



Instituto de Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández

Diseño de un dispositivo 3D para el estudio del crecimiento y la migración de células de la línea tumoral de glioblastoma U87

Tutor: Eduardo Fernández Jover

Co-tutora: Elisa Checa Chavarría

Instituto de Bioingeniería Departamento de Biología celular Área de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual

M^a Ángeles Martínez Gilabert

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

2017-2018

ÍNDICE

Resumen	2
Introducción	3
1. Impresión 3D: historia y aplicaciones	3
2. Glioblastoma multiforme.....	4
1. Metástasis	6
3. Cultivo 3D	7
Antecedentes y objetivos.....	8
Materiales y métodos	8
1. Optimización de la impresora Regemat 3D y fabricación del dispositivo	8
2. Optimización del cultivo celular y análisis de la migración celular.....	13
Resultados.....	18
1. Optimización de la impresión del dispositivo	18
2. Optimización del dispositivo en cultivos <i>in vitro</i>	18
Discusión	35
Conclusiones y proyección futura	37
Bibliografía	38



RESUMEN

La impresión 3D es un sector que se encuentra en auge en la actualidad. A pesar de ser una tecnología que empezó a desarrollarse a principios de la década de los años noventa. La innovación y desarrollo de esta técnica engloba multitud de áreas y aplicaciones diversas: alimentación, moda, regeneración de tejidos. En esta última, se han logrado grandes avances mediante la utilización de biomateriales compatibles como el colágeno, alginato, PLA, en diferentes formatos: esferas, hidrogeles, biorreactores o micro-chips. Logrando crear mediante la utilización de estos biomateriales y la impresión 3D, dispositivos o *scaffolds*; dónde después del aislamiento y la siembra de las propias células del paciente, se puede realizar un cultivo 3D y posteriormente, introducir este dispositivo en el paciente, logrando cerrar una lesión.

En este ensayo se diseña e imprime un dispositivo mediante impresión 3D, como soporte para la siembra y el estudio del crecimiento, proliferación y migración de líneas celulares o estudios de migración celular. Se utilizarán las células de la línea tumoral de glioblastoma humano, U87. Se emplearán los factores 2-desoxy-D-glucosa y el factor de crecimiento neuronal B27 como estímulos para evaluar el crecimiento y la migración de estas células.

El desarrollo de esta técnica puede ser una herramienta válida para realizar estudios de movilidad celular como estudios de migración en metástasis o quimiotaxis.

3D printing is a sector that is booming today. Despite being a technology that began to develop in the early 1990's. The innovation and development of this technique encompasses many different areas and applications such as food, fashion and tissue regeneration. In the latter, great advances have been achieved by the use of compatible biomaterials such as collagen, alginate, PLA, in different spheres, hydrogels, bioreactors or microchips. Achieving create by using these biomaterials and 3D printing, devices or scaffolds; where after isolation and seeding of the patient's own cells in them, a 3D culture can be performed and subsequently, introduce this device into the patient, managing to close an injury.

In this assay a device is designed and printed by 3D printing as a support for planting and studying the growth, proliferation and migration of cell lines or cell migration studies. The cells of the human glioblastoma tumor line, U87, will be used. The factors 2-desoxy-D-glucose and B27 neuronal growth factor will be used as stimuli to evaluate the growth and migration of these cells.

The development of this technique can be a valid tool to perform cell mobility studies such as migration studies in metastases or chemotaxis.

INTRODUCCIÓN

1. IMPRESIÓN 3D: HISTORIA Y APLICACIONES

El estudio realizado en este trabajo trata sobre la creación de un *scaffold* o andamio a partir de una impresora 3D, Regemat. En este *scaffold* se procederá a la siembra y posteriormente al estudio de la supervivencia, propagación y migración de la línea de glioblastoma humano, U87. En respuesta a tóxicos y factores de crecimiento. Este trabajo nos permitirá desarrollar una nueva herramienta con la que estudiar ensayos de movilidad celular como la migración en el cáncer, que produce metástasis; o la quimiotaxis.

La era de la impresión 3D comienza a finales de la década de los setenta, con la invención de la impresora de inyección de tinta. Tras el paso de los años, en 1984, Charles Hull fue el padre de la impresión 3D, con el método de la esterolitografía, proceso de impresión que permite crear un objeto 3D a partir de una imagen digital [1]. A partir de este momento, esta tecnología comenzó a desarrollarse en multitud de ámbitos y aplicaciones: automovilismo, moda, alimentación, aplicaciones espaciales. Destacando el ámbito de la medicina reconstructiva. Al principio, surgieron grandes desafíos en este campo : la búsqueda y utilización de materiales compatibles con el organismo, que éstos fueran estables en el tiempo y en el entorno fisiológico; poder cultivar y mantener gran cantidad de células fuera del organismo; y el más importante, la vascularización del tejido una vez regenerado. A partir de este momento se fueron sucediendo notables avances. En 1990, el Dr. Atala del instituto Wake Forest en Winston-Salem (EE.UU) comenzó la investigación del cultivo de células de vejiga humana. Hasta este momento los investigadores trataban de reconstituir este órgano con tejido del estómago o intestino; no obstante, esta técnica conllevaba múltiples complicaciones incluyendo la secreción de mucosa y cálculos en la vejiga. Por lo que la utilización de las células del órgano dañado del propio paciente, en la reconstrucción de tejidos suponía todo un logro. Y además se lograba evitar dichas complicaciones o rechazos entre pacientes.

Tras el paso de los años, en 1999 se logró crear e implantar vejigas humanas obtenidas a partir de impresión 3D e ingeniería de tejidos, utilizando las propias células de siete pacientes con defectos congénitos en la vejiga. Para realizar esta tarea, se construyeron andamios o *scaffolds* realizados a partir de las propias células del paciente, junto con células musculares, colágeno y ácido poliglicólico, que actuaban formando fibras que se unirían al tejido dañado, reparando el defecto [2]. En ingeniería de tejidos o cultivo 3D, el procedimiento que se lleva a cabo es el siguiente: primero se realiza una biopsia del tejido dañado, tomando una pequeña muestra que se cultivará *in vitro*. Por otro lado, se selecciona un biomaterial con el que se diseña y construye un *scaffold*, soporte o matriz extracelular a partir de impresión 3D. La base de esta técnica es confeccionar un material que ayude a la regeneración de los tejidos, que interaccione con el propio tejido dañado y ayude a cerrar la lesión. En un estudio dirigido por Zopf. DA y Hollister SJ se consiguió construir una férula de tráquea utilizando un biomaterial, la policaprolactona mediante impresión 3D. Primero, se realizó una tomografía de las vías respiratorias del paciente, y después se diseñó una férula personalizada que se reabsorbería al cabo de los años [3].

En ingeniería de tejidos y cultivo celular se utilizan dos tipos de *scaffolds* o andamios: andamios sin células que dependerán del propio organismo para regenerar el nuevo tejido y andamios dónde se siembran las células del propio paciente, estos andamios se degradan lentamente en el organismo, mientras que son reemplazados por las propias proteínas de la matriz extracelular (ECM), secretadas por las células que proliferan en el interior del andamio o *scaffold* [4]. Los biomateriales utilizados en la impresión 3D reproducen la función biológica y mecánica de soporte de las ECM del organismo. Los *scaffolds* realizados a partir de biomateriales proporcionan un espacio tridimensional dónde las células pueden unirse, crecer y formar tejidos con estructura y función determinadas, también permiten la entrega de factores bioactivos como péptidos de adhesión celular y factores de crecimiento [5].

La fisiología de las células en los mamíferos requiere de un anclaje y soporte para su supervivencia; el andamio o *scaffold* solventa también este requerimiento. Los biomateriales utilizados en estos procesos se clasificarían en materiales derivados de productos naturales como el colágeno y el alginato [6-7]; *scaffolds* formados a partir de tejidos del organismo en los que se han eliminado las células, como la mucosa de vejiga o del intestino delgado [8-10]; y polímeros sintéticos, entre los más destacados se encuentran el ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) que será el biomaterial que utilizaremos en nuestro estudio; y el ácido polilactoglicólico (PLGA) [11-13].

2. GLIOBLASTOMA MULTIFORME

El tipo de células que se van a sembrar en el dispositivo desarrollado en este trabajo para estudiar la migración celular, son células de la línea tumoral humana de glioblastoma, U87. El glioblastoma o GBM se trata de un astrocitoma, un cáncer formado a partir de las principales células gliales, los astrocitos. Estas células realizan funciones de soporte estructural, captación de neurotransmisores, reparación, regeneración y suministro de nutrientes a las neuronas [14]. También forman parte de las células gliales la microglía y los oligodendrocitos. La microglía actúa como sistema inmune fagocitando posibles agentes patógenos y sustancias tóxicas, protegiendo el cerebro. Los oligodendrocitos forman el recubrimiento de la capa de mielina de los axones en el sistema nervioso central (SNC) [15]. El GBM o astrocitoma de grado IV, es el tumor cerebral más común y agresivo, con una esperanza de vida entre 12 y 14 meses. A pesar de las diferentes estrategias terapéuticas basadas en agentes quimioterapéuticos como el temozolomida [16] y el irinotecan [17] o inmunoterapia [18]. La agresividad y letalidad de este tumor viene marcada por su capacidad infiltrativa en el parénquima del tejido cerebral [19].

El glioblastoma consta de las siguientes características: proliferación celular incontrolada, infiltración difusa, necrosis, angiogénesis significativa, resistencia a la apoptosis y aberraciones cromosómicas extendidas [20]. Los principales desafíos frente al glioblastoma son: la heterogeneidad del tumor, la ineficacia de los tratamientos para eliminar el tumor completo y como consecuencia la alta probabilidad de recaída. Además, las células madre de glioma producen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que promueve la angiogénesis; esta característica podría establecer la angiogénesis como diana terapéutica frente al glioblastoma. Los investigadores Ruiz-Ontañón y L.Orgaz realizaron estudios con células de glioblastoma, en los que establecieron dos tipos de células iniciadoras (GICs) [21] (Figura 1) [22]. Unas células se situaban en la zona central del tumor (TM) y otras

en la periferia (PT) (Figura 2), estas últimas constaban de carácter infiltrativo y migratorio. Esta es la causa del alto índice de recurrencia en GBM (Figura 1). Se realizaron micro-arrays basados en SNP (*Single nucleotide polymorphism*) para distinguir la expresión génica de genes encargados en la adhesión celular, migración, ciclo celular y respuestas inmunes e inflamatorias.

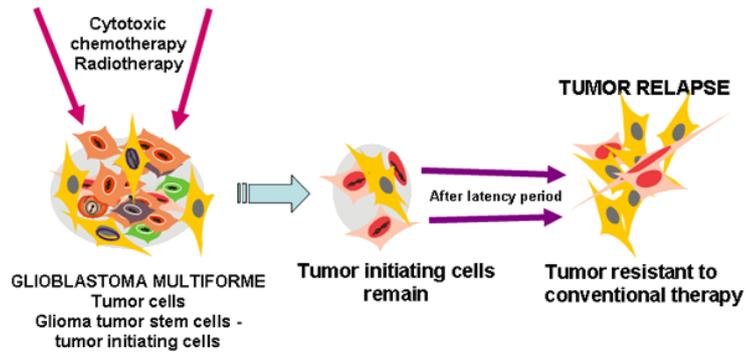


Figura 1. Células iniciadoras de tumores [22].

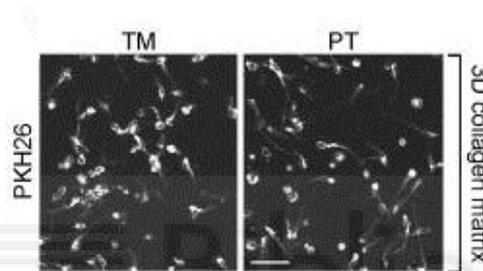


Figura 2. Células de la zona central del tumor (TM) y de la periferia (PT), en matriz de colágeno [21].

En un estudio de expresión de las proteínas Rho y Rac; ambas GTPasas, que constituyen los principales reguladores de la migración celular e invasión celular, debido a que controlan el citoesqueleto de actina. Se silenció Rac1 mediante siRNA, disminuyendo la capacidad invasiva de las células. La capacidad invasiva se redujo de forma más significativa cuando las células PT se incubaron con un inhibidor de Rho. El análisis mediante SNP de *micro-arrays* mostró una expresión reducida de factor p27 (CDKN1B), se trata de un supresor tumoral. Para demostrar que el factor p27 inhibía la actividad de RhoA en los GICs se silenció mediante shRNA, a partir de inmunofluorescencia se reveló que RhoA se encontraba en la superficie de la células silenciadas. Posteriormente, se demostró que la expresión reducida de p27 aumentaba la capacidad migratoria de las células TM [21].

Nuestro estudio pretende valorar la migración de las células de la línea de glioblastoma, U87, en el dispositivo realizado mediante impresión 3D. La capacidad migratoria de las células tumorales en última instancia, significa que sean capaces de migrar del foco tumoral y colonizar otro lugar, produciendo metástasis; que en la actualidad, es la causa principal de muerte en pacientes con cáncer.

2.1 Metástasis

La metástasis es un complejo proceso en el que las células del tumor primario invaden vasos sanguíneos y linfáticos, viajando a través de ellos hasta llegar a otros órganos o tejidos distantes donde puedan implantarse. Una vez implantadas en el órgano de destino, pueden colonizarlo, creando nuevos focos tumorales. La metástasis es una de las causas principales de fracaso del tratamiento de los pacientes con cáncer. Por lo que es de vital importancia comprender la biología de las células tumorales y la cascada metastásica con el objetivo de mejorar los métodos diagnósticos y de tratamiento de la metástasis (Figura 3) [23].

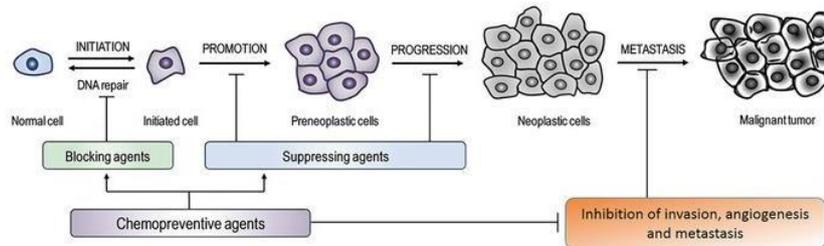


Figura 3. Promoción del tumor primario hacia la metástasis [23].

En el organismo, los órganos y tejidos están separados unos de otros por dos tipos de matriz extracelular: membrana basal y estroma intersticial. La matriz extracelular rodea y soporta las células que se encuentran en los tejidos de los mamíferos. Cumple con importantes funciones biológicas como la comunicación intercelular, modula la diferenciación y fisiología celular, y acumula factores de crecimiento. La matriz extracelular actúa como barrera mecánica frente a la invasión de las células cancerígenas. Durante la transición de un carcinoma primario a un carcinoma invasor, las células tumorales se introducen en la membrana basal epitelial, llegando al estroma intersticial. Una vez que las células han penetrado en el estroma se dirigen a los vasos linfáticos y sanguíneos, diseminándose al resto del organismo [24]. En esta transición, se producen cambios generales y extensos en la organización del tejido. Las etapas que constituyen la metástasis son las siguientes: angiogénesis, invasión, circulación, detección y extravasación y formación de colonias secundarias.

La primera fase en el proceso metastásico es la angiogénesis, a partir de la cual se originarán nuevos vasos sanguíneos en el tumor primario. Uno de los factores principales en este proceso es el *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), que se encuentra tanto en tejidos tumorales como en tejidos sanos. Otros factores activadores son: *Basic fibroblast growth factor* (bFGF), angiogenina, angiotrofina y *Tumor necrosis factor* (TNF). Mientras que los factores inhibidores de angiogénesis son la trombospondina y la angiostatina, la encargada de inhibir la proliferación endotelial *in vitro*. El siguiente paso del proceso es la invasión, en la que las células tumorales interactúan con la matriz extracelular, para conseguir la salida del tejido de origen. Más adelante la pérdida de expresión de las cadherinas en las células del tumor primario, es determinante en la pérdida de adhesión de las células y desprendimiento de las células tumorales, facilitando la invasión a otros tejidos. También intervienen integrinas, lamininas involucradas en procesos de adhesión y diseminación celular, mitosis y movimiento celular.

Otro tipo de proteínas importantes en la invasión son las enzimas proteolíticas, implicadas en la rotura de la membrana basal como: serinproteasas, metaloproteinasas (MMP) como la colagenasa y cisteinproteasas como la catepsina. En cuanto a la motilidad de las células cancerígenas, que es el tema que desarrollaremos en nuestro estudio, las células tumorales se desplazan hacia la zona de la matriz que ha sido alterada anteriormente por la acción mecánica de las MMP, avanzando hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, que finalmente favorecerán el paso hacia otros tejidos. La siguiente etapa de la metástasis es la circulación, las células tumorales en forma de agregados penetran en los vasos sanguíneos y linfáticos. Continuamos con la detención y extravasación, las células tumorales se adhieren a la membrana endotelial, induciendo la retracción del endotelio. En las 24 horas siguientes degradan la membrana y la atraviesan invadiendo el tejido al que llegan, intervienen factores: plaquetarios, receptores de laminina y trombospondina, proteinasas y factores de motilidad. El último paso es la formación de colonias secundarias del tumor. En él se produce la proliferación de células formando colonias, es llevado a cabo por factores de crecimiento y factores pro-angiogénicos.

En vista del problema que supone el proceso de migración celular y metástasis en el GBM y considerando las ventajas de la impresión 3D y los cultivos en 3D; en este estudio, se desarrollará y construirá un dispositivo mediante impresión 3D. Este dispositivo será el soporte para la siembra y estudio de migración de una línea tumoral de glioblastoma, U87. Aunque nosotros utilizaremos un tipo de *scaffold* rígido creado a partir de un polímero sintético, el ácido poliláctico o PLA; existen otros tipos: esferas, hidrogel, biorreactor y microchip [25-26].

3. CULTIVOS 3D

El entorno celular generado en un cultivo en 2D o cultivo en monocapa no corresponde fielmente al que encontramos en un organismo vivo, ya que en él, las células se encuentran rodeadas de otras células y de la matriz extracelular (ECM). Además no se pueden reproducir las interacciones célula a célula y célula-matriz que son tan importantes para la diferenciación, proliferación y funciones celulares [27]. Por otro lado, en el microentorno tumoral, existe hipoxia y falta de nutrientes favoreciendo la resistencia y la malignidad de las células tumorales, por lo que la diferencia con el cultivo en 2D se hace más significativa. El cultivo 2D, no logra recrear el microentorno tumoral de condiciones de hipoxia y bajo pH, además el cultivo 3D consigue aumentar las interacciones celulares de adhesión y la secreción de factores solubles.

Existen muchos estudios en los que se establece los cultivos 3D como mejores herramientas en el cultivo celular, ya que existe una mejor expresión de biomarcadores [28]. El cultivo 3D encuentra la unión entre el cultivo de células 2D y los modelos animales; por lo que el cultivo 3D permite recrear el entorno celular y con él se logra estudiar la fisiología y patología de los tejidos, y la seguridad, eficacia y toxicidad de los fármacos. Uno de los campos en los que ha supuesto un gran avance los cultivos 3D, es el área del diseño de nuevos fármacos [29]. Además de los estudios de los efectos directos de los fármacos, los sistemas 3D han demostrado ser eficientes modelos para estudiar los efectos sinérgicos de sustancias biológicamente importantes en las células [30].

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El cultivo 3D es una herramienta útil en diversas aplicaciones como la regeneración de tejidos, diseño de nuevos fármacos, estudios de toxicidad de fármacos, morfología celular y estructural de tejidos o estudios de movilidad celular. En los estudios de movilidad celular el diseño de un soporte mediante impresión 3D implica una comprensión completa de los parámetros que controlan la migración celular.

Se diferencian dos tipos de migración celular, la migración proteolítica (mesenquimal), donde las células se desplazan a través de las proteínas de la ECM y la migración no proteolítica o ameboide [31]. En la migración no proteolítica, en los geles o soportes 3D realizados con biomateriales más blandos, se observa que las células no degradan la estructura del soporte 3D, por lo que se sugiere que este tipo de migración ocurre a través de los poros de la estructura del soporte 3D. Otro punto importante es la composición del soporte 3D, el porcentaje de biomaterial utilizado o la rigidez del mismo son características importantes en la utilización de estos soportes 3D, como herramienta para el estudio de procesos de migración celular [32-33].

Los objetivos marcados son:

1. Diseño, digitalización, optimización e impresión de un dispositivo 3D definido para estudiar el crecimiento, proliferación y migración de células de la línea tumoral de glioblastoma humano, U87. Y para posteriores ensayos de migración celular, en procesos como la metástasis o la quimiotaxis.
2. Evaluar el efecto de la 2-desoxi-D-glucosa y el factor de crecimiento neuronal B27 en las células de la línea tumoral de glioblastoma humano, U87.

Palabras clave: *scaffold*, U87, impresión 3D, 2-DG, factor B27.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Nuestro estudio consta de dos partes diferenciadas, en la primera de ellas se diseñará, construirá y optimizará un dispositivo a partir de impresión 3D, en el cual sea posible estudiar y analizar una línea tumoral humana de glioblastoma, U87. Posteriormente, se realizarán estudios de migración celular en respuesta a diferentes estímulos, como el factor de crecimiento neuronal B27 y 2-desoxi-D-glucosa (2-DG). Este último, se trata de un análogo de la glucosa que inhibe la glucólisis a través de su acción sobre la hexoquinasa, resultando un tóxico celular [34-35].

1. OPTIMIZACIÓN DE LA IMPRESORA Y FABRICACIÓN DEL DISPOSITIVO

1.1 Biopresora 3D Regemat

Inicialmente se procedió a realizar la calibración espacial de la biopresora mediante un sistema de coordenadas cartesianas en los ejes x, y, z. Dicha calibración es una fase esencial para que la obtención de la estructura impresa

esté definida y posea una resolución elevada. Posteriormente, el dispositivo diseñado para el estudio se imprimió mediante el programa Regemat 3D Designer. En la siguiente (Figura 4) se observa una visión global de la impresora y sus partes principales.

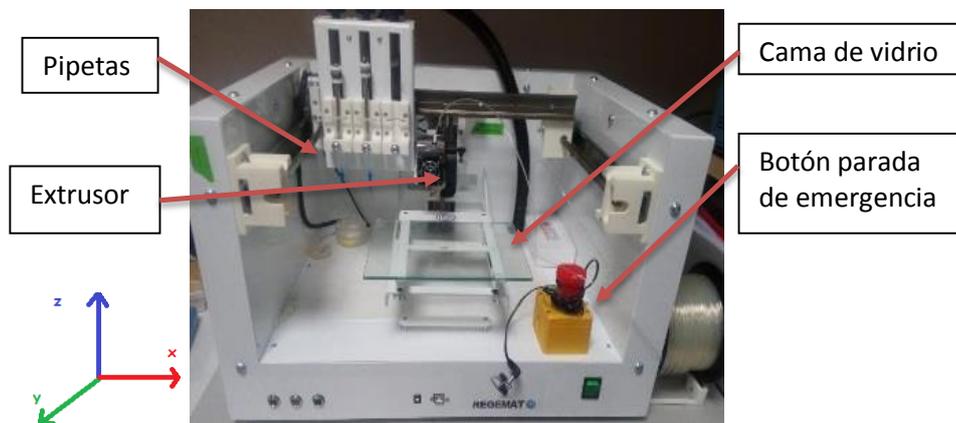


Figura 4. Impresora 3D Regemat y partes principales

1.2 Calibración:

- **Calibración jeringas:** en el menú *Settings* → *Header Configuration*. En nuestro caso, sólo calibramos el extrusor, ya que solo se utilizará este para fabricar el dispositivo. Este cabezal es el que liberará el material durante la impresión. La impresora se rige por un sistema de coordenadas cartesianas en los ejes x, y, z; debido a ello para calibrar el extrusor se deberá llevar la punta del extrusor al punto calibración, acotando las coordenadas x e y.
- **Calibración cama de vidrio:** se utiliza la pestaña *Movements*. La cama de vidrio es dónde se va a realizar la impresión, por lo que es necesaria su correcta calibración. La cama se calibrará en el eje z, que se corresponde con la altura. Sobre ella se encontrará el extrusor, que será la herramienta que permitirá la salida del material de impresión, la altura de la punta del extrusor debe ser la adecuada, para que el material se deposite de forma uniforme durante toda la impresión. En la Figura 5 se observa el software que permite controlar la impresora.

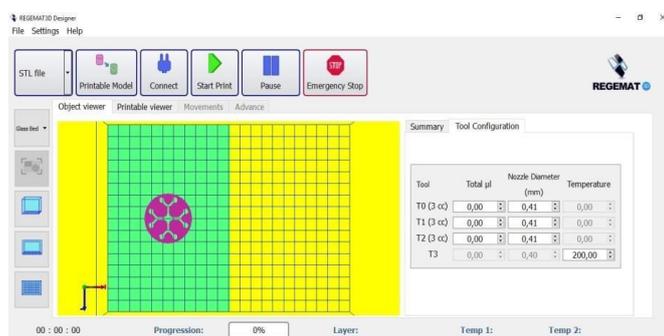


Figura 5. Pantalla principal del programa Regemat 3D Designer. En la zona verde se observa la estructura en el área de impresión.

1.3 Diseño del dispositivo

Después de la calibración de la impresora se procedió al diseño y optimización del dispositivo o soporte, en el que se sembró la línea de glioblastoma U87. El principal objetivo fue diseñar un dispositivo biocompatible con la línea celular utilizada. Además, debía ser válido para estudiar de forma controlada la migración celular desde el

centro del dispositivo, lugar donde se realizó la siembra de las células, hacia los extremos en respuesta a estímulos migratorios, el factor de crecimiento neuronal B27 y la 2-desoxi-D-glucosa. Se optó por un material biocompatible con las células de glioblastoma U87, el ácido poliláctico PLA (Figura 6) [36]. Se trata de un polímero de moléculas de ácido láctico, es biodegradable y bioabsorbible, hidrofílico y estable a la luz ultravioleta U.V.

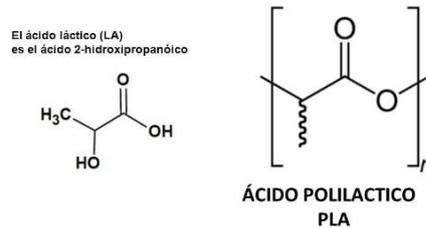


Figura 6. Estructura molecular del ácido poliláctico (PLA) [36].

La evolución en el diseño de los dispositivos fue ligado al propio diseño de la impresión, es decir se buscaba obtener una estructura con carriles, en los que las células pudieran sembrarse en un lugar equidistante al lugar donde se administraran los diferentes estímulos migratorios, y así poder cuantificar y evaluar la migración celular. Los carriles del dispositivo deberían poseer unas dimensiones adecuadas a las células U87, para que pudieran migrar y responder a los estímulos administrados. El diseño del dispositivo constó de un espacio central donde se sembraron las células, dotado de aberturas en los extremos, donde se dispondrían los distintos factores estimulantes para las células (Figura 7).

Simultáneamente se fue optimizando tanto el diseño del dispositivo (Tabla 1, Anexo I) como el diseño de la impresión variando diferentes parámetros hasta obtener el óptimo de ambos diseños. El diseño del dispositivo se realizó a partir del programa 3D builder por Alejandro García Moll, perteneciente al laboratorio de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual del Instituto de Bioingeniería.

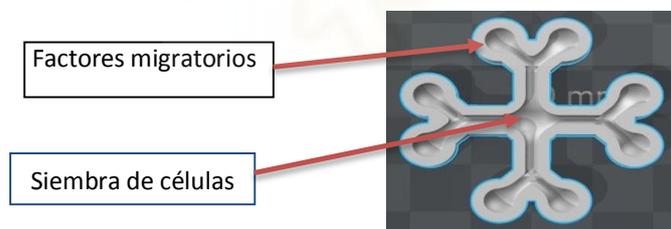


Figura 7. Esquema general del dispositivo desarrollado.

En el diseño de la impresión se seleccionaron distintos parámetros (Tabla 2, Anexo I) como la velocidad del perímetro y del *infill*, el tamaño del poro que se deseaba, la altura de cada capa y la velocidad extrusor. Durante el periodo de optimización del diseño del dispositivo se llevaron a cabo nueve diseños diferentes de dispositivos (Figura 8 a-o) para optimizar el tiempo de impresión y obtener unas dimensiones de los carriles de la estructura donde las células U87 pudieran migrar.

Figura 8 (a-o). El desarrollo de los dispositivos fue el siguiente:

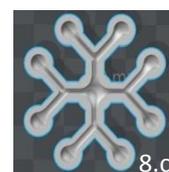
a. Celv_1 planta:



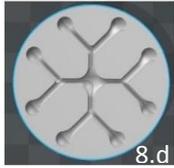
b. Celv_2 planta:



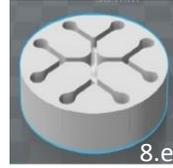
c. Celv_3 planta:



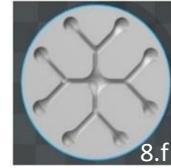
d. Celv_4 planta



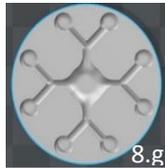
e. Celv_4 perfil:



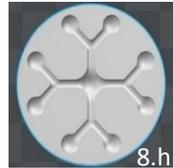
f. Celv_5 planta:



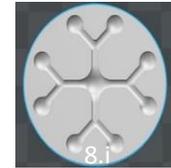
g. Celv_6 planta:



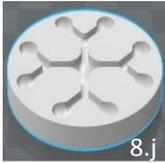
h. Celv_7 planta:



i. Celv_8 planta:



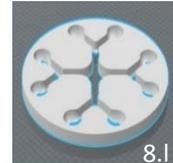
j. Celv_8 perfil:



k. Celv_7 modificada planta



l. Celv_7 modificada perfil:



En los diseños (Figura 8 a-e), la impresora no imprimía la base del dispositivo, debido a ello los siguientes diseños se realizaron con capas sólidas en toda la estructura. Además se evolucionó hacia un dispositivo más compacto, para optimizar el tiempo de obtención de la pieza.

1.4 Diseño de la impresión

En este apartado se deberán acotar los parámetros de impresión para obtener un *scaffold* con las características necesarias para que las células de la línea de glioblastoma, U87 se siembren satisfactoriamente en el centro del dispositivo, puedan migrar a través de los carriles, y se reduzca la infiltración de las células a través del *infill* o intermallado. Los pasos más importantes en el diseño de la impresión son los siguientes:

1.4.1 Factor de extrusión: este parámetro se calculó para determinar el volumen de PLA que se liberaría a través del extrusor durante la impresión del dispositivo. El PLA liberado influirá directamente en el grosor del filamento, que deberá ser el adecuado para realizar el tamaño de poro o para que el material depositado se adhiera perfectamente entre capas sucesivas. Debido a ello, la optimización de este parámetro fue de vital importancia para que las células se pudieran sembrar en el centro del dispositivo, y pudieran migrar a través de unas calles accesibles y libres de material sobrante.

Para determinar este parámetro, se utilizaron dos fórmulas según sea para configurar el perímetro o *infill*. Antes de la impresión, el extrusor imprimirá un perímetro dentro del cual realizará la impresión. Se calcularon diferentes factores de extrusión, después se ensayaron imprimiendo diferentes dispositivos (Tabla 2, Anexo I). Seleccionando finalmente un factor de extrusión de 2 para una óptima impresión. Este factor aseguraba un tamaño de poro definido y la adherencia entre las capas a lo largo de todo el periodo de impresión.

➤ **Factor EXTRUSIÓN DEL PERÍMETRO.** El perímetro es el área que imprime el extrusor, dentro de la cual realizará la impresión del dispositivo. Este factor consta de:

- Velocidad del extrusor (T3 hotend): velocidad en la que el extrusor imprimirá el dispositivo.
- Velocidad realización perímetro: es la velocidad en la que se imprimirá el perímetro de la estructura.
- Altura capa: altura de cada capa que conforma el dispositivo, en milímetros (mm).
- Diámetro extrusor (T3): es el diámetro de la punta del extrusor, este parámetro es constante.

$$\text{Factor extrusión perímetro} = \frac{\text{VELOCIDAD EXTRUSOR}}{\text{VELOCIDAD PERÍMETRO} \cdot \text{ALTURA CAPA} \cdot \text{DIÁMETRO EXTRUSOR}}$$

➤ **Factor EXTRUSIÓN DE INFILL.** El *infill* es el patrón que realiza el extrusor cuando imprime el intermallado. Este factor consta de:

- Velocidad del extrusor (T3 hotend): velocidad en la que el extrusor imprimirá el dispositivo.
- Velocidad realización infill: velocidad en la que el extrusor realizará el patrón del intermallado.
- Altura capa: altura de cada capa que conforma el dispositivo, en milímetros (mm).
- Diámetro extrusor (T3): es el diámetro de la punta del extrusor, este parámetro es constante.

$$\text{Factor extrusión infill} = \frac{\text{VELOCIDAD EXTRUSOR}}{\text{VELOCIDAD INFILL} \cdot \text{ALTURA CAPA} \cdot \text{DIÁMETRO EXTRUSOR}}$$

1.4.2 Cargar un scaffold: El programa de la impresora trabaja con archivos en formato STL. Después, se establecerán los parámetros de impresión que deseemos en la pestaña *Settings* → *Extra Configuration* y *Configuration* (Figura 9). La impresión se realizará capa a capa y se determinarán los parámetros de impresión: la velocidad de impresión del extrusor, el tipo de *infill*, es decir el patrón que forma el material mientras imprime, el tamaño del poro del *scaffold*, la altura de las capas y la velocidad de impresión del relleno (Figura 9).

Primero, se seleccionan unos valores de velocidad de realización del *infill* (mm/s) y del perímetro (mm/s), la velocidad de impresión del extrusor, y la altura de las capas del dispositivo; estos valores se ajustan para obtener un factor de extrusión de 2. Una vez obtenido el factor de extrusión en el menú *Configuration* (Figura 9) y *Settings* → *Extra Configuration*. Se seleccionan los valores utilizados para el cálculo del factor de extrusión. Los diferentes ensayos que se realizaron se muestran en la (Tabla 2, Anexo I). Se diseñaron nueve dispositivos donde se ajustaban los parámetros de la impresión. Finalmente se escogió el dispositivo 23 de la (Tabla 2, Anexo I) que cumplía las características, tales como una menor altura del dispositivo, menor tamaño de poro para disminuir la infiltración de las células en la estructura, y un factor de extrusión de 2 que permite la resolución del *scaffold*. Este dispositivo es la herramienta utilizada para la siembra, crecimiento, proliferación y migración de la línea de glioblastoma humano, U87.

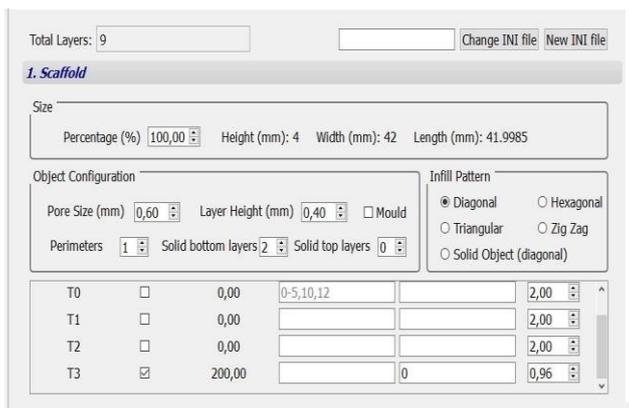


Figura 9. Menú Configuration. En el apartado *Object Configuration*: pore size tamaño poro (mm), layer height altura capa (mm), mould molde, perimeters, perímetros, solid bottom layers, capas de la base, solid top layers capas superiores, T3 velocidad a la que imprime el extrusor (mm/s).

2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR Y ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR EN EL DISPOSITIVO

El objetivo principal fue comprobar que el dispositivo era una herramienta válida para cuantificar la migración de las células U87. Para ello se utilizaran los factores B27 y 2-DG. En el dispositivo la siembra celular se dispone en el centro, se encuentra equidistante respecto al tratamiento con estos factores.

2.1 Preparación de los dispositivos antes de la siembra.

Se preparan los dispositivos para que las calles internas sean uniformes y no queden restos de material PLA, que dificulten la migración celular. Además se lija el exterior con una lima, para homogeneizar la base del dispositivo y evitar la pérdida de células entre los espacios que puedan quedar entre el dispositivo y la placa Petri.

2.2 Esterilización y preparación de los scaffolds para la siembra de células de tejido cortical de rata y línea de glioblastomas humano, U87.

El *scaffold* realizado mediante impresión 3D será el andamio o soporte para nuestra siembra celular, por lo que deberá cumplir una serie de requisitos previos a la siembra. En primer lugar, en condiciones de esterilidad se sumergirán los dispositivos en una solución de etanol 70%, durante noventa minutos. Una vez esterilizados los dispositivos, se dispensará una fina capa de silicona biocompatible (Dow Corning), cubriendo todas las paredes internas de la estructura, con el objetivo de crear un recubrimiento que evite posibles infiltraciones de las células al interior del dispositivo, ya que el material utilizado para confeccionar el dispositivo, el PLA, se trata de un plástico hidrófilo y poroso. Debemos evitar que se produzcan infiltraciones de las células al interior del dispositivo, ya que de ser así, no sabríamos el porcentaje celular de células infiltradas, no siendo reproducible el experimento.

2.3 Preparación de los scaffolds para la siembra de células de tejido cortical de rata y de la línea tumoral de glioblastoma, U87.

Las placas deben ser preparadas previamente para asegurar la adhesión de las células corticales de rata, ya que este tipo de células no se adhieren a la placa directamente. Los reactivos utilizados en este procedimiento son PDL (Sygma Aldrich) o poli-D-lisina, que actúa como un factor de fijación entre las células y sustratos sólidos, mejorando la interacción electrostática entre los iones cargados negativamente de la membrana celular y la

superficie del cultivo. Se dispensó PDL (Sygma Aldrich) en la zona central de la estructura (Figura 7). Otro reactivo utilizado, el tampón fosfato PBS (Phosphate buffered saline), que contiene fosfato de sodio y cloruro de sodio, con el que se realizaron tres lavados, para eliminar los productos de desecho del metabolismo celular. Y por último, se trataron las placas con laminina (Sygma Aldrich), una proteína que ayuda a la adherencia de las células a la placa, y además sirve de apoyo en el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares. Después de los lavados realizados con PBS, se dispensaron la laminina en la zona central, las 24 horas previas a la siembra.

2.4 Aislamiento y siembra de células corticales de embriones de rata.

El período de gestación de los embriones de rata debe ser entre dieciséis y dieciocho días (E 16-17). Se utilizaron Ratas Sprague Dawley provenientes del Animalario de San Juan de la Universidad Miguel Hernández. El procedimiento realizado trata de la separación de las meninges del cerebro y la extracción de la corteza cerebral, separándola del hipocampo. El tejido de la corteza de los embriones se disgregó mecánicamente, añadiendo 1,5 ml de Medio de Tripsinización 0,25% + Glucosa 33 mM por cada cerebro (Tabla 1), se incubó durante quince minutos a 37°C. A continuación, se retira el Medio de Tripsinización y se añade 11 ml de Medio Neutralizante de cultivo primario de corteza cerebral (Tabla 1). Posteriormente, el disgregado se centrifuga durante cinco minutos a 1740 rpm, se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 10 ml de Medio de Cultivo primario de corteza (Tabla 1).

En nuestro caso, la siembra de las células corticales se realizará en el espacio central del dispositivo (Figura 7), el objetivo será poder observar el crecimiento de las células. Una vez resuspendido el precipitado de células corticales en Medio de Cultivo de primario de Corteza, en el paso anterior. Se añadirá tripsina (Gibco), esta enzima romperá las uniones entre las células, se incubará en el baño a 37°C durante diez minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugará la suspensión celular durante cinco minutos a 1740 rpm y después, se retirará el sobrenadante. Y se resuspendieron las células en un mililitro de Medio de Cultivo primario de Corteza. Finalmente, se utilizará la cámara de Neubauer y tinción azul tripán, se trata de un colorante que se introduce en las células cuando la membrana plasmática está dañada, por lo que nos proporciona información acerca de la viabilidad celular. Las células que mantengan su membrana plasmática intacta no resultaran teñidas, al contrario que las células muertas. Para finalizar, se realizará un stock de células del Cultivo primario de Corteza. A partir del número de células obtenidas en un mililitro que se han obtenido con el conteo en la cámara de Neubauer. Se realizó un stock de células del Cultivo primario de Corteza de 500000 células. La siembra se realizó en el espacio central. Transcurridos, 75 minutos se añadieron 3 ml de medio previamente atemperado en el baño a 37°C.

Medio Tripsinización 0,25%+ Glucosa	50% de HBSS (Gibco) y Glucosa 33 mM (Panreac) y 50% de tripsina 0,25% (Gibco)
Medio Neutralizante cultivo primario de corteza cerebral	50% de HBSS (Gibco), 2% de FBS (Biowest) y 48% de Glucosa 33 mM (Panreac)
Medio Cultivo primario de Corteza	95% Neurobasal Medium (1X) (-L- glutamina, -phenolred; Gibco), 2% B27 Supplement (Gibco), 2% FBS (Biowest), 0,5% Glutamax (Gibco) y 0,5% penicilina-estreptomicina (Gibco)

Tabla 1. Medios para cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata.

2.5 Siembra de línea tumoral humana de glioblastoma, U87

La siembra del dispositivo con células de cultivo primario de células corticales de rata no funcionó correctamente, ya que las células no se adherían a la placa. Debido a ello, se optó por sembrar otro tipo de células, una línea tumoral humana de glioblastoma, U87 (ATCC-American Type Culture Collection). En este caso, además del crecimiento de las células se podría observar mejor su proliferación y realizar estudios de migración celular, que podrían dar lugar a estudios de metástasis, en ensayos posteriores. En el caso de las líneas tumorales no es necesario el recubrimiento de la placa con PDL y laminina, ya que se adhieren directamente.

Para realizar el cultivo de una línea tumoral se ha de realizar el método de tripsinización (Tabla 2). La monocapa de células debe ser continua y uniforme. En nuestro caso, al tratarse de células de glioblastoma deberán poseer una forma alargada y plana y se observará cómo establecen conexiones con las células de alrededor. Se realizarán dos lavados en la placa de U87, para eliminar los productos de desecho del metabolismo celular. Después se añadirá tripsina, la placa se introducirá durante cinco minutos en el incubador a 37°C, para que actúe el enzima. Después se añadirá medio neutralizante, para que la tripsina deje de actuar. A continuación, se procederá a la centrifugación para concentrar las células en un pellet, se eliminará el sobrenadante y se resuspenderán las células en un mililitro de medio celular. Después, se llevará cabo el conteo de las células con la cámara de Neubauer. Finalmente, se realizará el stock celular de 225000 células/ml, para sembrar una densidad celular de 75000 células en el centro de la placa en un volumen de 3000 ml de medio celular.

La siembra se realizará de la misma forma que en el cultivo primario de tejido cortical, en el espacio central del *scaffold* (Figura 7) para poder medir posteriormente la migración celular frente a estímulos migratorios. Transcurrido un período de 70 minutos se añadirá el Medio de la Línea Tumoral de Glioblastoma, U87 (Tabla 2), previamente atemperado en el baño a 37°C. Las células se incubaron a 37°C, 5%CO₂. Se continuó la línea de experimentos en DIV 4 (*Days in vitro*).

Medio Tripsinización 0,25%+ Glucosa	50% de HBSS (Gibco) y Glucosa 33 mM (Panreac) y 50% de tripsina 0,25% (Gibco)
Medio Neutralizante	10% suero, 90 RPMI
Medio Línea Glioblastoma, U87	90% DMEM, 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Biowest), penicilina-streptomina 1:100

Tabla 2. Medio de cultivo de la Línea tumoral de glioblastoma, U87.

Por otro lado, se deberá proceder al mantenimiento de la línea celular, para perpetuar su existencia. Para ello tras tripsinizar las células, se deberá sembrar, a partir de la suspensión celular sobrante, en una placa de Petri.

3. Tratamiento con factor de crecimiento neuronal B27 y 2-desoxy-D-glucosa

Se realizaron diferentes siembras a partir de la línea tumoral humana de glioblastoma, U87; en diferentes *scaffolds*, con el fin de comprobar la compatibilidad de la siembra en el dispositivo. Una vez establecido esto, y tratándose de una línea tumoral, se deseaba observar cómo reaccionarían las células frente a diferentes estímulos. En este caso, tras la búsqueda bibliográfica, se seleccionaron el factor de crecimiento neuronal B27

[37] y 2-desoxy-D glucosa. In vitro, se ha demostrado que la 2-desoxi-D-glucosa induce autofagia, incrementa la producción de ROS y activa la AMPK [38]. Se deseaba estudiar si el factor B27 afectaría al crecimiento y migración de las células de glioblastoma, y de ser así, si se observarían gradientes de migración positiva hacia el compuesto.

En cuanto, a la 2-desoxy-D glucosa, como se ha explicado anteriormente, se trata de un análogo de la glucosa, su mecanismo de acción estriba en su unión a la hexoquinasa. La 2-DG posee un grupo hidrógeno –H, en lugar, del grupo hidroxilo –OH que presenta la glucosa; por lo que no puede realizar la glucólisis, resultando tóxico para las células. La 2-desoxy-D glucosa (Sigma Aldrich) se ensayó a una concentración de 10 mM. Del factor B27 se ensayan concentraciones de 0,83x y 2,5x, a partir de un stock de B27 de 50x (Sigma Aldrich). Los factores estimulantes se dispondrán en el dispositivo en las aberturas de los extremos (Figura 10). Los compuestos se dispondrán en extremos opuestos, para no contaminar los resultados. El estudio se realizó hasta la entrada de las células en apoptosis y muerte celular.

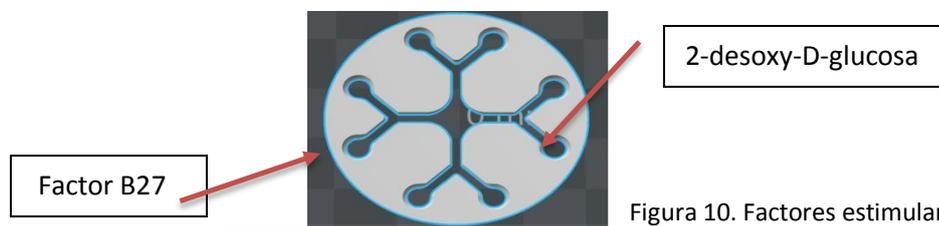


Figura 10. Factores estimulantes.

4. Tinción y ensayo de toxicidad del marcador nuclear HOECHST.

Tras realizar el tratamiento con el factor B27 y la 2-desoxy-D-glucosa, se analizarán los resultados todos los días. En ellos se deberá estudiar el posible efecto en el crecimiento, proliferación y migración de estos compuestos en las células U87. Para ayudarnos en el conteo de la densidad celular de las células U87, se optó por utilizar un marcador fluorescente, el HOECHST, se trata de un colorante que se une a los ácidos nucleicos, por lo que utilizando este compuesto, teñiremos los núcleos celulares, obteniendo una mejor visualización de las células. Los núcleos quedarán de color azul. El HOECHST se une al surco menor de ADN de doble cadena con preferencia por secuencias ricas en adenina y timina. Aunque este marcador fluorescente pueden unirse a todos los ácidos nucleicos, las cadenas de ADN bicatenarias ricas en A-T aumentan considerablemente la fluorescencia. [39]. Es excitado por luz UV a 350 nm, emiten luz fluorescente azul alrededor de un máximo de espectro de emisión a 461 nm.

Dada su interacción con el DNA, se trata de un marcador nuclear tóxico para las células. Se ensayaron diferentes concentraciones para hallar una concentración biocompatible con estas células, que nos permitiera analizar mejor el comportamiento de las células frente a los estímulos utilizados. Se ensayó una concentración 1:300 1:600 y 1:500 (HOECHST: Medio Celular Línea U87) y control negativo con el Medio Celular Línea U87. Se deseaba hallar una concentración óptima en la que los núcleos celulares resultaran teñidos, y a la vez reducir su toxicidad. El cultivo para evaluar la toxicidad del HOECHST se realizó durante 48 horas.

5. Ensayo tratamiento con factor B27 mediante colágeno

En los experimentos anteriores, el tratamiento se había depositado directamente junto con en el medio de cultivo. Por lo que el siguiente paso, era englobar el tratamiento en un medio semi-sólido, que permitiera limitar la zona que contenía el estímulo, evitando que no se diluyera en el medio de cultivo. Con el objetivo de conseguir de forma controlada, estudios de gradientes de migración de las células de glioblastoma. Para ello, se deberá estudiar un material que logre difundir el tratamiento y que a la vez sirva como soporte del mismo. Se optó por el colágeno tipo I (Sigma Aldrich) (Figura 11) [40]. Una proteína trimérica con estructura de tripe hélice; ampliamente utilizado en la encapsulación de células y otros compuestos en cultivo 3D [40].

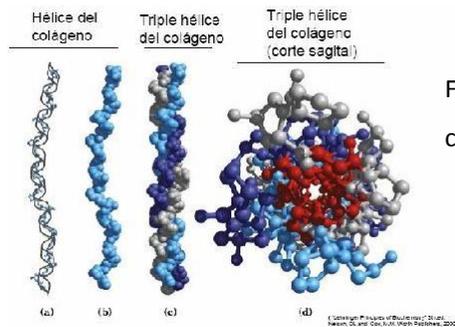


Figura 11. Estructura tripe hélice de colágeno tipo I [40].

Se procederá a realizar una formulación concreta para realizar el soporte de colágeno, en la que se utilizarán los siguientes reactivos: NaOH a una concentración de 40 g/ml, colágeno tipo I a una concentración de 3,81 mg/ml, Medio de la Línea de Glioblastoma U87 (Tabla 2), y factor B27 en concentraciones 10x y 5x, respectivamente. Todo el procedimiento se deberá llevar a cabo a 4°C, para evitar que el colágeno gelidifique, antes de dispensarlo en el dispositivo. Se dispondrán sendos volúmenes de 100 µl a las concentraciones de 10x y 5x, en dos de las bifurcaciones de los carriles. Al igual que los tratamientos realizados anteriormente, los estímulos fueron colocados en carriles opuestos para evitar la contaminación de las calles (Figura 12). Se esperará a que el colágeno tipo I gelidifique, para ello se introduce en le incubador entre 15 y 30 minutos a 37°C. Finalmente, se introducen las placas al incubador a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂.

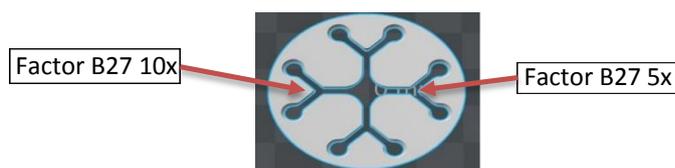


Figura 12. Disposición de la gota de colágeno con las concentraciones de B27 a 10 y 5x, respectivamente.

6. Análisis de los resultados obtenidos

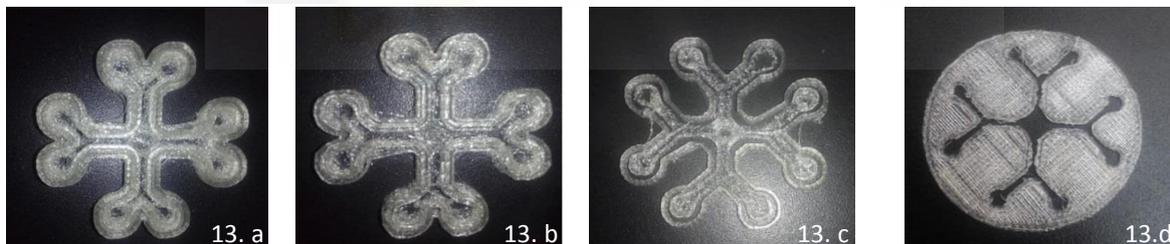
Durante todos los días se realizaron fotografías con el microscopio OLYMPUS IX51 de toda la estructura y se analizó un área total en 4050 x 4050 mm² en los carriles laterales adyacentes al punto de administración de los factores migratorios factor B27 y 2-DG, y de 5400 x 5400 mm² en el círculo del extremo donde se disponían los tratamientos con 2-DG (10 mM) y factor B27, en las concentraciones de 0,83x y 2,5x. El montaje y procesado de las imágenes se realizó con los programas PRO PANORAMA EDIT 3, PHOTOSTAMP REMOVER y PAINT 3D y el conteo de la densidad celular con el programa IMAGEJ. Los estudios se mantuvieron hasta la entrada de las células en apoptosis y muerte celular.

RESULTADOS

1. OPTIMIZACIÓN DE LA IMPRESIÓN DEL DISPOSITIVO

En la Figura 13 (a-d) se muestran las estructuras resultantes con los diseños y los parámetros utilizados en la (Tabla 2, Anexo I) construidos con la bioimpresora Regemat 3D: la Figura 13.a corresponde al diseño *celv_2* y al *scaffold 4*, la Figura 13.b corresponde al diseño *celv_1* y al *scaffold 3*, la Figura 13.c corresponde al diseño *celv_3* y al *scaffold 5*; y por último, la Figura 13.d corresponde al diseño *celv_7* modificado y al *scaffold 23*. También se imprimieron otros dispositivos con diferentes parámetros como muestra la (Tabla 2, Anexo I). Finalmente se descartaron estos dispositivos, ya que el resultado de impresión no poseía una base sólida y uniforme que contuviera las células durante el estudio. Otro factor a optimizar, fue el tiempo de impresión de los dispositivos, en estas versiones era muy elevado, superior a 4 horas. La Figura 13.d muestra el diseño que se seleccionó para la siguiente parte experimental en la que se optimizó la parte de la siembra y el estudio de migración de la línea tumoral de glioblastoma humano, U87 en el dispositivo.

La selección del diseño *celv_7* modificado y los parámetros con los que se realizó el *scaffold 23*, como se muestra en el apartado de optimización de la impresión del dispositivo, fue debido a que era la estructura que mejor cumplía con los requisitos establecidos para la siembra y la migración de las células U87; presentaba un base sólida, calles accesibles y constaba de dimensiones menores que los diseños probados con anterioridad (Tabla 1, Anexo I). Además presentaba un *infill* uniforme alrededor de la estructura, que dificultaría la salida de las células de la zona de estudio.



2. OPTIMIZACIÓN DEL DISPOSITIVO EN ESTUDIOS IN VITRO:

Se comprobó si el dispositivo creado era válido para estudiar la viabilidad y la posible migración de las células de la línea tumoral de glioblastoma humano, U87, frente a diferentes estímulos. Se realizaron tres experimentos: el tratamiento con el factor B27 a concentraciones de 0,83x y 2,5x y el tóxico celular 2-desoxy-D-glucosa (10 mM); el mismo tratamiento junto con el marcador nuclear HOECHST (1:300) y el tratamiento con el factor B27 a las concentraciones 10x y 5x embebido en colágeno. El tratamiento se aplicó en los círculos de los extremos de la estructura (Figura 10). Los resultados se analizaron durante los días: DIV 3, DIV 4, DIV 7, DIV 9 y DIV 12 (*days in vitro*). Con el objetivo de analizar si existe una variación de la viabilidad celular y la migración en el dispositivo, se cuantificó la densidad celular tanto en el carril adyacente, como en el círculo en el cual se administró el tratamiento (Figura 10).

2.1 Tratamiento con factor de crecimiento neuronal B27 y 2-desoxy-D glucosa

➤ Ensayo con 2-desoxy-D-glucosa (10 mM):

El tratamiento con 2-DG (10 mM) se realizó en DIV 3, los resultados mostrados en DIV 3 se obtuvieron antes de realizar el tratamiento con 2-DG (10 mM). En la Figura 14.a y b se muestra la variación de la densidad celular en los días de estudio DIV3; DIV 4, 24 horas después del tratamiento y DIV 7, cuatro días después del tratamiento con 2-DG (10 mM). El área donde se contabilizó la densidad celular fue de 4050 x 4050 mm² en el carril y 5400 x 5400 mm² en los círculos donde se dispuso la 2-DG (10 mM) y el factor B27 (0,83x) y (2,5x). En la Figura 14.a se observa que tras un descenso de la densidad celular en DIV 4, la densidad celular incrementa un 45% en DIV 7, respecto al día de inicio del tratamiento (DIV 3). El estudio se realizó hasta la visualización de la entrada de las células en apoptosis y muerte celular. En la Figura 14.b en el control sin tratamiento se contabilizaron 1263 células U87. Dicho valor desciende a 646 células en DIV 4, 24 horas después del tratamiento con 2-DG (10 mM) y en DIV 7, 4 días después del tratamiento, incrementa de nuevo, a un total de 1096 células; es decir se observa una descenso de la densidad del 51% en DIV 4, que vuelve a incrementarse hasta el 70% en DIV 7 respecto DIV4.

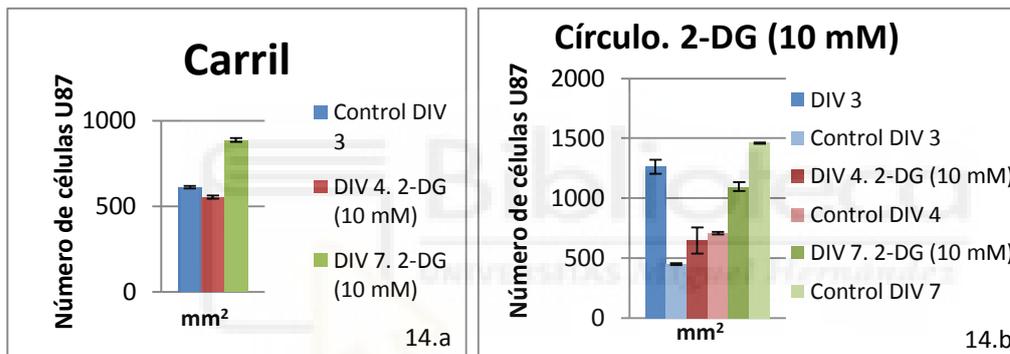


Figura 14 (a-b). Variación de la densidad celular de U87 después de la administración de 2-DG (10 mM) en el control sin tratamiento DIV 3; DIV 4 y DIV 7; 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. En la Figura 14.a se estudia el carril lateral adyacente a la zona de administración de la 2-DG (10 mM). En la Figura 14.b se observa la densidad celular en el círculo donde se administra la 2-DG (mM). El contaje de la densidad celular se realizó con el programa IMAGE J.

La migración celular de U87, se contabilizaba en el carril adyacente al círculo del extremo donde se disponía el tratamiento, ya sea con el factor B27 a concentraciones de 0,83x y 2,5x o la 2-DG (10 mM) (Figura 15.a). Se estudió la densidad celular desde la zona 1 o comienzo del carril, a la zona 3 o zona más próxima al círculo donde se administró el tratamiento. Con el objetivo de evaluar si existían diferencias entre la densidad celular en función de la distancia al tratamiento.



Figura 15 (a-b). En la Figura 15.a se observa el dispositivo seleccionado para la siembra, la zona marcada con una flecha fue donde se realizó el estudio de migración celular U87. En la Figura 15.b se observa la zona del carril ampliada. Reconstrucción 4x realizada con el microscopio OLYMPUS IX51 y el programa PANORAMA EDIT 3 el día del control sin tratamiento (DIV 3). Escala 500 μm .

En la Figura 16 (a-c) se observa la migración celular de U87 desde la zona más alejada del tratamiento con 2-DG (10 mM) o zona 1, a la zona más cercana al punto de administración de 2-DG (10 mM) o zona 3, en los días de estudio, en el control sin tratamiento DIV 3; DIV 4 y DIV 7, 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. En el control sin tratamiento (DIV 3), mostrado en la Figura 16.a se observa un incremento de la densidad celular U87 en la zona 2, que desciende a valores similares a los iniciales en la zona 3. En DIV 4 (Figura 16.b) se observa también un incremento en la zona 2, que desciende ligeramente en la zona 3. Se observa un incremento neto de la densidad celular del 17% entre la zona 1 y la 3. En la Figura 16.c se muestra un descenso neto del 12% ente la zona 1 y la 3.

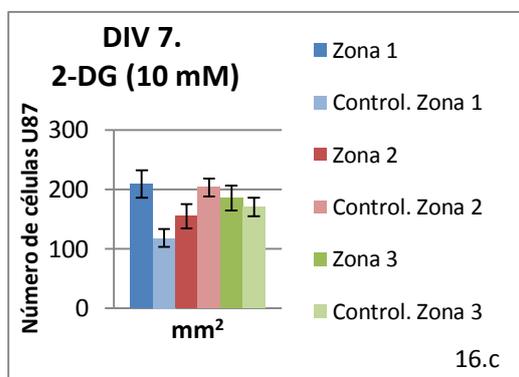
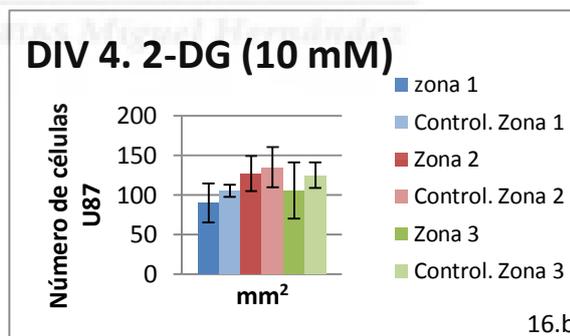
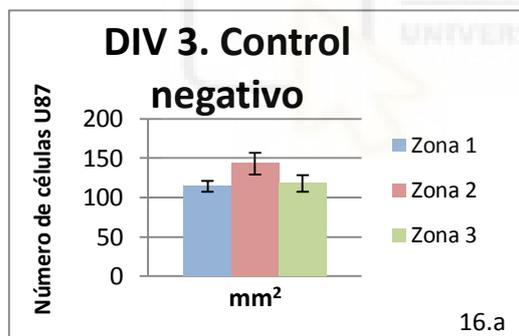
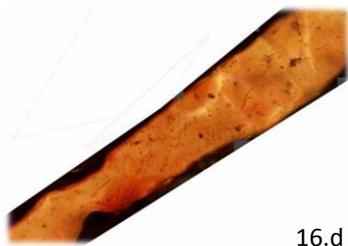
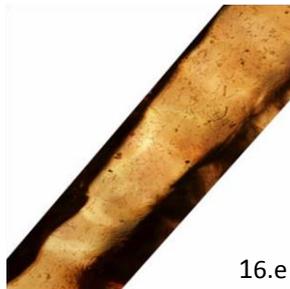


Figura 16 a-c. Estudio de la migración celular de U87 desde la zona más alejada del tratamiento con 2-DG (10 mM) o zona 1, a la zona 3 o zona más cercana al punto de administración del tratamiento con 2-DG (10 mM); durante los días del control sin tratamiento DIV 3; DIV 4 y DIV 7, 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. El conteo de la densidad celular se realizó con el programa IMAGE J.



16.d



16.e

Figura 16 d-e. Reconstrucción 4x realizada con el microscopio OLYMPUS Ix51 y el programa PRO PANORAMA EDIT 3 donde se estudia la migración celular de U87 después de 24 horas (Figura 16.d) y de 4 días (Figura 16.e) de la administración del tratamiento con 2-DG (10 mM). Desde la zona 1 o zona más alejada del tratamiento (bajo-izquierda), a la zona 3 o zona más cercana al tratamiento con 2-DG (10 mM) (arriba-derecha). Escala 500 μm .

Ensayo con factor de crecimiento neuronal B27

Se estudiaron concentraciones de 0,83x y 2,5x, a partir de un stock de concentración de 50x.

➤ Ensayo con el factor B27 (0,83x):

En la Figura 17 (a-b) se muestra la densidad celular de U87 en respuesta al tratamiento con el factor B27 (0,83x), en los días de estudio del control sin tratamiento DIV3, DIV4 ; 24 horas después del tratamiento y DIV 7, cuatro días después del tratamiento con el factor B27 a una concentración de 0,83x. En la Figura 17.a se estudia el carril lateral adyacente al punto de administración del tratamiento con B27 (0,83x), se observa un descenso gradual neto del 42% entre DIV 3 y DIV 7. En la Figura 17.b, se estudia la densidad celular de U87 en el círculo donde se dispuso el factor B27 (0,83x). Se observa un incremento de la densidad celular de U87 de un 92% entre el control sin tratamiento (DIV 3) y DIV 7, 4 días después de la administración del factor B27 (0,83).

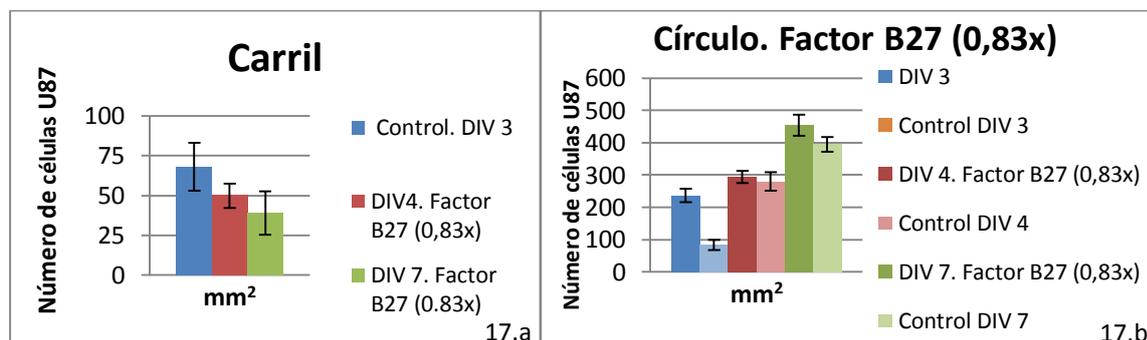


Figura 17 (a-b). Variación de la densidad celular de U87 después de la administración de B27 (0,83x) DIV 3; DIV 4 y DIV 7; 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. En La Figura 17.a se estudia el carril lateral adyacente a la zona de administración de B27 (0,83x). En la Figura 14.b se observa la densidad celular en el círculo donde se administra B27 (0,83x). El conteo de la densidad celular se realizó con el programa IMAGE J.

En la figura 18 (a-c) se muestra el estudio de la migración celular de U87 en respuesta al factor B27 (0,83x); durante los días DIV 3; DIV 4 y DIV 7, 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. La migración celular de U87, se estudió en el carril lateral adyacente al punto de administración del tratamiento con el factor B27 (0,83x); desde la zona 1, la más alejada del tratamiento, hasta la zona más cercana al punto de administración del tratamiento o zona 3. En la Figura 18.a, se observa que la densidad celular de U87 es más elevada en la zona intermedia del carril en el control negativo (DIV3). La figura 18.b, muestra la variación de la densidad en el carril después de 24 horas de la administración del factor B27 (0,83x). Se observa un incremento gradual de densidad celular de U87 entre la zona 1 y la zona 3. En la figura 18.c, la densidad celular aumenta un 69% entre la zona más alejada del tratamiento con B27 (0,83x) o zona 1 respecto a la zona más cercana a la administración del factor B27 (0,83x) o zona 3.

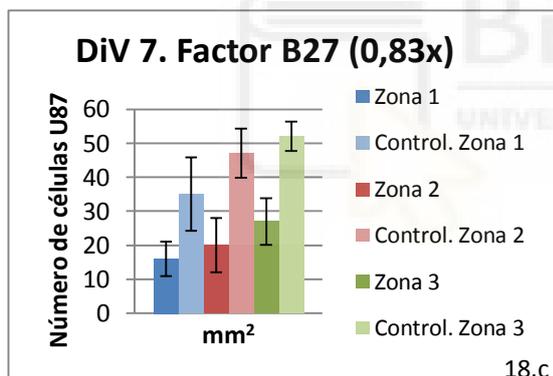
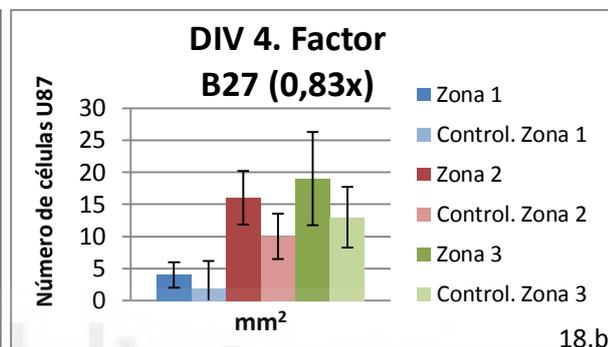
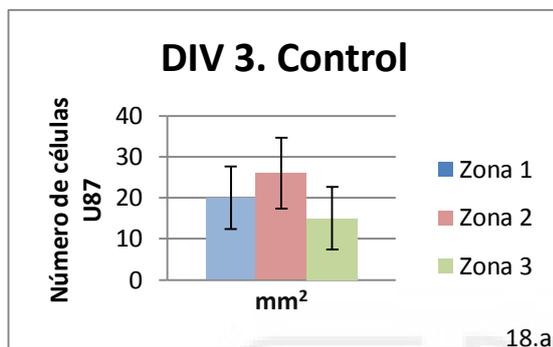


Figura 18 a - c. Estudio de la migración celular de U87 desde la zona más alejada del tratamiento con B27 (0,83x) o zona 1, a la zona 3 o zona más cercana al punto de administración del tratamiento con B27 (0,83x), durante los días del control sin tratamiento DIV 3; DIV 4 y DIV 7, 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. El conteo de la densidad celular se realizó con el programa IMAGE J.

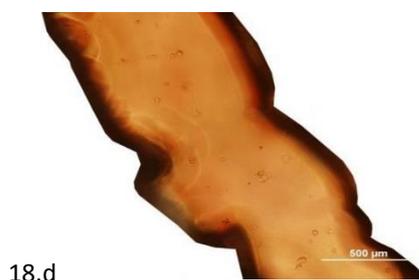


Figura 18 (d-e). Reconstrucción del carril 4x en DIV 4 (Figura 18 e) y DIV 7 (Figura 18 f) con el microscopio OLYMPUS Ix51 y el programa PRO PANORAMA EDIT 3, después de 24 horas y 4 días del tratamiento con el factor B27 (0,83x), respectivamente. En la figura 18.d, se observa la zona 1 o zona más alejada del tratamiento con B27 (0,83x) (arriba-izquierda) y la zona 3 o la zona más cercana al tratamiento (bajo-derecha). Escala 500 µm. En la Figura 18.f se observa la zona 1 (arriba- izquierda) y la zona 3 (bajo-derecha). Escala 500 µm.

➤ **Ensayo de Factor B27, concentración 2,5x:**

En la figura 19.a se observa la densidad celular de la línea tumoral de glioblastoma, U87 en los días de estudio del control sin tratamiento DIV 3, DIV4 y DIV7. El tratamiento de factor B27 (2,5x) se dispuso en DIV 3 y servirá como referencia del control sin tratamiento del factor B27 (2,5x). En el control sin tratamiento se observa una densidad celular de 207 células/mm²; los valores de DIV 4 y DIV 7 se mantienen en valores de 143 células/mm² y 154 células/mm², respectivamente. En la figura 19.b, se muestra la densidad celular de U87 en el círculo donde se dispuso el factor 27 (2,5x), en DIV3, DIV4 y DIV 7. Los valores de densidad celular de U87 fueron 495 células/mm² en el control sin tratamiento, tras un descenso a 354 células/mm², se incrementó el valor en 593 células/mm² después de 4 días del tratamiento con B27 (2,5x). Resultando un aumento neto del 20% entre DIV 3 y DIV 7.

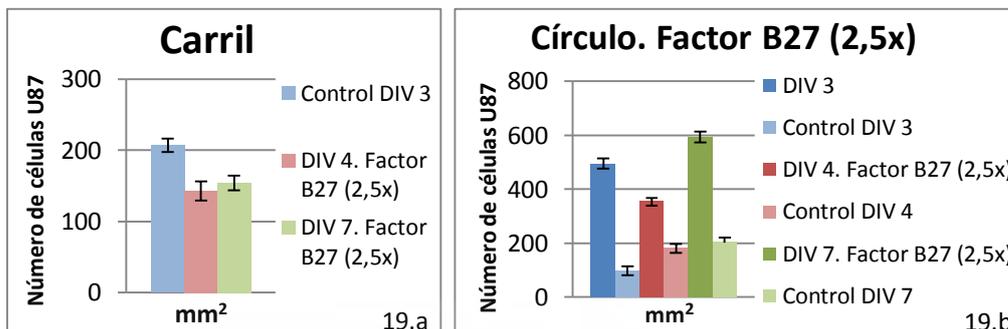


Figura 19 (a-b). Variación de la densidad celular de U87 después de la administración del factor B27 (2,5x) en el control sin tratamiento DIV 3; DIV 4 y DIV 7, 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. En La Figura 19.a, se estudia el carril lateral adyacente a la zona de administración de la factor B27 (2,5x). En la Figura 19.b, se observa la densidad celular en el círculo donde se administró el factor B27 (2,5x). El conteo de la densidad celular se realizó con el programa IMAGEJ.

En la figura 20 (a-c) se muestra un estudio de la migración celular de U87 como respuesta al tratamiento con B27 (2,5x) en función del tiempo. Se estudió el control sin tratamiento DIV 3 y los días con tratamiento DIV 4, DIV 7; 24 horas y 4 días después de la administración del factor B27 (2,5x), respectivamente. La migración celular de U87 se estudió de igual forma que en el apartado anterior. Desde la zona más alejada del tratamiento con el factor B27 (2,5x) (zona 1), a la zona adyacente al tratamiento (zona 3). En la figura 20.a se representa la migración celular de U87 el día del control sin tratamiento, se observa un valor de 59 células/mm² en la zona1, y valores similares en torno a 70 células/mm² en las zonas 2 y 3. En la figura 20.b se muestra un aumento de la densidad celular de U87 en la zona media del carril respecto a la zona adyacente al tratamiento con el factor B27 (2,5x), con valores de 65 células/mm² y 37 células/mm², respectivamente. En la figura 20.c, se observa un incremento gradual de la densidad celular de U87 desde la zona más alejada del tratamiento con B27 (2,5x) a la zona adyacente al tratamiento, con valores de 44 células/mm² y 60 células/mm², respectivamente.

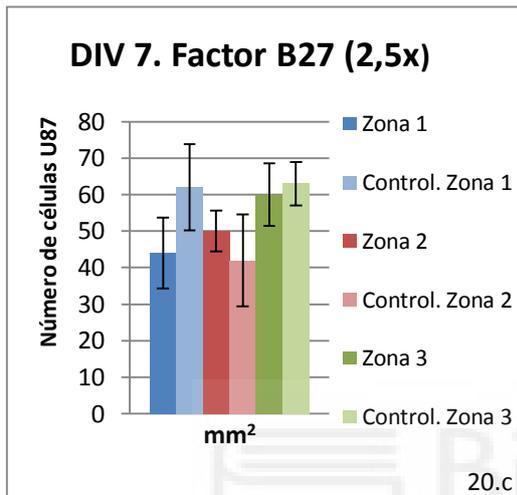
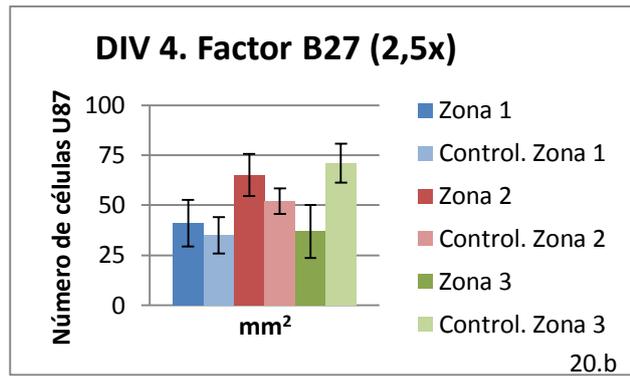
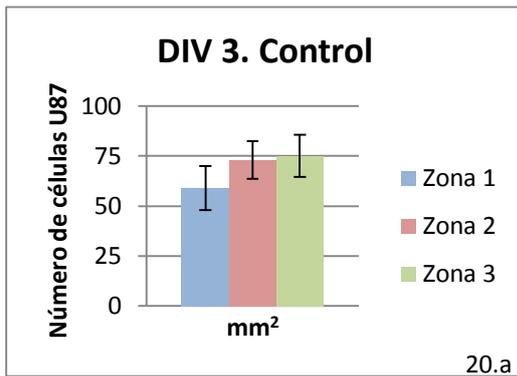


Figura 20 a-c. Estudio de la migración celular de U87 en respuesta al factor B27 a una concentración de 2,5x; durante los días del control sin tratamiento (DIV 3), DIV 4 y DIV 7; 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente. Se estudian las zonas, desde la más alejada del tratamiento con el factor B27 a una concentración de (2,5x) (zona 1), hasta la zona más cercana al punto de administración del tratamiento con factor B27 a una concentración de (2,5x) (zona 3). Contaje realizado con IMAGE J.

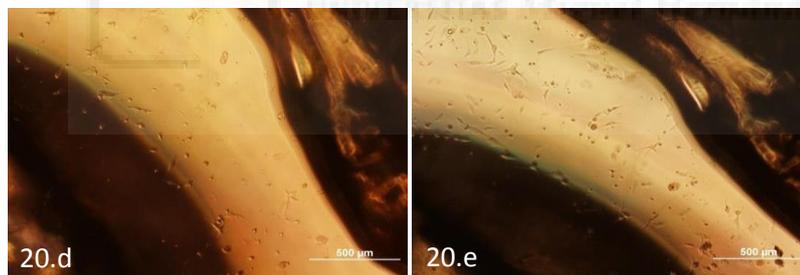


Figura 20 (d-e). Reconstrucción 4x del carril en DIV 4 (Figura 20.d) y DIV 7 (Figura 20.e) con el microscopio OLYMPUS Ix51 y el programa PRO PANORAMA EDIT 3; 24 horas y 4 días después del tratamiento con factor B27 (2,5x). En la Figura 20.d se observa la zona 3 o más cercana al tratamiento con factor B27 (2,5x) en DIV 4 y en la Figura 20.e en DIV 7. Escala 500 µm.

2.2 Ensayo con marcador nuclear HOECHST

Este ensayo se realizó para contribuir en el análisis y contabilización de las células U87 de los carriles de las distintas fotografías, tomadas en las placas tratadas con el factor B27 a las concentraciones de 0,83x, 2,5x y 2-DG (10mM). El HOECHST es un marcador nuclear, observaremos los núcleos de las células U87 de color blanco en un fondo azul. Como se indica en el apartado de material y métodos, el Hoechst resulta tóxico para las células. Basándonos en estudios anteriores realizados en el laboratorio; primero, se ensayó una concentración 1:300. Esta concentración resultó tóxica para las células U87, por lo que posteriormente se realizaron varios ensayos a 1:500 y 1:600, para establecer una dosis que no fuera tóxica para las células.

➤ **Tratamiento: 2-DG (10 mM) y HOECHST (1:300)**

En la figura 21.a se observa la densidad celular de U87 durante los días de estudio del control sin tratamiento DIV 3; los días del tratamiento con 2-DG (10 mM), DIV4 y DIV7, 24 horas y 4 días después de la administración del tratamiento con 2-DG (10mM), respectivamente; y los días que se estudió el tratamiento y el marcaje nuclear con HOECHST (1:300), DIV 9 y DIV 12, después de 6 y 9 días del tratamiento con 2-DG (10mM), respectivamente. El área donde se contabilizó la densidad celular de U87 fue de 4050 x 4050 mm². En la Figura 21.a se observa que tras experimentar diferentes variaciones en la densidad celular durante los días de estudio, finalmente en DIV 12 la densidad se mantiene en 260 células, un valor similar al del inicio del estudio (DIV3). En la Figura 21.b la densidad celular de U87 desciende un 63% en DIV 12, 9 días después de la administración del tratamiento con 2-DG (10mM), respecto al control sin tratamiento (DIV3).

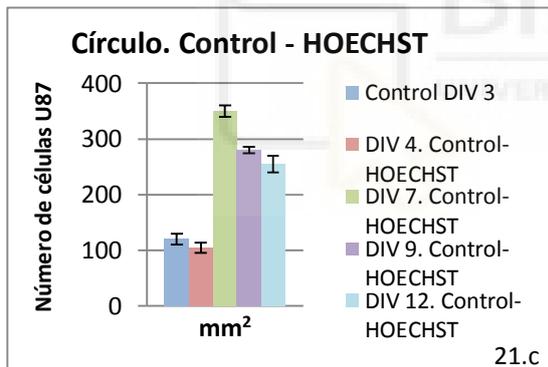
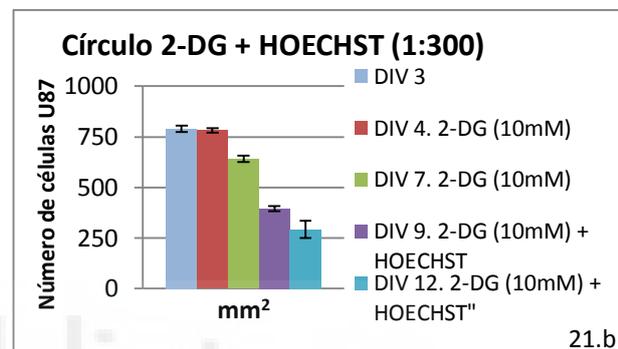
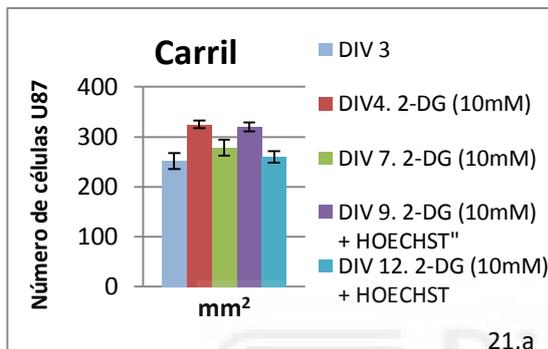


Figura 21 (a-b). Densidad celular en el carril y en el círculo donde se administró el tratamiento con 2-DG (10 mM), de los días de estudio DIV 3, DIV 4 y DIV7, 24 horas y 4 días después del tratamiento, respectivamente; y DIV 9 y DIV 12, 6 y 9 días después del tratamiento, respectivamente, junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300). Las células se contabilizaron con el programa IMAGE J

La Figura 22 muestra el resultado de la migración celular de U87 desde la bifurcación hasta el círculo donde se dispuso el tratamiento de 2-DG (10 mM). Las barras de la izquierda, muestran la zona 1 o la más alejada del carril, donde se dispuso el tratamiento de 2-DG (10 mM). La barras intermedias, muestran la zona intermedia del carril o zona 2 y las barras de la derecha muestran la zona 3 o zona más cercana al tratamiento de 2-DG (10 mM). En cada zona se observan los cinco días de estudio: el control sin tratamiento (DIV 3), 24 horas después del tratamiento (DIV 4), 4 días después del tratamiento (DIV 7); y DIV 9 y DIV 12, 6 y 9 días después del tratamiento de 2-DG (10 μM) junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300). La densidad celular de U87 se cuantifica en un área total de 4050 x 4050 mm². La densidad celular de U87 aumentó un 56% en DIV 4 frente al control sin tratamiento (DIV 3) en la zona 1 o la más alejada de donde se dispuso la 2-DG (10μM), después de 24 horas del tratamiento con 2-DG (10 μM). Con un aumento neto del 103% en la zona. Los valores en la zona 2 o zona intermedia disminuyen en un 34% en los diferentes días de estudio. En la zona 3 o zona más cercana al

tratamiento con 2-DG (10 mM), se observan valores de densidad celular más bajos, excepto en DIV 9, donde se trató con el marcaje nuclear HOECHST (1:300), alcanzando las 111 células/mm².

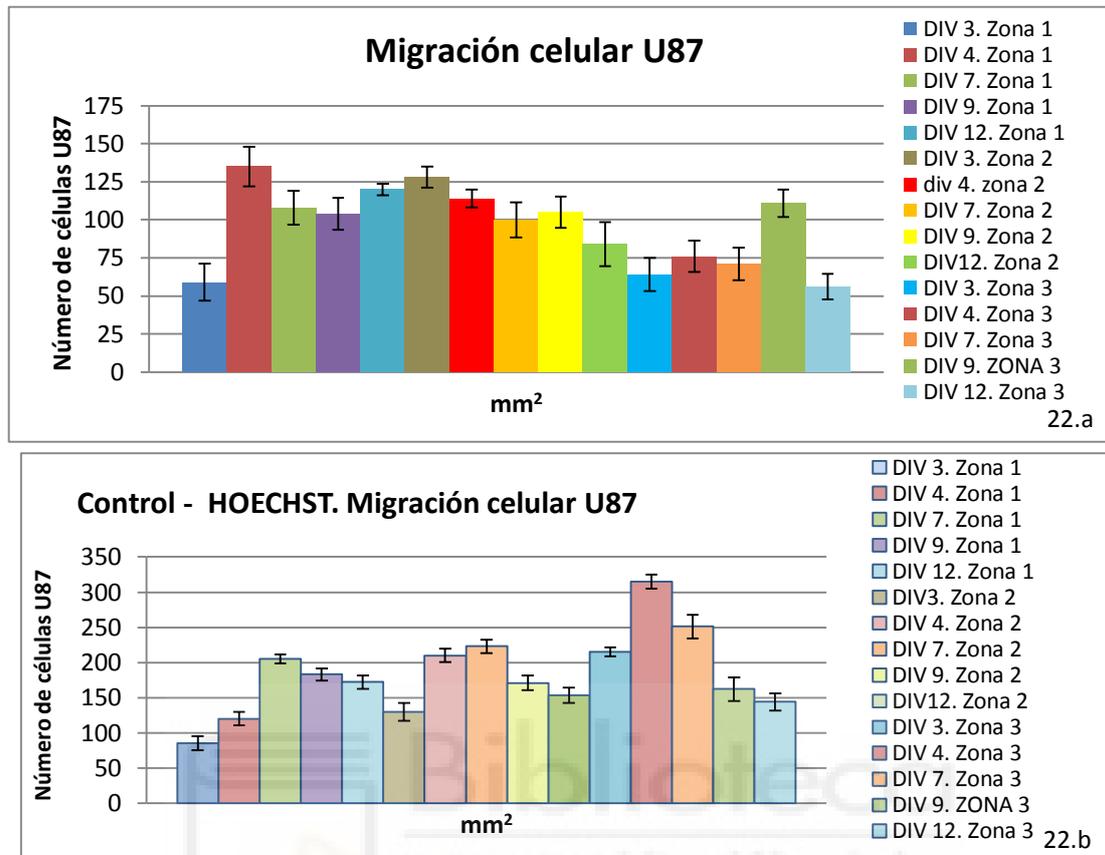


Figura 22 (a-b). Figura 25 a. Migración celular de U87 en el carril adyacente al tratamiento del factor B27 (0,83x). División en zonas desde la más alejada (izquierda) o zona 1, a la más clara (derecha), zona adyacente al tratamiento con el factor B27 (0,83x) o zona 3. Figura 25 b. Control negativo de la gráfica anterior.

En la figura 23 (a-b) se muestran las imágenes del carril de la zona 1 en los días DIV 4, 24 horas después del tratamiento con 2-DG (10 mM) a la zona 3 (Figura 23.a); y la zona 3 de DIV 12, 9 días después del tratamiento con 2-DG (10 mM) junto con el marcaje nuclear con HOECHST (1:300) (Figura 23.b).

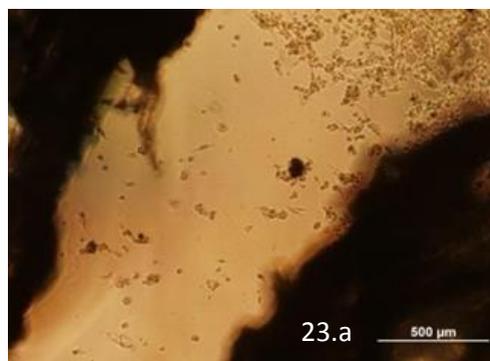


Figura 23.a. Fotografía 5x del carril de la zona 3 o más cercana al tratamiento con 2-DG(10 Mm) en DIV 4, 24 horas después del tratamiento con 2-DG. Escala 500 μm

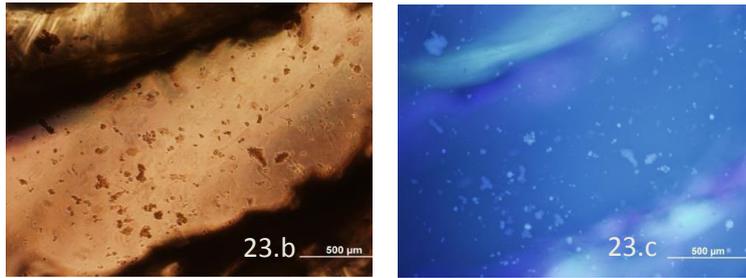
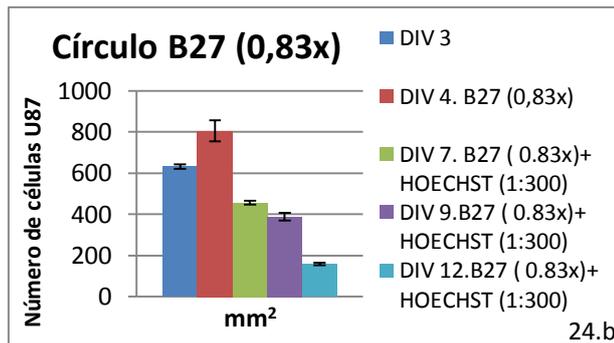
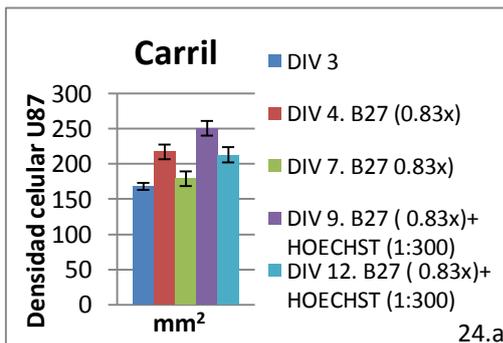


Figura 23 b-c. Reconstrucción 5x del carril realizada con el microscopio óptico invertido OLYMPUS Ix51 y el programa PRO PANORAMA EDIT 3, de la zona 3 o zona adyacente al tratamiento con 2-DG (10 Mm) en DIV 12, 9 días después del tratamiento con 2-DG y HOECHST (1:300). La Figura 23.c muestra la misma imagen que la fotografía anterior junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300). Escala 500 µm.

➤ **Tratamiento con Factor B27 (0,83x) y HOECHST (1:300):**

En la figura 24.a se observa la densidad celular de U87 durante los días de estudio del control sin tratamiento DIV 3; los días del tratamiento con factor B27 a una concentración 0,83x, a partir de un stock de concentración de 50x (DIV 4) y (DIV 7) y los días del tratamiento con factor B27 a una concentración 0,83x y el marcaje nuclear con HOECHST (1:300), DIV 9 y DIV 12, 6 y 9 días después del tratamiento, respectivamente. La densidad celular de U87 se cuantifica en un área total de 4050 x 4050 mm². En el control sin tratamiento (DIV 3) se contabilizaron 168 células. Esta densidad celular aumentó en los días DIV 9 y DIV 12, en 251 y 213 células, respectivamente; la densidad celular aumentó un 27% respecto al control sin tratamiento. En la figura 24.b, después de 24 horas del tratamiento con el factor B27 (0,83x), la densidad celular aumentó un 27% respecto al control sin tratamiento. Posteriormente, la densidad celular comenzó a disminuir hasta un mínimo de 158 células en DIV 12, respecto a las 632 células del control sin tratamiento. Entre DIV 3 y DIV 12 se observa un descenso del 75% en la densidad celular.



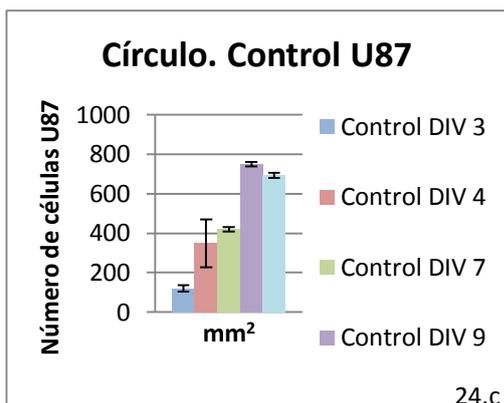
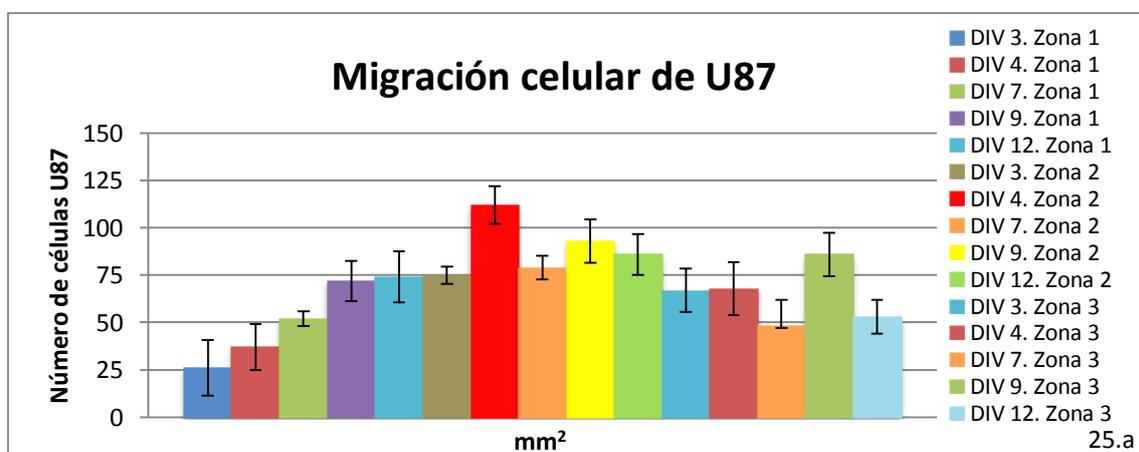


Figura 24 (a-c). Variación de la densidad celular de U87 después de la administración del factor B27 (0,83x) en el control sin tratamiento DIV 3; DIV 4 y DIV 7, 24 horas y 4 días, respectivamente; DIV 9 y DIV 12, 6 y 9 días después del tratamiento. En La Figura 24.a se estudia el carril lateral adyacente a la zona de administración del factor B27 (0,83x). En la Figura 24.b se observa la densidad celular en el círculo donde se administró el factor B27 (0,83x). El contaje de la densidad celular se realizó con el programa IMAGEJ.

La figura 25.a muestra el resultado de la migración celular de U87 en el carril adyacente al círculo donde se dispone el tratamiento del factor B27 (0,83x). Las barras de la izquierda, muestran la zona 1 o zona más alejada del carril, donde se administró el tratamiento de factor B27 (0,83x). Las barras intermedias, muestran la zona intermedia del carril o zona 2 y las barras de la derecha, muestran la zona 3 o zona más cercana al círculo donde se administró el tratamiento del factor B27 (0,83x).

En cada zona se observan los cinco días de estudio: el control sin tratamiento (DIV3), 24 horas después del tratamiento (DIV 4), 4 días después del tratamiento con el factor B27 (0,83x) (DIV7); y DIV 9 y DIV 12, 6 y 9 días después del tratamiento con el factor B27 (0,83x), respectivamente junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300). La densidad celular de U87 se cuantifica en un área total de 4050 x 4050 mm². En la figura 25.a se observan en la zona 1 o zona más alejada del tratamiento con el factor B27 (0,83x) los valores más bajos de densidad celular, respecto al estudio global. Existe un incremento de la densidad celular del 185 % entre el control sin tratamiento (DIV 3) y DIV 12, con el tratamiento del factor B27 (0,83x) y el marcaje nuclear con HOECHST (1:300), en esta zona. En la zona intermedia o zona 2 se mantienen valores similares en torno a las 70 células, a excepción de un pico máximo de 112 células en DIV 4, o 24 horas después del tratamiento con el factor B27 (0,83x). En la zona 3 o zona más cercana al tratamiento con el factor B27 (0,83x), se encuentran variaciones en la densidad celular, observando un pico de 86 células en DIV 9 que disminuye a 53 células en DIV 12.



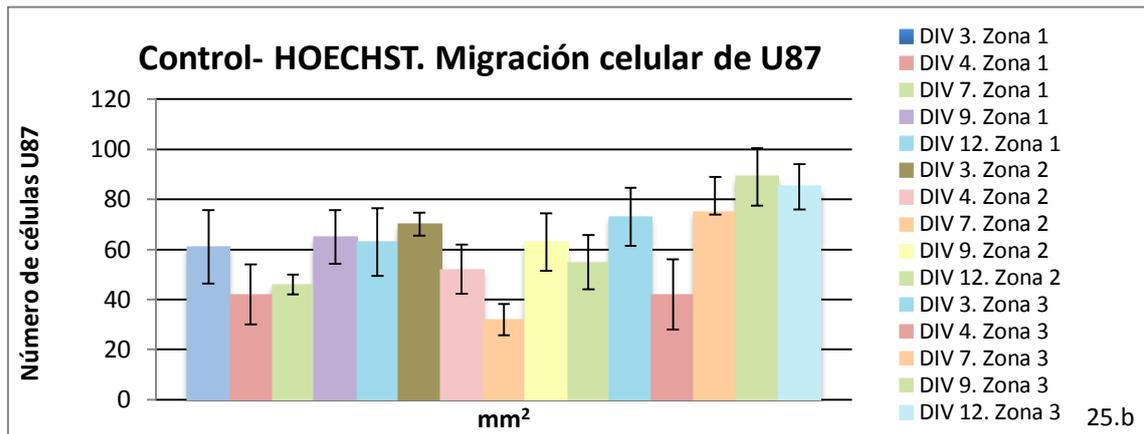


Figura 25 (a-b). Figura 25 a. Migración celular de U87 en el carril adyacente al tratamiento del factor B27 (0,83x). División en zonas desde la más alejada (izquierda) o zona 1, a la más cercana (derecha), zona adyacente al tratamiento con el factor B27 (0,83x) o zona 3. Figura 25.b. Control negativo de la gráfica anterior.

En la figura 26 (a-b) se muestra la zona 3 o zona más cercana al tratamiento con el factor B27 (0,83x) en DIV 9. Se observa una densidad celular uniforme a lo largo de todo el carril, que se corresponde a 86 células contabilizadas en un área de 4050 x 4050 mm². En la figura 26.a las células U87 se observan más redondeadas, normalmente estas células se caracterizan por una morfología plana y alargada, por lo que se sugería que las células comenzaban a entrar en apoptosis.

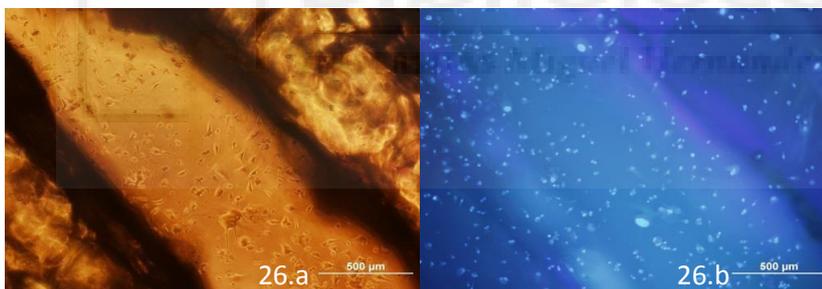


Figura 26.a. Reconstrucción 5x con el microscopio OLYMPUS Ix51 y el programa PRO PANORAMA EDIT 3 de la zona 3 del carril o zona más cercana al tratamiento con el factor B27 (0,83x), 6 días después del tratamiento (DIV 9). Escala 500 µm. Figura 26 b. Fotografía anterior con marcaje nuclear HOECHST (1:300).

➤ **Tratamiento con Factor B27 (2,5x) y HOECHST (1:300):**

Además del ensayo anterior, con el factor B27 (0,83x); también se realizó otro ensayo con el factor B27 (2,5x). En la figura 27.a se observa la densidad celular de U87 durante los días de estudio del control sin tratamiento DIV 3; los días DIV 4, DIV 7, 24 horas y 4 días después del tratamiento con factor B27 (2,5x) y DIV 9 y DIV 12, 6 y 9 días después del tratamiento con factor B27 (2,5x), respectivamente junto con el marcaje nuclear con HOECHST (1:300). La densidad celular de U87 se cuantifica en un área total de 4050 x 4050 mm². Los valores de la densidad celular se mantienen más bajos durante DIV 3, DIV 4 y DIV 7; observándose un mínimo de 64 células, 24 después del tratamiento con factor B27 (2,5x). En DIV 9 y DIV 12, la densidad celular incrementa a valores en torno a las 300 células. Se observa un incremento de la densidad celular de U87 del 139% frente a la densidad celular inicial.

En la figura 27.b se observa un incremento gradual de la densidad celular entre el control sin tratamiento (DIV3), y DIV7 de un 53%. También se observan dos picos máximos en DIV 7, 4 días después del tratamiento B27 (2,5x) y DIV 12, 9 días después del tratamiento con factor B27 (2,5x) junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300), los picos contienen una media de 170 células. Y un acuciado descenso en DIV 9, tratado con el factor B27 (2,5x), 6 días después del tratamiento de 89 células.

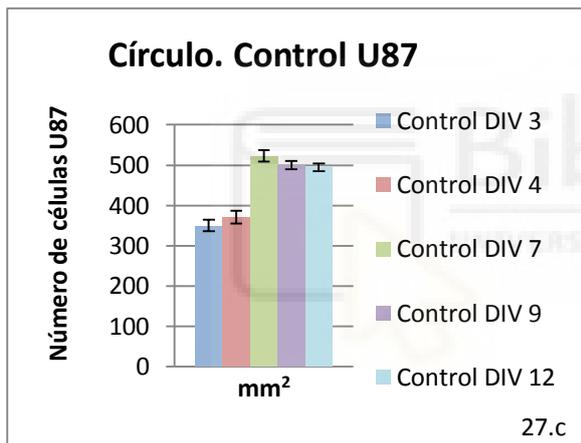
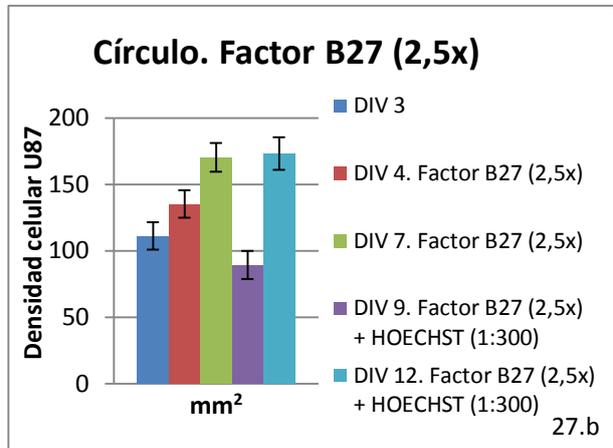
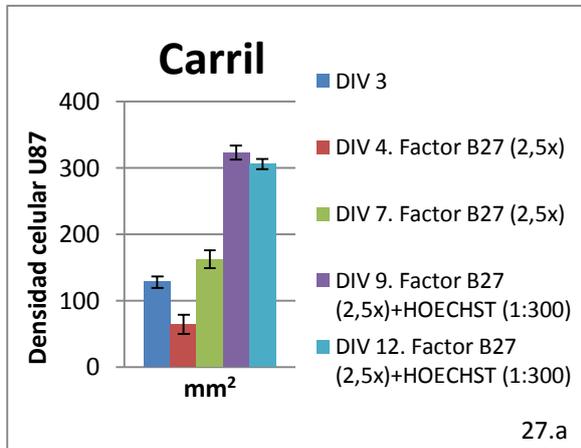


Figura 27 (a-b). Variación de la densidad celular de U87 en (DIV 3), DIV 4 y DIV 7; 24 horas y 4 días después del tratamiento con B27 (2,5x), respectivamente. En la Figura 27.a se estudia el carril lateral adyacente a la zona de administración del factor B27 (2,5x). En la Figura 27 b se observa la densidad celular en el círculo donde se administró el factor B27 (2,5x). El contaje de la densidad celular se realizó con el programa IMAGEJ.

La figura 28.a muestra el resultado de la migración celular de U87 en el carril adyacente al círculo donde se dispuso el tratamiento del factor B27 (2,5x). Las barras de la izquierda, muestran la zona 1 o la más alejada del tratamiento con el factor B27 (2,5x). Las barras intermedias, muestran la zona intermedia del carril o zona 2 y las barras de la derecha, muestran la zona 3 o zona más cercana al tratamiento con el factor B27 (2,5x). En cada zona se observan los cinco días de estudio: el control sin tratamiento (DIV3), 24 horas después del tratamiento (DIV 4), 4 días después del tratamiento (DIV 7); DIV 9 y DIV 12, 6 y 9 días después del tratamiento con factor B27 (2,5x) junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300), respectivamente. La densidad celular de U87 se cuantifica en un área total de 4050 x 4050 mm². Los picos máximos de densidad celular se encuentran en DIV 9 en la zona 1 o zona más alejada del tratamiento y en la zona intermedia o zona 2, 6 días después de la administración del factor B27 (2,5x), con 137 y 127 células, respectivamente; frente a las 39 y 46 células que se encuentran en la zona 1 y zona 3, el día del control sin tratamiento (DIV 3). En DIV 12, se observa un aumento del 211 % entre las zonas 1 y 3.

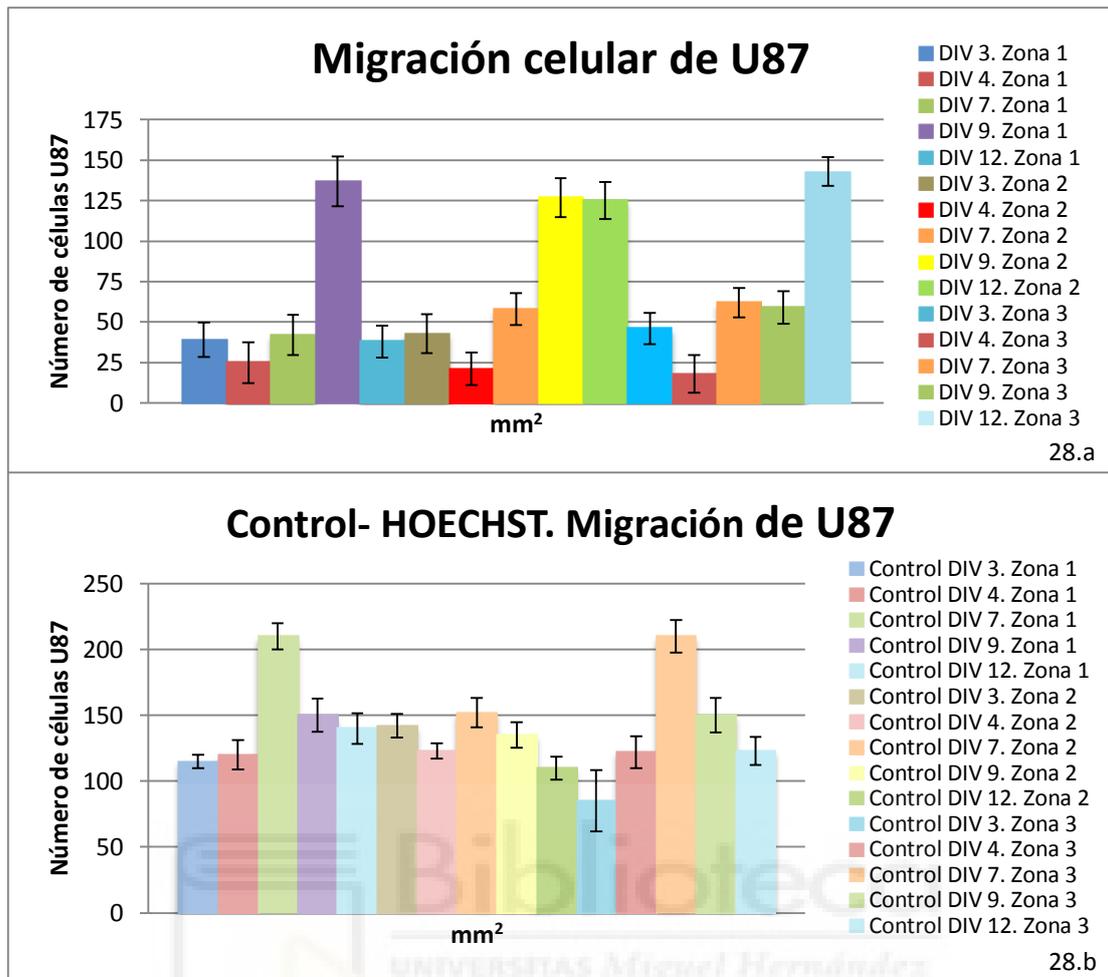
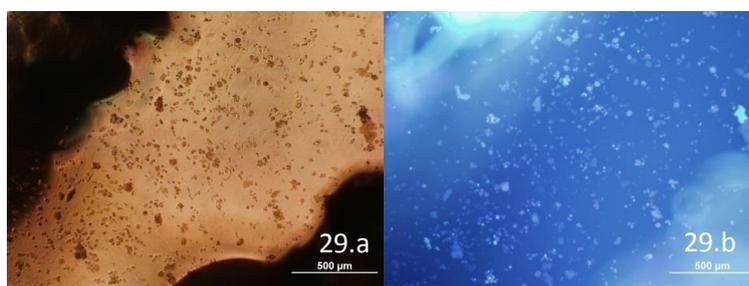


Figura 28. Migración celular de U87 en el carril adyacente al tratamiento con el factor B27 (2,5x). División en zonas desde la más alejada (izquierda) a la más cercana (derecha) o zona adyacente al tratamiento el factor B27 (2,5x).

La Figura 29 (a-b) muestra la zona 3 o la zona más cercana al círculo donde se administró factor B27 (2,5x) junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300), en DIV 12, 9 días después del tratamiento.



Fotografía 29 (a-b). Reconstrucción 5x con el microscopio OLYMPUS Ix51 y el programa PRO PANORAMA EDIT 3 de la zona 3 del carril o zona más cercana al tratamiento con el factor B27 (2,5x), 9 días después del tratamiento (DIV 12). Escala 500 µm. Figura 29.b. Fotografía anterior junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300). Se observa que las células U87 ya no conservan su conformación plana y alargada, ya que se han disgregado.

2.3 Ensayo toxicidad celular del marcador nuclear HOECHST (1:500) y (1:600)

En el experimento anterior, se observó que tras el tratamiento con el marcador nuclear HOECHST (1:300), las células U87 comenzaban a cambiar su morfología, de una más alargada y plana, debido a las uniones entre células, a otra más redondeada, signo de la entrada celular en apoptosis y pérdida de las uniones celulares. El marcador nuclear HOECHST es un tóxico celular. Para tratar de evaluar la toxicidad y a la vez poder marcar el núcleo, se ensayaron diferentes concentraciones del marcador nuclear HOECHST a concentraciones más bajas, de 1:600 y 1:500, con el fin de establecer una dosis no tóxica para las células U87. En la Figura 30.a se muestra el control sin HOECHST en DIV 1, DIV 2 y DIV 3. La densidad celular se contabilizó en un área de 4050 x 4050 mm². Se observa un incremento gradual de la densidad celular de U87, se obtuvo un valor de 422 células en DIV 1 y 610 células en DIV 3. Es decir, la densidad celular incrementó un 45% después de 48 horas sin el marcaje con HOECHST. En la Figura 30.b se observa la densidad celular de U87 en el control sin tratamiento con HOECHST (DIV 1) y después del marcaje con HOECHST (1:500) en DIV 2 y DIV 3. En el control DIV 1 y en DIV 2 se obtuvo una media de 663 células; mientras que en DIV 3 se observa un acuciado descenso del 56% frente al control sin tratamiento (DIV 1). Las células se contabilizaron en un área de 4050 x 4050 mm². En la Figura 30.c, se observa el ensayo de toxicidad celular con el marcador nuclear HOECHST (1:600). Se observa un máximo en la densidad celular de 239 células en el control sin HOECHST (DIV 1); posteriormente los valores de la densidad celular se mantuvieron en valores aproximados a 137 células. Se observa una disminución en la densidad celular de U87 del 43% entre DIV 1 y DIV 3.

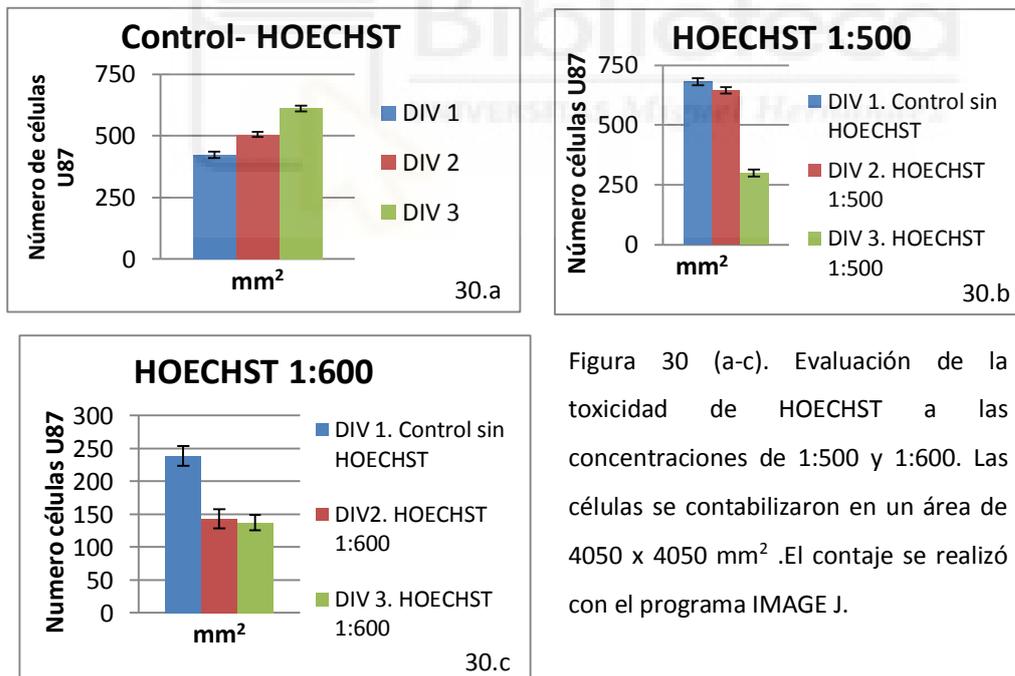


Figura 30 (a-c). Evaluación de la toxicidad de HOECHST a las concentraciones de 1:500 y 1:600. Las células se contabilizaron en un área de 4050 x 4050 mm². El conteo se realizó con el programa IMAGE J.

2.4 Tratamiento con Factor B27 a 10 y 5x embebido en colágeno:

En el tratamiento con factor B27 (2,5x) realizado en el experimento anterior, el tratamiento se depositaba directamente junto con el medio de cultivo celular. Como se ha destacado en el apartado de materiales y métodos, el siguiente paso era limitar la zona que contenía el estímulo migratorio, el factor B27 a las concentraciones de 10 y 5x. Para ello se introduce el factor B27 en un medio semi-sólido, el colágeno tipo I con

el objetivo de llevar a cabo el estudio de gradientes de migración de las células U87 de glioblastoma de una forma más controlada.

➤ **Tratamiento con factor B27 (10x) embebido en colágeno:**

En la Figura 31 se muestra la densidad celular de U87 durante los días de estudio del control sin el tratamiento con el factor B27 (10x) embebido en colágeno (DIV 2) y los días del tratamiento con el factor B27 (10x) embebido en colágeno (DIV 3) y (DIV 4). Se dispensó 100 μ l de factor B27 (10x) embebido en colágeno como se muestra en la Figura 12 del apartado de materiales y métodos. Se contabilizó la densidad celular de U87 en un área de 1350x1350 mm^2 que ocupaba el colágeno de, en cada uno de los días de estudio DIV 2, DIV 3 y DIV 4. En el control sin tratamiento con factor B27 (10x) embebido en colágeno (DIV 2) se contabilizaron 506 células, valor que incrementó a 637 células, 48 horas después del tratamiento con factor B27 (10x) embebido en colágeno (DIV 4), se observó un incremento del 26% en la densidad celular de U87 entre ambos días.

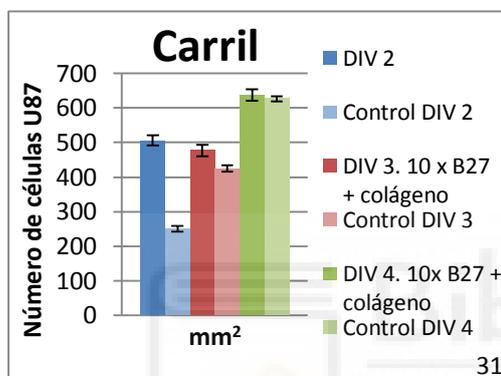


Figura 31. Densidad celular de U87 durante los días de estudio del control sin el tratamiento con factor B27 (10x) embebido en colágeno DIV 2 y los días del tratamiento de factor B27 (10x) embebido en colágeno DIV 3 y DIV 4, después de 24 y 48 horas del tratamiento, respectivamente. Contaje realizado con el programa IMAGE J.

En la Figura 32 se realizó un estudio de la migración celular de U87 donde se contabilizó la densidad celular en el área que contenía el colágeno y las zonas adyacentes, siendo la zona 1 de color morado, la zona más cercana al tratamiento del factor B27 (10x) embebido en colágeno y la zona 2 de color azul, la más alejada del tratamiento del factor B27 (10x) embebido en colágeno. El área contabilizada en cada zona es de 2700 x 2700 mm^2 . En el área que contenía el colágeno se observó un pico máximo de densidad celular U87 en DIV 4, 24 horas después del tratamiento con factor B27 (10x) embebido en colágeno, con un valor de 214 células contabilizadas. En la zona 1 o la zona más cercana al tratamiento de factor B27 (10x) embebido en colágeno, se observa un incremento gradual del 52% en la densidad celular entre DIV2 y DIV 4. En la zona 2 o la zona más alejada del tratamiento con el factor B27 (10x) embebido en colágeno, se muestra un pico de 229 células en DIV 3, se observa un incremento del 134% respecto al día anterior o día del control sin tratamiento (DIV 2). Tanto en la zona 1 o zona más cercana al tratamiento con el factor B27 (10x) embebido en colágeno, como en la zona 2 o zona más alejada se observa un incremento de la densidad celular de U87 los días en los que se estudió el tratamiento con el factor B27 (10x) embebido en colágeno DIV 3 y DIV 4 respecto al día control sin tratamiento (DIV 2).

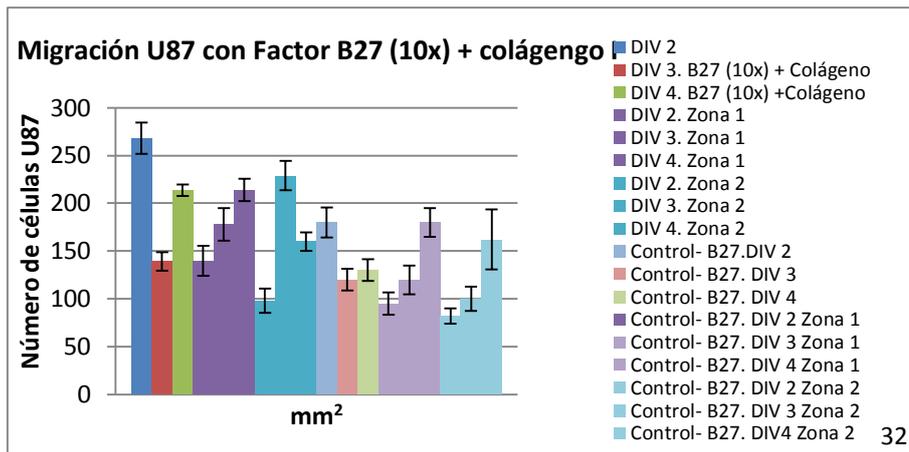


Figura 32. Densidad celular de U87 en las zonas donde se encontraba el tratamiento de factor B27 (10x) embebido en colágeno y las zonas adyacentes. Contaje celular realizado con el programa IMAGE.

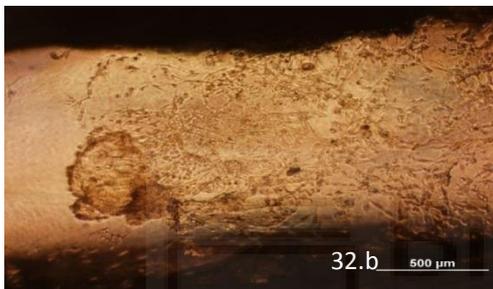


Figura 32.b. Reconstrucción 4x del carril con el factor B27 (10x) embebido en colágeno en DIV 3, después de 24 horas del tratamiento con el factor B27 (10x), realizada con el microscopio OLYMPUS Ix51 y el programa PRO PANORAMA EDIT 3. Escala 500 μm.

➤ **Tratamiento con factor B27 (5x) embebido en colágeno:**

Se realizó el mismo tratamiento con una concentración de factor B27 (5x). Con el objetivo de observar el efecto en la densidad de U87 entre ambas concentraciones. El área total contabilizada fue de 2700 x 2700 mm² en cada zona. En la Figura 33 se muestra la densidad celular de U87 durante los días de estudio del control sin el tratamiento con el factor B27 (5x) embebido en colágeno DIV 2 y los días del tratamiento con el factor B27 (5x) embebido en colágeno DIV 3 y DIV 4. Se dispensó 100 μl de factor B27 (5x) embebido en colágeno como se muestra en la Figura 12 del apartado materiales y métodos. En la figura 33 se observa un incremento gradual de la densidad celular entre los días del control sin tratamiento (DIV 2) y el día que se estudió el tratamiento con el factor B27 (5x) embebido en colágeno (DIV 4) del 173%.

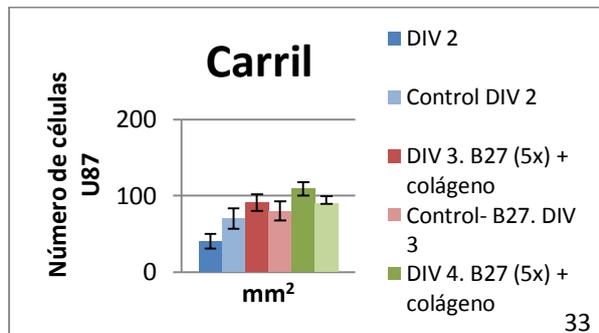


Figura 33. Densidad celular de U87 durante los días de estudio del control sin el tratamiento de B27 (5x) embebido en colágeno (DIV 2) y los días del tratamiento con factor B27 (10x) embebido en colágeno DIV 3 y DIV 4, después de 24 y 48 horas del tratamiento, respectivamente.

En la Figura 34 se muestra el tratamiento de factor B27 (5x) embebido en colágeno. Entre DIV 2 y DIV 4 se observan valores similares con un valor aproximado de 50 células/mm². Tanto en la zona 1 o zona adyacente como en la zona 2 o zona más alejada al lugar de administración de factor B27 (5x) embebido en colágeno, se mantienen valores similares de 41 células/mm² y 31 células/mm², respectivamente, entre DIV 2 y DIV 4.

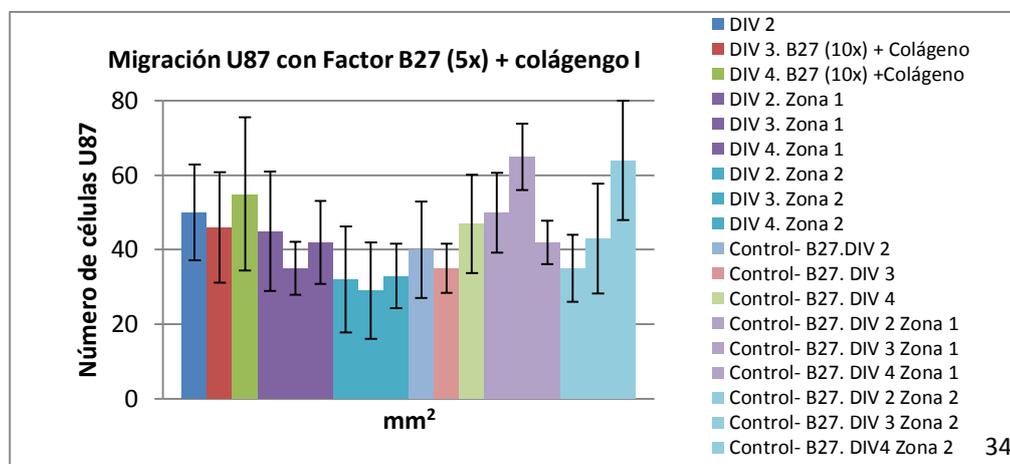


Figura 34. Densidad celular de U87 en las zonas donde se encontraba el tratamiento de factor B27 (5x) embebido en colágeno y en las zonas adyacentes. Contaje celular realizado con el programa IMAGE J.

DISCUSIÓN

Respecto al diseño del dispositivo y su impresión, una vez calibrada la impresora 3D y optimizado el diseño de la impresión se obtuvo un dispositivo con alta resolución en la confección del *scaffold* y en un período de tiempo menor comparado con las pruebas anteriores.

En los ensayos realizados con 2-DG a una concentración de 10 mM en el medio de cultivo, no se observan datos concluyentes acerca de la toxicidad. Por un lado, en la Figura 14.b se demostró un descenso significativo del 50% en DIV 4, después de 24 horas del tratamiento con 2-DG (10 mM), respecto al control sin tratamiento en el círculo donde se administró la 2-DG (10 mM). Transcurridas 24 horas del tratamiento con 2-DG (10 mM), el compuesto es letal para las células, disminuye su densidad a la mitad. Por otro lado, en el estudio de migración realizado en DIV 4, en el carril lateral adyacente al círculo donde se administró la 2-DG (10 mM), transcurridas 24 horas del tratamiento con 2-DG (10 mM), se mostró un aumento de la densidad celular de U87 en la zona intermedia o zona 2 que desciende en la zona 3 o zona más cercana al punto de administración del tratamiento, es decir la 2-DG es letal tanto en la zona de administración como en la zona adyacente. En DIV 7, 4 días después de la administración de 2-DG (10 mM), ocurre al contrario que en DIV 4, en la zona 2 desciende la densidad celular de U87 y aumenta en la zona 3. Este acontecimiento producido en la zona 3 puede ser debido, a que después de 4 días del tratamiento con 2-DG (10 mM), las células que han sobrevivido continúan creciendo y proliferando. Después de 4 días la 2-DG ha sido metabolizada por las células, y continúan creciendo de forma normal.

Respecto al ensayo realizado con 2-DG a una concentración 10 mM junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300) en DIV 9 y DIV 12; en el punto de administración del tratamiento se produce un descenso gradual de la densidad celular U87 del 63%, entre DIV 4 y DIV 12, 24 horas después del tratamiento con 2-DG y 9 días después del tratamiento con 2-DG (10 mM) junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300), respectivamente. Sin embargo, en el control negativo de HOECHST (1:300) se observa un aumento neto de la densidad celular de U87 del 143% entre estos días. Se puede establecer la toxicidad del marcaje nuclear con HOECHST (1:300). En referencia al estudio de migración celular, el marcaje nuclear HOECHST (1:300) también se administró en DIV 9 y DIV 12; si observamos la densidad celular de U87 en las zonas 2 y 3 en DIV 9 se mantienen valores similares, mientras que en DIV 12 se produce un descenso de la densidad celular del 33%. Si se compara estos resultados con el control negativo de HOECHST (1:300) (Figura 22.b), se observa que los valores de densidad celular son un 16% más elevados entre ambos días. Por lo que también se señala de nuevo la toxicidad del marcador nuclear HOECHST (1:300).

Por otro lado se deseaba comprobar si el factor de crecimiento neuronal B27 influía en el crecimiento y migración de las células U87, se ensayó a diferentes concentraciones de 0,83x y 2,5x; ésta última con el objetivo de comprobar el efecto de una concentración mayor en las células U87. Se aspiraba comprobar si el factor B27 se podía establecer como estímulo migratorio en las células U87, a la vez de validar si la estructura diseñada en el trabajo era apropiada para llevar a cabo estudios de migración celular. Respecto a la concentración de 0,83x, en el carril adyacente al punto donde se administró el tratamiento con B27 (0,83x) se observaba un descenso gradual neto del 42% entre DIV 3 y DIV 7. También se observan valores más elevados en la densidad celular de U87 en la zona 3 o zona próxima al tratamiento con el factor B27 (0,83x), en DIV 4 y DIV 7, respecto al control sin tratamiento DIV 3.

En referencia al ensayo realizado con el factor B27 a una concentración 0,83x junto con el marcaje nuclear HOECHST (1:300) en DIV 9 y DIV 12 en el punto de administración del tratamiento, se produce un descenso gradual de la densidad celular U87 a partir de DIV 4 del 80%, sin embargo en el control (Figura 24.c) se produce un aumento del 98% en la densidad celular. En el ensayo de migración celular en DIV 9, entre la zona intermedia o zona 2 y la zona 3 o zona próxima al tratamiento se observan valores similares; no obstante en DIV 12 en estas zonas se observa un descenso del 39% de la densidad celular de U87. Sin embargo, en el control negativo de HOECHST (1:300) (Figura 25.b) se observa que la densidad celular aumenta en ambos días, un 41% y un 55%, respectivamente. Se establece que el HOECHST (1:300) resulta letal para las células U87,

En el ensayo del tratamiento con el factor B27 (2,5x) y el marcaje nuclear HOECHST (1:300) se observan resultados favorables, como estímulo que ayuda al crecimiento y proliferación de células U87. Ya que se observa un incremento gradual de la densidad celular de U87 desde el control sin tratamiento DIV3 hasta DIV 12, 9 días después del tratamiento con el factor B27 (2,5x), en el lugar de administración. Aunque se destaca un acuciado aumento de la densidad celular entre DIV 9 y DIV 12 de un 94%, mientras que en el control negativo de HOECHST (1:300) no se observa. Finalmente, en los resultados de la migración de las células U87 después de la administración del factor B27 (2,5x). Se observan resultados dispares a lo largo del carril adyacente al lugar de

administración del factor B27 (2,5x). Si se compara la zona 2 y 3 de DIV 9 se observa un descenso de la densidad celular del 54%, mientras que en el control negativo de HOECHST (1:300) se produce un aumento del 11%. De nuevo se observa la toxicidad del HOECHST (1:300).

Finalmente en los resultados del factor B27 (10x) embebido en colágeno no se observan datos notables. Por un lado, en la zona más cercana al colágeno con el tratamiento del factor B27 (10x) se observa un incremento gradual de la densidad celular del 53% y del 63% en la zona más alejada del colágeno entre DIV 2 y DIV4, respectivamente. Mientras que los controles negativos del factor B27 muestran un incremento del 89% y un 97%, respectivamente. Por otro lado, los resultados del factor B27 (5x) embebido en colágeno no son concluyentes, por un lado se observa un incremento gradual del 173% de la densidad celular de U87 después de administrar el factor B27 (5x) embebido en colágeno en el lugar de administración entre los días del control sin tratamiento ni colágeno DIV 2 y 48 horas después del tratamiento del factor B27 (5x) (DIV 4). En la migración de las células U87 a la zona próxima al punto donde se administró el factor B27 (5x) embebido en colágeno, no se observan datos concluyentes ya que los controles negativos de factor B27 tanto en el lugar de administración del colágeno como en las zonas adyacentes poseen una densidad celular de U87 más elevada que los valores del experimento. Se deberá optimizar la técnica a partir de otra formulación de colágeno o una concentración diferente de factor B27.

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.

- El dispositivo diseñado y construido mediante impresión 3D, es válido para realizar estudios de proliferación, crecimiento y migración de células de la línea de glioblastoma humano, U87. Permite la siembra controlada y gradual de células en su zona central, y la adición controlada de un estímulo en las zonas periféricas.
- La 2-desoxy-D-glucosa, según los ensayos no se muestra como un tóxico para las células U87; actúa frenando el crecimiento y la proliferación celular.
- El factor de crecimiento neuronal B27 (0,83x) y (2,5x) estimula la proliferación y migración de las células U87 tanto en el lugar de administración como en las zonas adyacentes.
- El tratamiento del factor B27 embebido en colágeno funcionó como estímulo proliferativo de las células U87. No obstante, no actuó como estímulo migratorio, por lo que se deberá optimizar la técnica en posteriores ensayos.
- El dispositivo desarrollado es un método válido en el estudio de la migración celular respecto a las placas tradicionales.

En base a los resultados obtenidos, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- ✓ Se deberán optimizar las técnicas utilizadas, realizando la administración de los factores B27 y 2-DG cuando las células U87 hayan proliferado y crecido en el cultivo 3D, y la confluencia en el cultivo sea de un porcentaje elevado; en ausencia de marcaje nuclear HOECHST a las concentraciones ensayadas. Si se realizan los experimentos con densidades mayores de células se podrá comprobar de forma más exhaustiva el efecto de estos compuestos en las células U87. Se deberá optimizar la técnica con el factor B27 (10x) embebido en colágeno.
- ✓ Otro factor importante sería ampliar los días de estudio. Se han obtenido resultados notables en la administración del factor B27 a la concentración de 0,83x y 10x embebido en colágeno, respecto al crecimiento y proliferación celular de U87 en los días de estudio DIV 4, 7, 9 y 12; se deberán optimizar estas técnicas durante más días de estudio.
- ✓ Validar el dispositivo propuesto en otros modelos o líneas celulares, estudios de migración o quimiotaxis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Melchels FP¹, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010 Aug; 31.
2. Levesque PE¹, Bauer SB, Atala A, Zurakowski D, Colodny A, Peters C, Retik AB. Ten-year experience with the artificial urinary sphincter in children. *J Urol*. 1996.
3. Zopf DA, Hollister SJ, Nelson ME, Ohye RG, Green GE. Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer. *N Engl J Med*. 2013 May 23.
4. Aljohani W¹, Ullah MW², Zhang X³, Yang G⁴. Bioprinting and its Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Int J Biol Macromol*. 2017 Sep 1.
5. Jennifer L. Olson, Anthony Atala and James J. Yoo* Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions. *Chonnam Med J*. 2011 Apr; 47(1): 1–13.
6. Silver FH, Pins G. Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix. *J Long Term Eff Med Implants* 1992; 2:67-80.
7. Augst AD¹, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* 2006 Aug 7.
8. Dahms SE, Piechota HJ, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. *Br J Urol* 1998.
9. Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology* 1998.
10. Piechota HJ, Dahms SE, Nunes LS, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. In vitro functional properties of the rat bladder regenerated by the bladder acellular matrix graft. *J Urol* 1998.
11. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology* 1999.

12. Gilding DK. Biodegradable polymers. In: Williams DF, ed. *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981:209-32.
13. Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer Wetting of poly (L-lactic acid) and poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials* 1994; 15:55-8.
14. Ben Haim L1, Rowitch DH1, 2. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci*. 2017 Jan; 18(1):31-41.
15. Hiroaki Wake and R. Douglas Fields. Physiological Function of Microglia Neuron Glia Biol. 2011 Feb; 7(1): 1–3.
16. Richard E. Kast, 1 Georg Karpel-Massler,2 and Marc-Eric Halatsch2. CUSP9* treatment protocol for recurrent glioblastoma: aprepitant, artesunate, auranofin, captopril, celecoxib, disulfiram, itraconazole, ritonavir, sertraline augmenting continuous low dose temozolomide. *Oncotarget*. 2014 Sep; 5(18): 8052–8082.
17. Vredenburg JJ1, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2007 Oct.
18. Thomas AA1, Ernstoff MS, Fadul CE. Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Cancer J*. 2012 Jan-Feb;18(1):59-68.
19. Elizabeth R. Gerstner, Poe-Jou Chen, Patrick Y. Wen, Rakesh K. Jain, Tracy T. Batchelor, and Gregory Sorensen. Infiltrative patterns of glioblastoma spread detected via diffusion MRI after treatment with cediranib. *Neuro Oncol*. 2010 May; 12(5): 466–472.
20. Wirsching HG1, Galanis E2, Weller M3. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*. 2016; 134:381-97.
21. Ruiz-Ontañón P1, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, Montero JA, Grande L, Nogueira L, Diaz-Moralli S, Esparís-Ogando A, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, Pandiella A, Cascante M, Segura V, Martínez-Climent JA, Sanz-Moreno V, Fernández-Luna JL. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma- initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells*. 2013 Jun; 31(6):1075-85.
22. Cestmir Altaner. Glioma cancer stem cells and their role in therapy. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. May 2012.
23. Imtiaz A. Siddiqui,1,* Vanna Sanna,2,* Nihal Ahmad, Mario Sechi, 2 and Hasan Mukhtar1. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York academy of sciences*. June 2015.
24. Leber MF1, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int J Oncol*. 2009 Apr; 34 (4):881-95.
25. Hikmet Geckil, 1, 2,* Feng Xu,1,* Xiaohui Zhang,1 SangJun Moon,1 and Utkan Demirci corresponding author1,3. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)*. 2010 Apr; 5(3): 469–484.
26. Vunjak-Novakovic G1. The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors. *Novartis Found Symp*. 2003; 249:34-46.
27. Ozbek S1, Balasubramanian PG, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP, Adams JC. The evolution of extracellular matrix. *Mol Biol Cell*. 2010 Dec; 21.
28. Windus LC1, Kiss DL, Glover T, Avery VM. In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer. *Exp Cell Res*. 2012 Nov 15.

29. Richard M. Eglén and Jean-Louis Klein, Ye Fang¹ and Richard M. Eglén². Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. Published online 2017 May 18.
30. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schaafer KL, Baldus SE, Huckenback W, Pierokz RP, Knoefel WT, Krieg A, Stoecklein NH. 2013. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS one* 8(3):e59689.
31. K. Paňková, D. Rösler, M. Novotný, and Jan Brábek. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Jan
32. A.L. WILLIS, F. SABEH, X.-Y. LI & S.J. WEISS. Extracellular matrix determinants and the regulation of cancer cell invasion stratagems. *Journal of Microscopy*, Vol. 251, Issue 3 2013, pp. 250–260.
33. Ryan J. Petrie and Kenneth M. Yamada. At the leading edge of three-dimensional cell migration. *J Cell Sci.* 2012 Dec 15; 125(24): 5917–5926.
34. Ru Dai, 1, 2 Zongjie Wang, 1 Roya Samanipour, 1 Kyo-in Koo, 3, * and Keekyoung Kim 1, Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25:4633–4646.
35. M Ralser, MM Wamelink, EA Struys, C Joppich, S Krobitsch, C Jakobs, H Lehrach *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-d-glucose inhibits cell growth *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 18;105(46):17807-11.
36. Lee Tin Sin. *PLA Biopolymer Technology and Applications*. Polylactic Acid 1st Edition. October 2012.
37. Brewer GJ¹. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res.* 1995 Dec.
38. Zhineng J Yang, Cheng E Chee, Shengbing Huang, and Frank A Sinicrope. Autophagy modulation for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2011 Jan
39. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. Chazotte B. *Cold Spring Harb Protoc.*1; Jan 2011.
40. David L. Nelson, Michael M. Cox. *Principles of Biochemistry*. Proteins: Structure, Function, Folding. 2013.