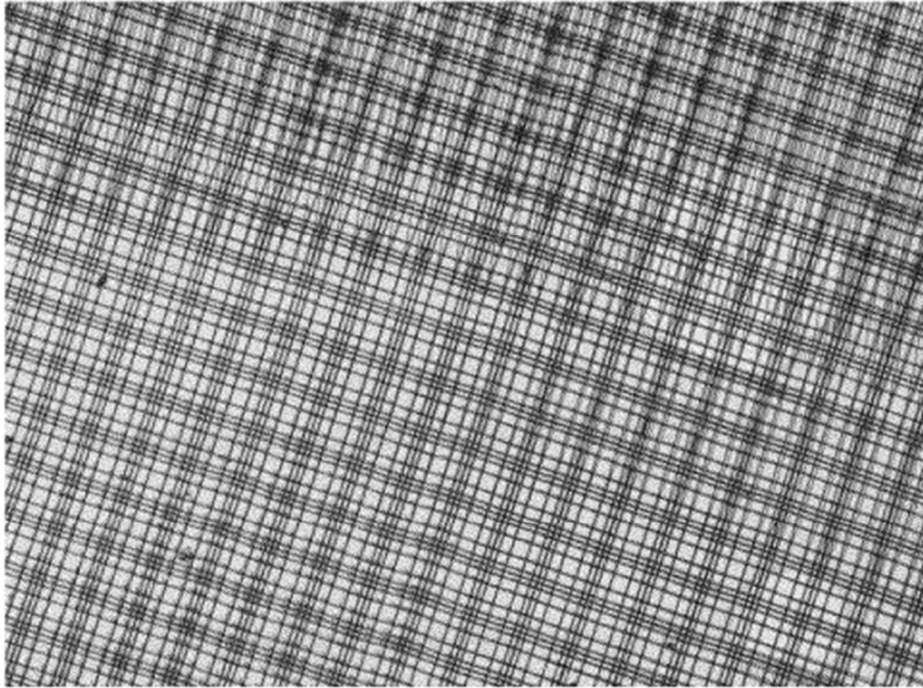


FIGURA 9

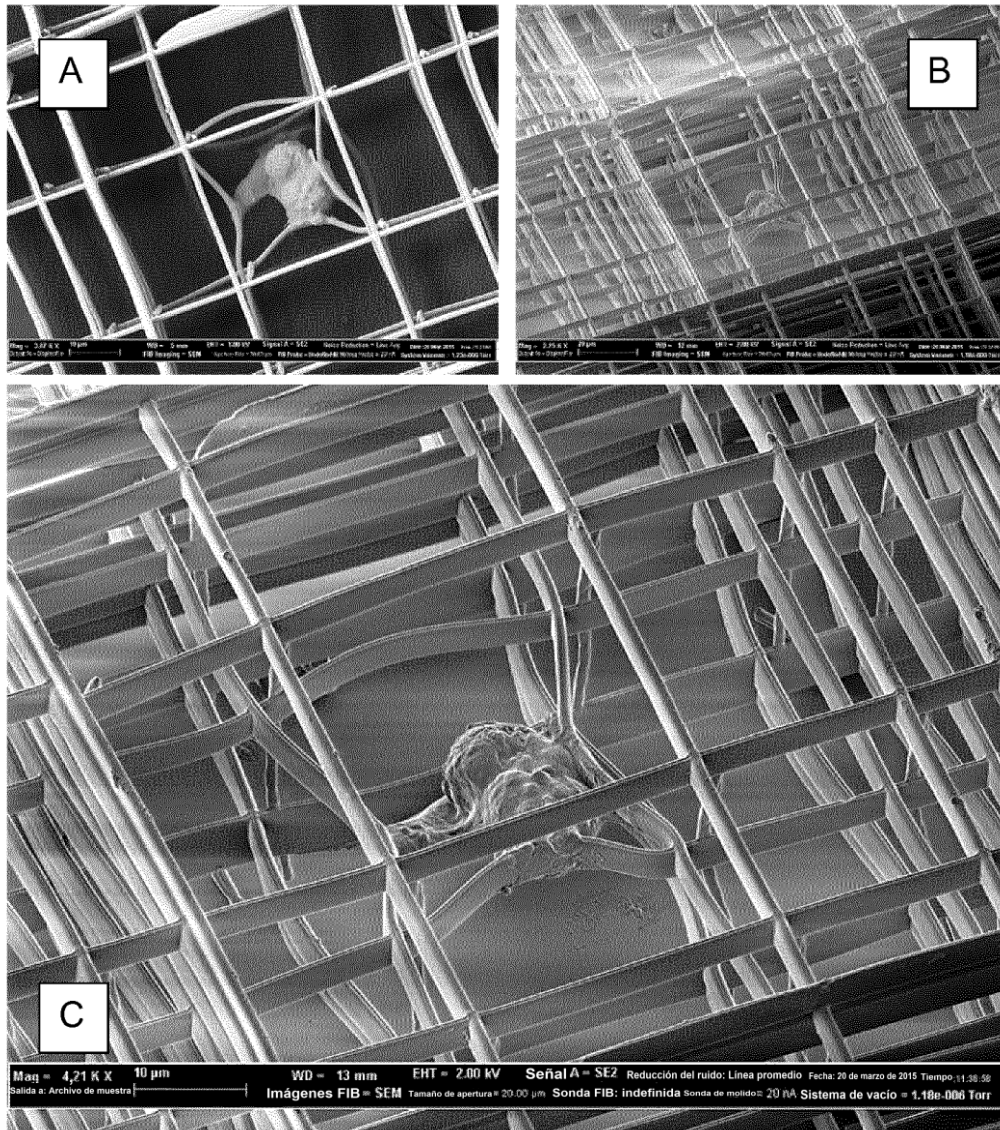


FIGURA 10

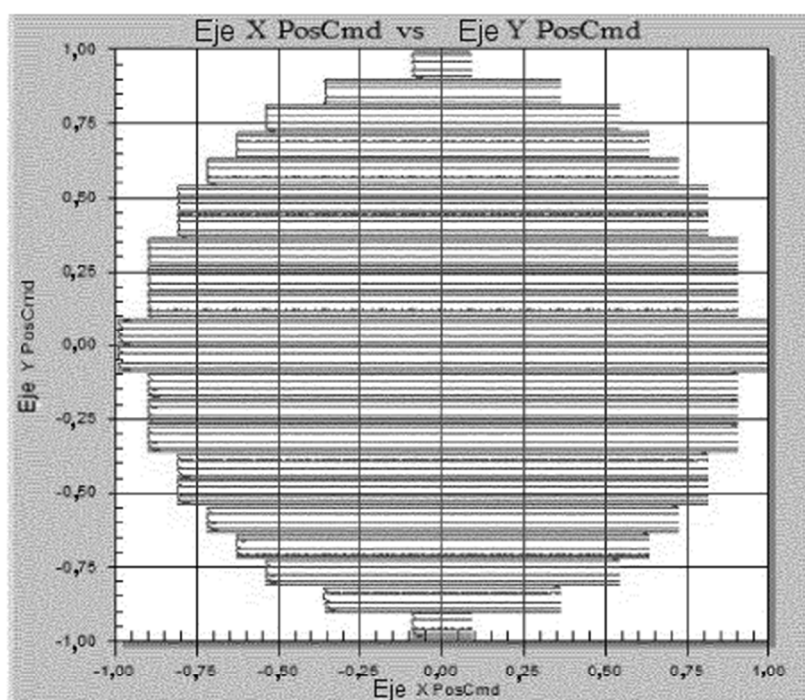


FIGURA 11.1

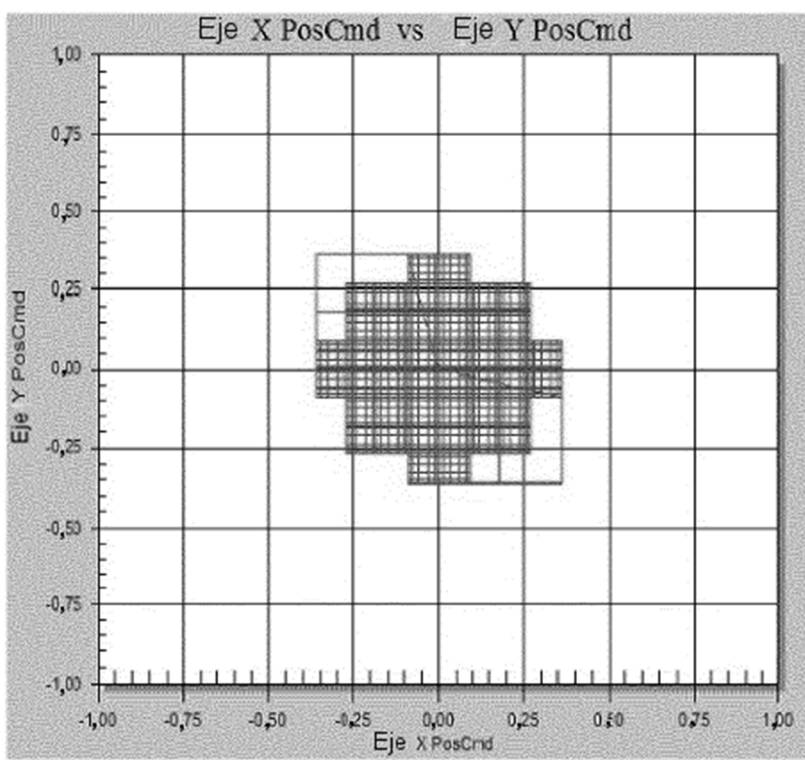


FIGURA 11.2

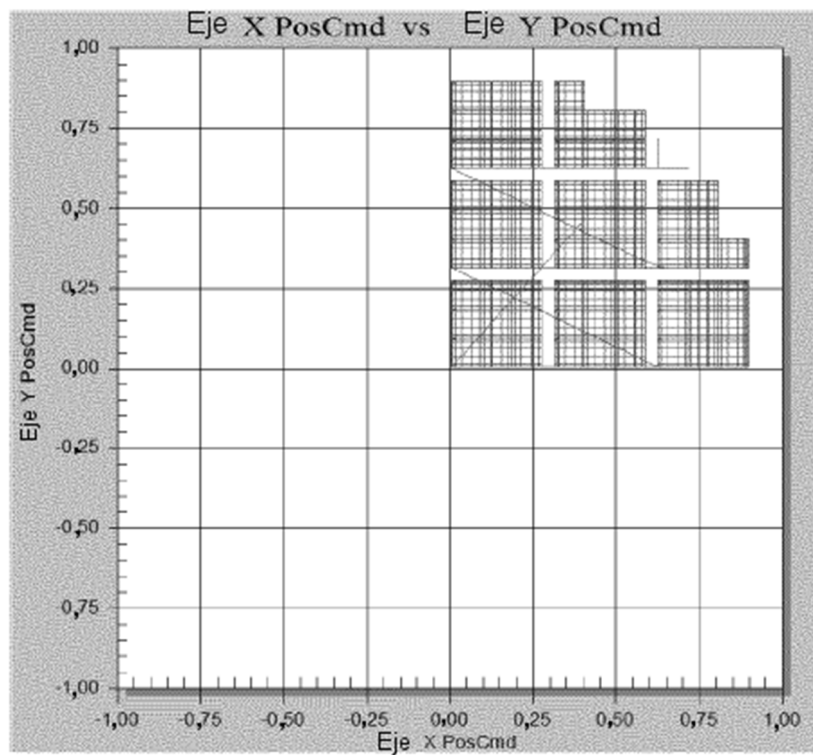


FIGURA 11.3

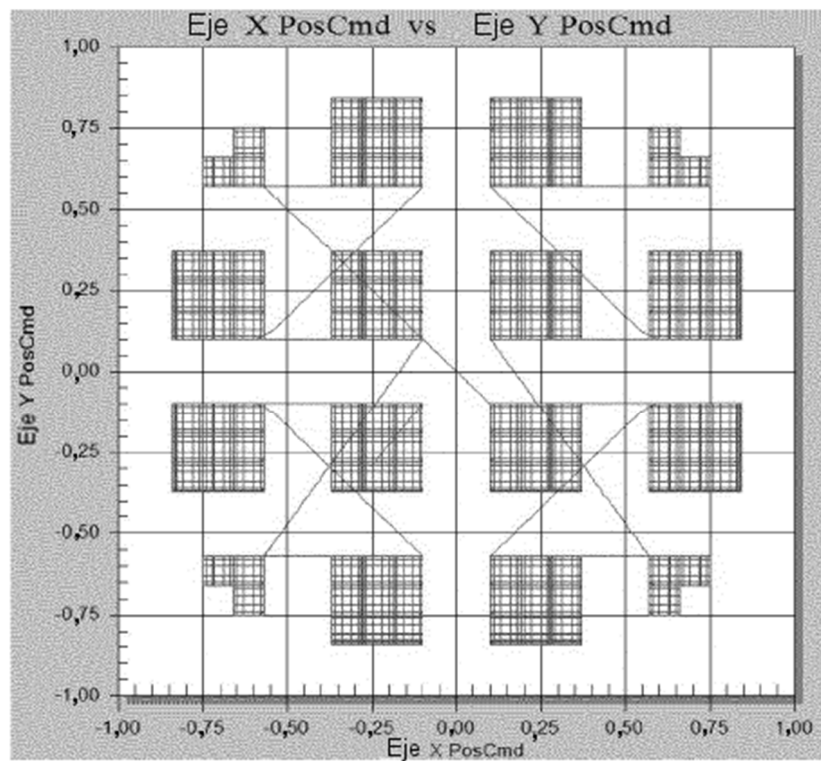


FIGURA 11.4

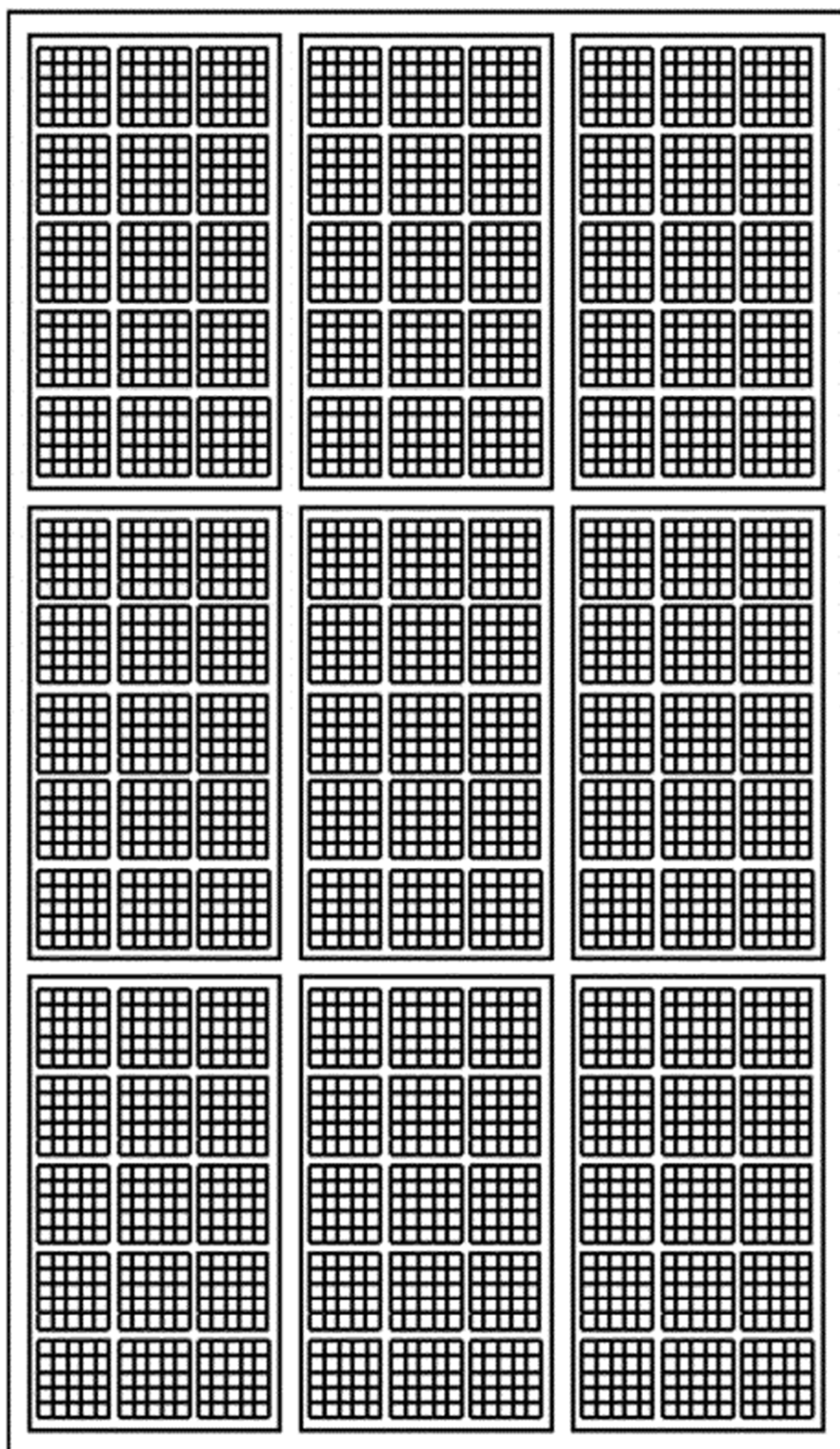


FIGURA 12