



Universidad  
Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación  
en Ingeniería de Aragón  
Universidad Zaragoza



## Trabajo Fin de Grado

# DESARROLLO DE MODELOS “IN VITRO” BIOMIMÉTICOS DE ISQUEMIA CARDÍACA

Autor:

**NICOLÁS POLO GARCÍA**

DIRECTORES:

LAURA PAZ ARTIGAS

JESÚS CIRIZA ASTRAIN

Lugar de realización:

TME lab

Departamento de Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras

Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)

Edificio I+D+i. Campus Río Ebro

Grado en BIOTECNOLOGÍA

Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

Septiembre 2021

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4-6</b>
2.1. ISQUEMIA CARDÍACA .....	4
2.2. MODELOS DE INVESTIGACIÓN .....	4-5
2.3. ESFEROIDES CARDIACOS .....	5-6
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>8-11</b>
4.1. CULTIVOS CELULARES.....	8
4.2. SIEMBRA DE ESFEROIDES .....	8-9
4.3. TINCIÓN DE VIABILIDAD DE LOS ESFEROIDES .....	9
4.4. ESTUDIO DEL TAMAÑO DE LOS ESFEROIDES.....	10
4.5. EXTRUSIÓN DE LOS ESFEROIDES .....	10-11
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	11
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>12-21</b>
5.1. NÚMERO DE CÉLULAS Y TAMAÑO DEL ESFEROIDE.....	12-14
5.2. VIABILIDAD CELULAR.....	14-17
5.3. RIGIDEZ.....	18-20
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>22</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>23-24</b>

---

## 1. RESUMEN

---

En la actualidad, existe una necesidad creciente de generar nuevos modelos *in vitro* de isquemia cardíaca que reproduzcan mejor las condiciones *in vivo* para probar tratamientos alternativos. Un enfoque interesante son los esferoides cardíacos que simulan la isquemia. Hemos intentado reproducir una situación de isquemia cardíaca en un cultivo 3D de fibroblastos cardíacos humanos en forma de esferoide sin añadir ningún fármaco. En primer lugar, determinamos el tamaño óptimo del esferoide para generar un core necrótico sembrando diferentes números de células. A continuación, analizamos la formación del core necrótico dentro de los esferoides mediante el análisis de su viabilidad. Sin embargo, no pudimos determinar la existencia de un centro isquémico en el esferoide mediante la viabilidad celular. A continuación, la ausencia de core necrótico se confirmó mediante la rigidez de los esferoides utilizando un sistema de extrusión que relaciona la presión aplicada al esferoide con la deformación de este. El análisis de la rigidez mediante este procedimiento de extrusión de los esferoides cultivados a diferentes días confirmó la ausencia de desarrollo de isquemia.

---

## ABSTRACT

---

Currently, there is a growing need of new *in vitro* cardiac ischaemia models that better reproduce *in vivo* conditions for testing alternative treatments. An interesting approach are cardiac spheroids simulating ischaemia. We have done an attempt by reproducing a situation of cardiac ischaemia in a 3D culture of Human Cardiac Fibroblast in form of spheroids without addition of any drug. First, we determined the optimal size of the spheroid to generate a necrotic core by seeding different cell numbers. Next, we analyzed the formation of the necrotic core within the spheroids by analyzing their viability. However, we were not able to determine the existence of an ischaemic centre in the spheroid by means of cell viability. The lack of necrotic core was next confirmed by the stiffness of the spheroids using an extrusion system that relates the pressure applied to the spheroid with the deformation of the spheroid. Stiffness analysis through this extrusion procedure from spheroid cultured at different days confirmed the lack of ischaemia development.

---

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. ISQUEMIA CARDÍACA

---

Las enfermedades cardiovasculares son actualmente la primera causa de muerte en el mundo (1). Su estudio representa un gran reto, especialmente en los países en desarrollo. Actualmente existe un gran esfuerzo en la lucha contra estas enfermedades y los avances en la investigación de posibles tratamientos frente a ellas. En particular, la isquemia cardiaca es una de las enfermedades cardiovasculares con mayor incidencia y tasa de mortalidad. Consiste en la disminución del flujo sanguíneo que llega al corazón debido a una obstrucción parcial o total de las arterias coronarias, provocando una disminución del oxígeno y de los nutrientes que llegan al músculo cardiaco, causando finalmente la muerte celular. La principal consecuencia tras la muerte celular es la reducción de la capacidad del músculo cardiaco de bombear sangre (1,2).

Hoy en día los tratamientos de isquemia cardiaca se basan en la mejora del flujo de sangre al corazón y en la reducción de las necesidades de oxígeno de éste, y en último término, el trasplante. Sin embargo, estos tratamientos o no dan una solución definitiva al problema porque resultan en una recuperación parcial del corazón, o conllevan un tratamiento inmunosupresor de por vida (3). Es necesario por lo tanto continuar investigando posibles tratamientos que den una solución definitiva a la enfermedad sin menoscabar el estilo de vida del paciente. En dicha búsqueda de nuevos tratamientos, resulta de vital importancia la generación de modelos *in vitro* de la enfermedad que reproduzcan fidedignamente los parámetros característicos de la misma.

---

### 2.2. MODELOS DE INVESTIGACIÓN

---

El corazón es uno de los órganos más importantes del ser humano. Las células más relevantes y mayoritarias del corazón son los cardiomiocitos, células contráctiles. Pero también existen otros tipos celulares en el tejido cardiaco como los fibroblastos cardiacos o cardiofibroblastos, las células endoteliales y las células vasculares de músculo liso. Este conjunto de células forma una estructura tridimensional con unas propiedades mecánicas particulares, difíciles de reproducir en un modelo que simule las condiciones reales del tejido cardiaco (4). Uno de los grandes retos en la investigación de las enfermedades cardiovasculares consiste en conseguir modelos que simulen lo más cercanamente posible las condiciones en que se encuentran las células del corazón dentro del organismo vivo, en condiciones fisiológicas y patológicas. Los modelos tradicionales que han sido usados para la investigación de estas enfermedades hasta la actualidad han sido modelos animales y modelos *in vitro* en dos dimensiones.

En los modelos animales las células se encuentran en condiciones fisiológicas y las interacciones reproducen completamente el entorno natural de las mismas. Sin embargo, existe variabilidad entre especies, ya que las células de cada especie no se comportan igual, además de los problemas éticos derivados del uso y sufrimiento de estos animales, el coste elevado, y la falta de un completo control de las condiciones del microentorno celular, siendo un modelo no del todo idóneo para el estudio de las enfermedades cardiovasculares (5). Los cultivos *in vitro* en dos dimensiones permiten el uso selectivo de células humanas aisladas, sin ningún tipo de problema ético. Además, es un sistema económico donde es fácil controlar las condiciones a las que sometemos las células. Sin embargo, la ausencia de una estructura 3D que posibilite, entre otros, el mantenimiento de la rigidez del microentorno o la interacción de la célula con otros tipos celulares, y el hecho de que las células de estos cultivos no están en unas condiciones completamente fisiológicas, hacen que estos modelos tampoco resulten los más reproducibles para estudiar enfermedades con la complejidad de las enfermedades cardiovasculares (6).

Para resolver los problemas que plantean estos modelos tradicionales se han desarrollado los sistemas celulares de cultivo *in vitro* en 3D, que combinan las ventajas de los modelos animales y de los modelos *in vitro* clásicos, representando con más precisión el organismo u órgano vivo, como por ejemplo simular la rigidez de un tejido (6). Dentro de estos modelos celulares en 3D, uno de los más utilizados son los esferoides, un sistema celular en 3D que aprovecha la tendencia natural de muchas células a agregarse mediante métodos como el de gota colgante o el uso de pocillos de base redondeada, dando lugar a un cultivo con forma de esfera. Este modelo puede ser utilizado en muchos modelos para investigación biomédica, ya que se pueden formar esferoides a partir de distintos tipos celulares, así como de distintos tamaños en función del número de células que los formen (7).

---

### 2.3. ESFEROIDES CARDÍACOS

---

Los modelos *in vitro* tridimensionales de corazón humano generados con esferoides cardíacos cocultivan cardiomiocitos humanos primarios o derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células endoteliales y fibroblastos, teniendo también en cuenta las proporciones en las que aparecen en condiciones fisiológicas en un corazón humano (8). Los cardiomiocitos y los fibroblastos cardíacos son fundamentales en el desarrollo, la función y la remodelación cardíaca. Así, se han utilizado esferoides como modelo cardíaco para estudiar la maduración de cardiomiocitos, su capacidad contráctil, la actividad eléctrica que presentan (9–11) o los efectos de ciertos fármacos sobre los cardiomiocitos (12).

Aunque, existen una gran cantidad de trabajos en los que se utilizan esferoides cardíacos, en pocos se reproducen la isquemia cardíaca. Un ejemplo es la reproducción de isquemia cultivando esferoides de células cardíacas en unas condiciones de baja concentración de oxígeno, favoreciendo que en su interior se genere un gradiente de

oxígeno con un centro isquémico (13,14). Sin embargo, este modelo no reproduce la existencia de un gradiente de nutrientes, ni la dificultad para la eliminación de los desechos que sí se produce *in vivo* en una situación de isquemia (2). Se ha descrito en estos modelos de isquemia que se producen cambios en la rigidez de los esferoides (14), y por lo tanto las características del microentorno de las células y la respuesta celular (15), ya que la rigidez de los tejidos es consecuencia de las propiedades mecánicas de las células, la matriz extracelular y la interacción entre ambas (16).

La rigidez tisular se puede cuantificar mediante la deformación por tracción, la deformación por compresión, la aspiración por pipeta/micropipeta, o la microscopía de fuerza atómica. Algunos de estos procedimientos se han utilizado también para caracterizar la rigidez de microcápsulas esféricas que, aunque no son tejidos vivos, tienen la misma geometría y tamaño de los esferoides (17).

En este trabajo se han cultivado esferoides cardíacos formados por fibroblastos cardíacos para simular un modelo de isquemia cardíaca. En lugar de cultivar los esferoides en baja concentración de oxígeno, se han cultivado esferoides de mayor diámetro al descrito en la literatura para conseguir un gradiente de oxígeno y nutrientes de forma natural, con un centro altamente isquémico donde se acumulan productos de desecho que pueden resultar tóxicos. Posteriormente, se ha comprobado el modelo mediante estudios de viabilidad celular y cuantificando la rigidez de los esferoides mediante un sistema de extrusión previamente desarrollado para caracterizar la rigidez de microcápsulas (18), determinando si se producen cambios en la rigidez a medida que se produce la isquemia por falta de oxígeno.

---

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La hipótesis de este trabajo es que un esferoide formado por agrupación de fibroblastos cardíacos humanos a una determinada densidad celular es capaz de generar un core necrótico. Este core necrótico puede ser determinado por técnicas clásicas de determinación de viabilidad y **existe una correlación entre la aparición de un centro isquémico y cambios en la rigidez del esferoide**. Así el objetivo principal del trabajo es cuantificar la rigidez en esferoides en los que se reproduzca una situación de isquemia sin necesidad de reducir la cantidad de oxígeno y establecer dicha correlación entre la aparición de la isquemia y la rigidez del esferoide.

Para ello este trabajo consta de 3 fases:

1. Determinar el número inicial de células para la generación de un modelo con core necrótico al cabo del tiempo, basándonos en el tamaño del esferoide formado y su evolución.
2. Validar la formación de core necrótico mediante determinación de la viabilidad celular.
3. Validar la formación de core necrótico mediante la cuantificación de la rigidez de los esferoides a lo largo del tiempo.

---

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. CULTIVOS CELULARES**

---

Las células utilizadas en este trabajo son fibroblastos cardiacos humanos (HCF) cedidos por el grupo de la Dra. Arantxa González-Miqueo del CIMA (Navarra). Para trabajar con este tipo celular, se utilizan dos tipos de medio de cultivo que, en adelante, se denominarán medio de cultivo mínimo y completo. El medio de cultivo mínimo se prepara a partir de medio DMEM bajo en glucosa, suplementado con glutamina a una concentración de 2.5 mM y 1% de penicilina-estreptomicina. El medio de cultivo completo contiene, además, un 10% de suero fetal bovino y 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2).

Los fibroblastos se mantienen congelados en viales dentro de tanques de nitrógeno líquido, donde se conservan a  $-196^{\circ}\text{C}$ , a una concentración de  $10^6$  células/mL en 1 mL de medio de cultivo completo con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), un agente crioprotector que protege a las células optimizando su viabilidad y funcionalidad durante la criopreservación. La descongelación se lleva a cabo en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , diluyendo posteriormente en 5-10 mL de medio mínimo para eliminar el DMSO, tóxico para las células. Se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos y se retira el sobrenadante mediante aspiración. Se resuspende el pellet de fibroblastos cardiacos descongelados en 5 mL de medio de cultivo completo y se siembra en un flask T25. Las células se mantienen en un incubador a  $37^{\circ}\text{C}$ , atmósfera húmeda y 5% de  $\text{CO}_2$ , cambiando el medio cada 2-3 días.

---

### **4.2. SIEMBRA DE ESFEROIDES**

---

Los esferoides se generan utilizando una placa de cultivo de 96 pocillos que presentan el fondo curvo. Es necesario tratar estos pocillos con solución anti-adherente, para favorecer que las células caigan al fondo y se adhieran entre ellas en lugar de a la placa. Tras dejar actuar la solución 5 minutos, se retira y se realizan dos lavados con PBS, dejando los pocillos sumergidos en tampón fosfato salino (PBS) hasta que se vayan a sembrar.

Se parte del flask T25 con los fibroblastos cardiacos descongelados que se habían dejado crecer con medio de cultivo completo de fibroblastos cardiacos. Se retira el medio de cultivo y se lavan las células adheridas al flask con 4 mL de PBS, agitando el flask suavemente. La función de este lavado es eliminar el posible medio que no se hubiera retirado en el paso anterior. Tras retirar el PBS, se añaden 2 mL de tripsina incubando durante 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , temperatura óptima de acción de la tripsina. La tripsina es una peptidasa que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas, por tanto, es capaz de romper los enlaces que mantienen las proteínas que median la adhesión de las



células, haciendo que las células se despeguen del flask, quedando en suspensión. Tras comprobar en el microscopio óptico que las células se han levantado de la superficie del flask, se añade medio DMEM con 10% de suero fetal bovino para neutralizar la tripsina. Se resuspende varias veces para levantar y arrastrar todas las células, recogiendo los 7 mL en un falcon de 15 ml. Se resuspende para tener una concentración homogénea de células y se toma una muestra de 10  $\mu$ l y para realizar el conteo de las células en una cámara de Neubauer. Mientras se realiza el conteo, el falcon con el resto de las células en suspensión se centrifuga durante 5 minutos a 1200 rpm. Es importante equilibrar la centrifugadora con otro falcon con exactamente el mismo volumen de agua. Una vez terminada la centrifugación, se elimina el sobrenadante aspirando con una pipeta Pasteur de vidrio por medio de una bomba de aire y se resuspende el pellet de fibroblastos en medio de cultivo de mínimo a la concentración deseada. Se retira el PBS de los pocillos tratados previamente con solución anti-adherente y se siembran los fibroblastos suspendidos en el medio de cultivo mínimo a la concentración deseada. Por último, se centrifuga la placa durante 5 minutos a 1200 rpm para favorecer la precipitación y agregación de los fibroblastos en el fondo del pocillo. La placa se mantiene en un incubador a 37°C, atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, y se cambia el medio cada 2-3 días.

---

### **4.3. TINCIÓN DE VIABILIDAD DE LOS ESFEROIDES**

---

Para llevar a cabo la tinción de viabilidad, se toma el esferoide con una micropipeta con punta de boca ancha y se transfiere a un pocillo de base plana, que facilita la visualización al microscopio. La tinción se realiza añadiendo a cada pocillo 1,25  $\mu$ l de yoduro de propidio (concentración de stock 2mg/mL), un compuesto capaz de penetrar en las células muertas para intercalarse entre las dos cadenas de DNA y que tiene emite fluorescencia a 615 nm, y 0,5  $\mu$ l de calceína (concentración de stock 1mg/mL), un marcador celular capaz de penetrar en las células vivas y que emite fluorescencia a 495 nm. Se usa un derivado acetoximetilado de esta última que no es fluorescente, y que al ser absorbido por las células vivas es transportado por la membrana celular siendo transformado por esterasas en calceína fluorescente (estas esterasas solo son activas en células vivas). El trabajo con los compuestos de tinción debe realizarse sin luz debido a que son fotosensibles. Se deja incubando a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> durante hora y media, se retira el medio con el exceso de tinción de cada pocillo, se añade medio nuevo para diluir los posibles restos de tinción, y se toman imágenes al microscopio de fluorescencia confocal con un barrido en Z de todos los esferoides.

---

### **4.4. ESTUDIO DEL TAMAÑO DE LOS ESFEROIDES**

---

Se toman imágenes en campo claro con el microscopio óptico invertido de los esferoides de distintos tamaños a días 3, 7, 10, 14 y 21. Estas fotos se analizan con el software Fiji que es capaz de autoescalar las imágenes obtenidas con el microscopio en función del

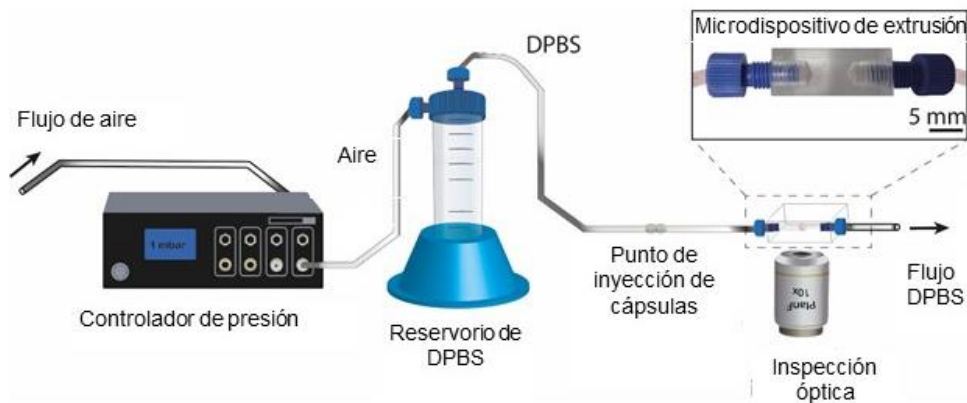
objetivo utilizado y permite medir el área de los esferoides. Una vez obtenida el área de todos los esferoides, se calcula el diámetro de estos esferoides mediante la fórmula  $A = \pi * r^2$  ( $D = 2 * \sqrt{A/\pi}$ ), donde  $A$  es el área del esferoide medida a partir de las imágenes de microscopía óptica,  $r$  es el radio del esferoide y  $D$  el diámetro de este.

---

## 4.5. EXTRUSIÓN DE LOS ESFEROIDES

---

La extrusión de los esferoides se realiza utilizando un dispositivo microfluídico de metacrilato. El dispositivo ha sido diseñado por la empresa BeOnChip S.L. (España) y fabricado por Aitiip Centro Tecnológico (España). Este microdispositivo consiste en un único canal tubular de 400  $\mu\text{m}$  de diámetro, que se reduce a 200  $\mu\text{m}$ . Para los ensayos de extrusión, el microdispositivo se conecta a un controlador de presión (OB1 Microfluidic Flow Control System, Elveflow) utilizando un sistema de tubos de PTFE de 1/16'OD (Elveflow) y un sistema de tubos TYGON (Saint-Gobain, ACF00002-C). El microdispositivo se coloca sobre un microscopio óptico invertido (Leica THUNDER) para observar el proceso de extrusión (proceso esquematizado en la figura 1).



**Figura 1.** Representación gráfica del sistema de extrusión. Imagen adaptada de un trabajo previo (18) con permiso de los autores

El dispositivo de extrusión se perfunde con tampón fosfato salino Dulbecco, DPBS, antes de introducir un esferoide en el sistema. Después, la presión se incrementa lentamente hasta 1000 Pa para posicionar el esferoide en la entrada del estrechamiento del canal microfluídico, evitando daños mecánicos. Una vez que el esferoide se encuentra correctamente situado y bloquea el paso del flujo, se aumenta la presión a un ritmo constante de 100 Pa/s, haciendo que el esferoide penetre parcialmente dentro del canal estrecho. Este proceso se graba en vídeo, junto con las mediciones de presión para su posterior análisis. Después de forzar al esferoide a atravesar el canal de extrusión, este se recoge a continuación en una placa de Petri para comprobar su integridad ópticamente. Este proceso se lleva a cabo con 6 esferoides por tiempo estudiado.

Para determinar la rigidez de los esferoides a partir de los vídeos del ensayo, los fotogramas correspondientes a los valores discretos de presión se exportan como archivos de imagen (software VLC media player). La distancia de penetración de la microcápsula en el canal de pequeño diámetro se mide utilizando el software de análisis de imagen ImageJ. La rigidez del esferoide se calcula como una relación presión/deformación ( $\Delta P/\Delta \delta$ ), donde la deformación se identifica por el porcentaje de longitud de penetración sobre el diámetro inicial del esferoide calculado previamente.

---

## **4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

---

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism6 (GraphPad Software Inc.) y todos los datos se muestran como media con desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba Mann Whitney para muestras no paramétricas. La distribución normal fue determinada mediante el test de normalidad Shapiro-Wilk. Los valores P inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

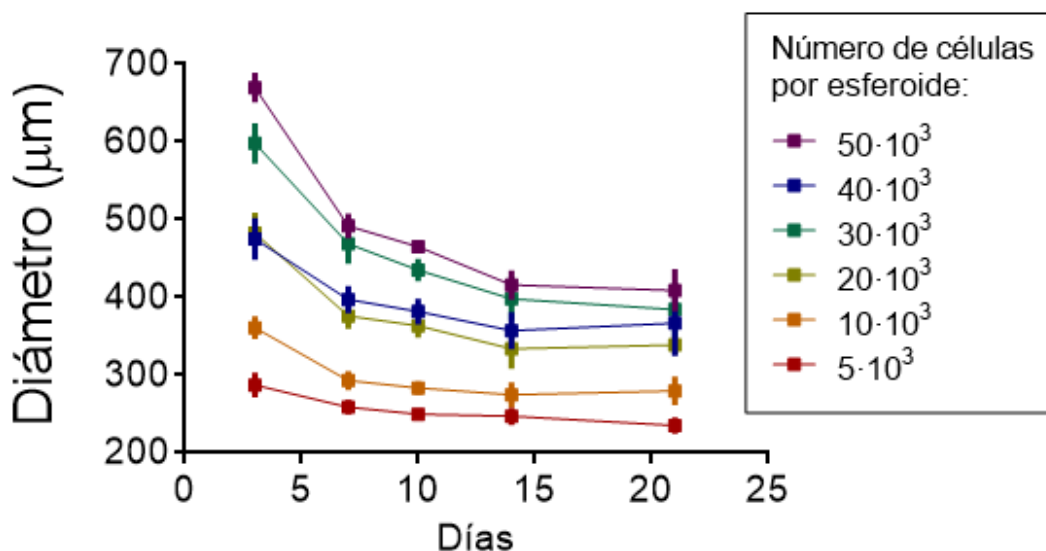
---

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. NÚMERO DE CÉLULAS Y TAMAÑO DEL ESFEROIDE

---

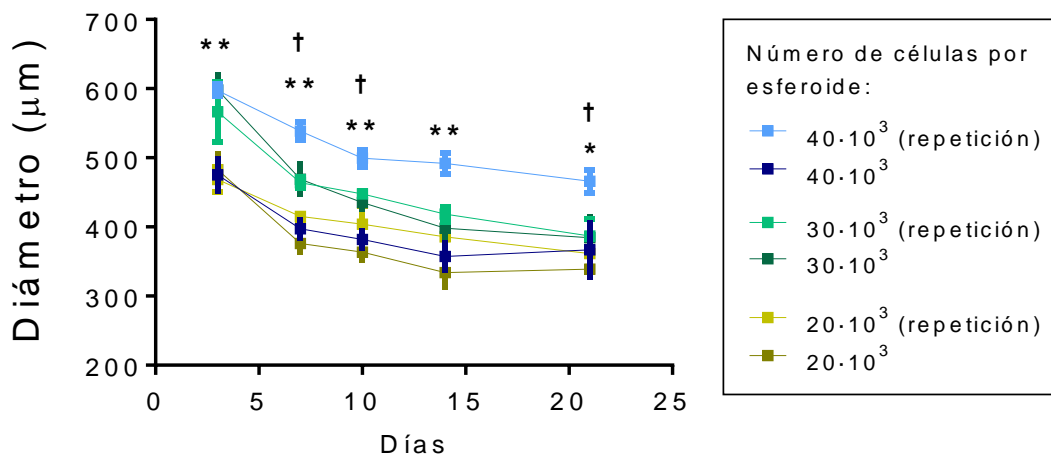
Se comenzó con un primer ensayo donde se buscó hacer un estudio del tamaño de esferoide en función del número de células iniciales, y se monitorizó el tamaño durante 21 días porque interesa encontrar el número de células óptimo para tener un esferoide inicial que sirva de control (no isquémico) pero que, con el paso de los días, al ser suficientemente grande, forme un centro isquémico. Se buscó conseguir un esferoide que tuviera un diámetro de 400  $\mu\text{m}$ , puesto que es el valor límite para generar la falta de oxígeno en el centro del esferoide, simulando isquemia cardiaca, porque el rango de difusión del oxígeno en el tejido es de unas 200 micras (19).



**Figura 2.** Diámetro de los esferoides durante los 21 días posteriores a su formación, según el número de células que se sembraron. Los puntos representan media  $\pm$  desviación típica. n = al menos 5 esferoides.

El tamaño de los esferoides se redujo con el tiempo (Figura 2), hasta alcanzar un valor constante. Esta disminución de tamaño fue muy variable según los tamaños iniciales siendo más pronunciada cuanto mayor era el tamaño inicial del esferoide. No observamos una proporcionalidad para la relación tamaño/número de células, es decir, el doble del número de células no se correspondía con el doble del tamaño del esferoide. En el caso de los esferoides de 30.000 y 50.000 células se observó que se produce una disminución muy pronunciada los primeros 5 días, consiguiendo llegar al final del experimento a un tamaño un poco superior a la mitad del tamaño inicial. Los esferoides de 20.000 y 40.000 células parecieron ser las situaciones intermedias con un descenso menos pronunciado los primeros días, mientras que los esferoides de 5.000 y 10.000 mostraron un tamaño muy estable a lo largo de todo el experimento, sufriendo una variación muy leve al inicio y alcanzando rápidamente esta estabilidad en tamaño. En el caso de estos esferoides, las células no están creciendo, al contrario que los esferoides

de células de líneas establecidas que se hacen más grandes con el tiempo. Sin embargo, las células primarias en esferoides no tienen la capacidad de división que tienen otros tipos celulares (20). Por otro lado, puesto que el esferoide se hace más pequeño, suponemos que o bien las células están muriendo o bien se están compactando. La rapidez del descenso de tamaño con una estabilización al final es indicativa de un proceso de compactación. Los primeros días tras sembrar no tenemos un esferoide completamente formado, sino un inicio de agrupación de esferoides que se va compactando hasta dar el esferoide completo. Sin embargo, aunque se esperaba que al aumentar el número de células por esferoide también aumentara el tamaño de estos, los esferoides de 40.000 no siguieron esta tendencia, ya que se situaron por debajo del tamaño de los de 30.000 y casi a la par de los de 20.000. Planteándonos un posible error experimental en los esferoides de 40.000 células, se sembró nuevamente esferoides con 20.000, 30.000 y 40.000 células por esferoide para corroborar si hubo un error en el procedimiento de cultivo de estos esferoides y obtener así el tamaño real de estos esferoides.



**Figura 3.** Gráfica comparativa que relaciona el diámetro de los esferoides de 20.000, 30.000 y 40.000 células de los cultivos originales que se representan en la figura 1 y de los nuevos cultivos, repeticiones de los originales. Los puntos representan media  $\pm$  desviación típica. N = al menos 2 esferoides. \*:  $p < 0.05$  comparando ambas tandas de esferoides de 40.000 células; \*\*:  $p < 0.005$  comparando ambas tandas de esferoides de 40.000 células; †:  $p < 0.05$  comparando ambas tandas de esferoides de 20.000 células

La figura 3 muestra como tanto los esferoides de 20.000 como los esferoides de 30.000 nuevos tienen un diámetro con respecto al tiempo muy parecidos a los obtenidos en el cultivo original, mientras que los esferoides de 40.000 nuevos muestran diferencias muy significativas en el diámetro con respecto a los originales, cumpliéndose en este caso que a mayor número de células/esferoide, mayor es el tamaño del esferoide, siendo el de 40.000 más grande que los de 30.000 y 20.000. Seguramente la producción de los esferoides descrita inicialmente fue incorrecta, posiblemente debido a una mala resuspensión del cultivo a la hora de sembrar los esferoides de 40.000.

Con todos los datos recogidos en las figuras 2 y 3, excluyendo aquellos con error experimental, y sabiendo que el tamaño deseado para intentar reproducir la isquemia

son 400  $\mu\text{m}$  de diámetro, se determinó que el número de células óptimo para este propósito es de 30.000 células/esferoide. Se llegó a esta conclusión teniendo en cuenta no solo su diámetro a día 1, sino toda su evolución a lo largo de los 21 días que se desarrolló el experimento, puesto que el estudio de la presencia de isquemia se va a realizar a 21 días.

---

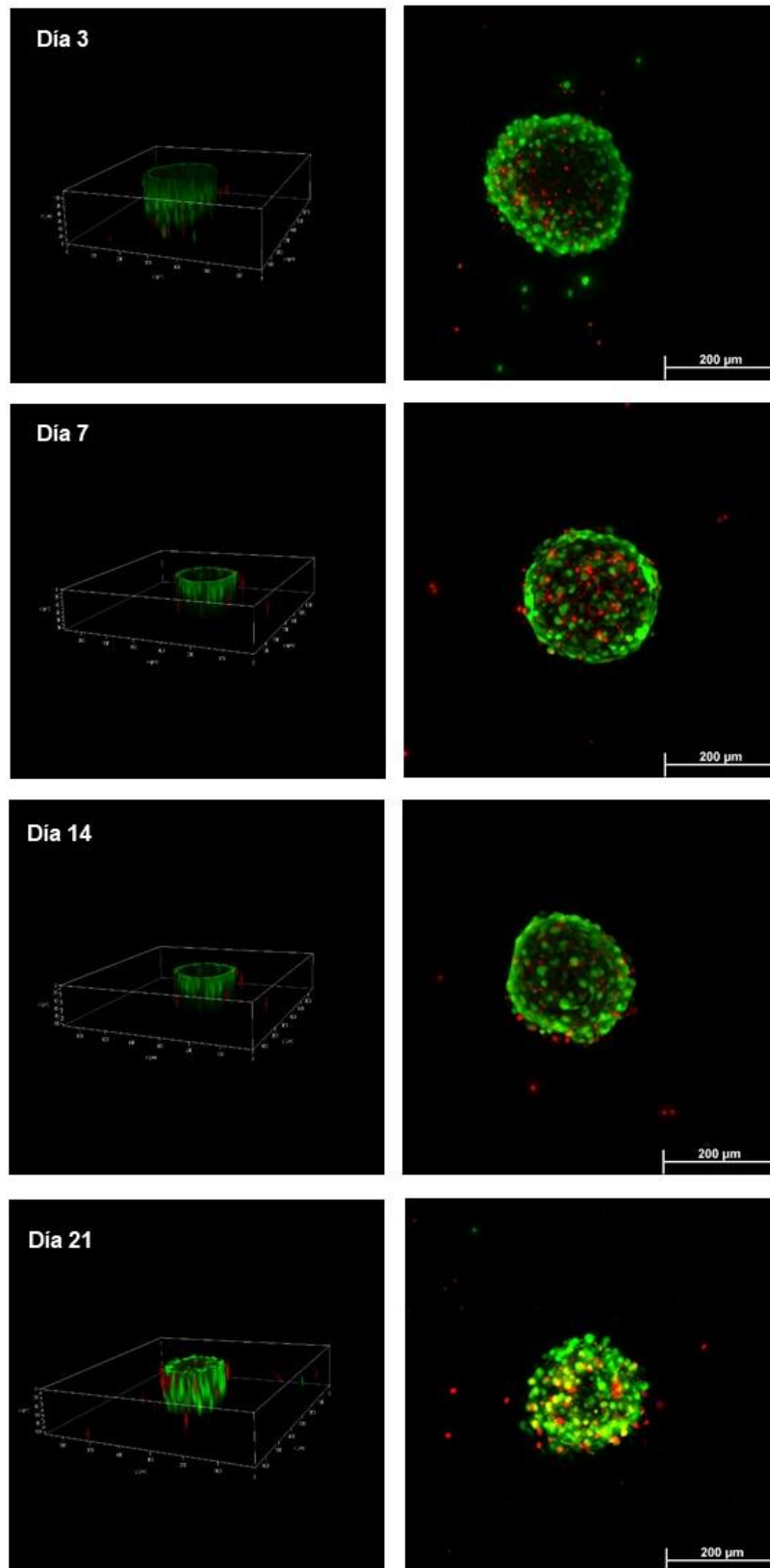
## 5.2. VIABILIDAD CELULAR

---

Para determinar la presencia de un core necrótico en los esferoides correspondiente a las células muertas por isquemia, se realizó una tinción de viabilidad que se visualizó mediante microscopía de fluorescencia confocal. En las figuras 4,5 y 6 se muestra la tinción de viabilidad de esferoides representativos de tamaño pequeño (5000 células), mediano (30000 células) y grande (50000 células). Las células vivas se marcaron con calceína (fluorescencia verde) y las muertas con yoduro de propidio (fluorescencia roja).

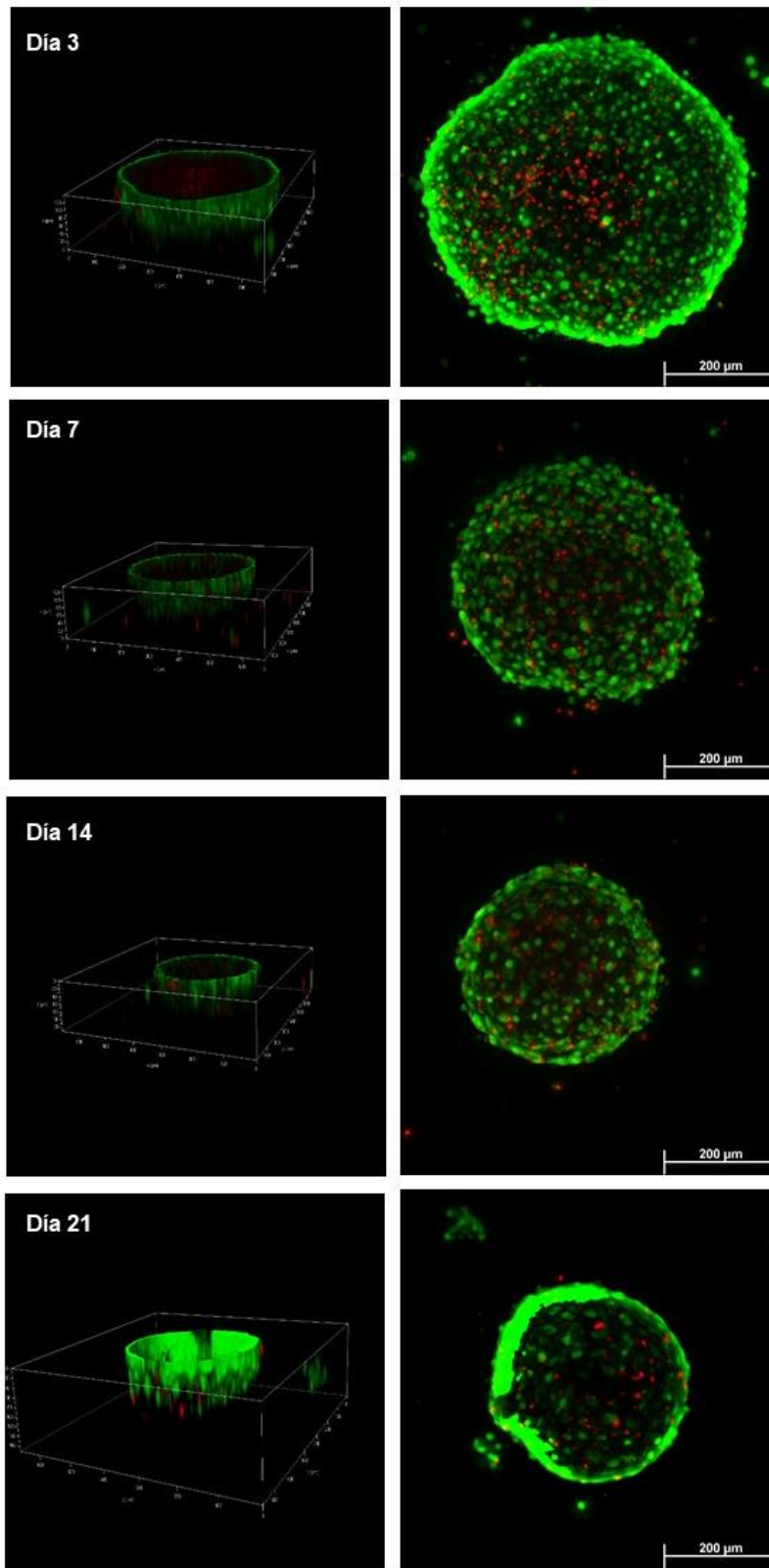
En las reconstrucciones en 3D de las imágenes tomadas no se observó la mitad superior del esferoide, ni el interior de este. Existen dos hipótesis, la primera es que la calceína y el yoduro de propidio no están penetrando en el interior del esferoide, la segunda es que sí penetran, pero con nuestro microscopio no somos capaces de ver su fluorescencia. Debido a que existen otros trabajos con esferoides más pequeños en los que sí que se ve la calceína y el yoduro de propidio en todo el esferoide consideramos que si penetran en su interior (21). Esto implica que no se observó el core necrótico que aparecería en una situación de isquemia debido al gran tamaño del esferoide. Por tanto, la proyección en Z realmente no es una representación de todo el esferoide, sino únicamente de las capas superficiales de su base. Sin embargo, el análisis cualitativo de estas proyecciones muestra la existencia una baja muerte celular en todos los esferoides. Estas células muertas están repartidas por todo el esferoide, no existiendo una concentración de estas en el centro. Tampoco se aprecian diferencias entre tamaños de esferoide ni entre los distintos días de cultivo de los esferoides. Así se concluyó que este ensayo no permite detectar correctamente la formación de isquemia, aunque da una idea de la capacidad tanto de mantener los cultivos de esferoides cardiacos durante 21 días sin que mueran por completo, como de mantenerlos independientemente del tamaño que tengan.

### Esferoide de 5.000 células



**Figura 4.** Tinción de viabilidad de esferoides de 5.000 células a días 3, 7, 14 y 21. Series de imágenes de distintos planos en Z fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia confocal. A la derecha se muestran las proyecciones en Z de los esferoides (2D) y a la izquierda la reconstrucción 3D.

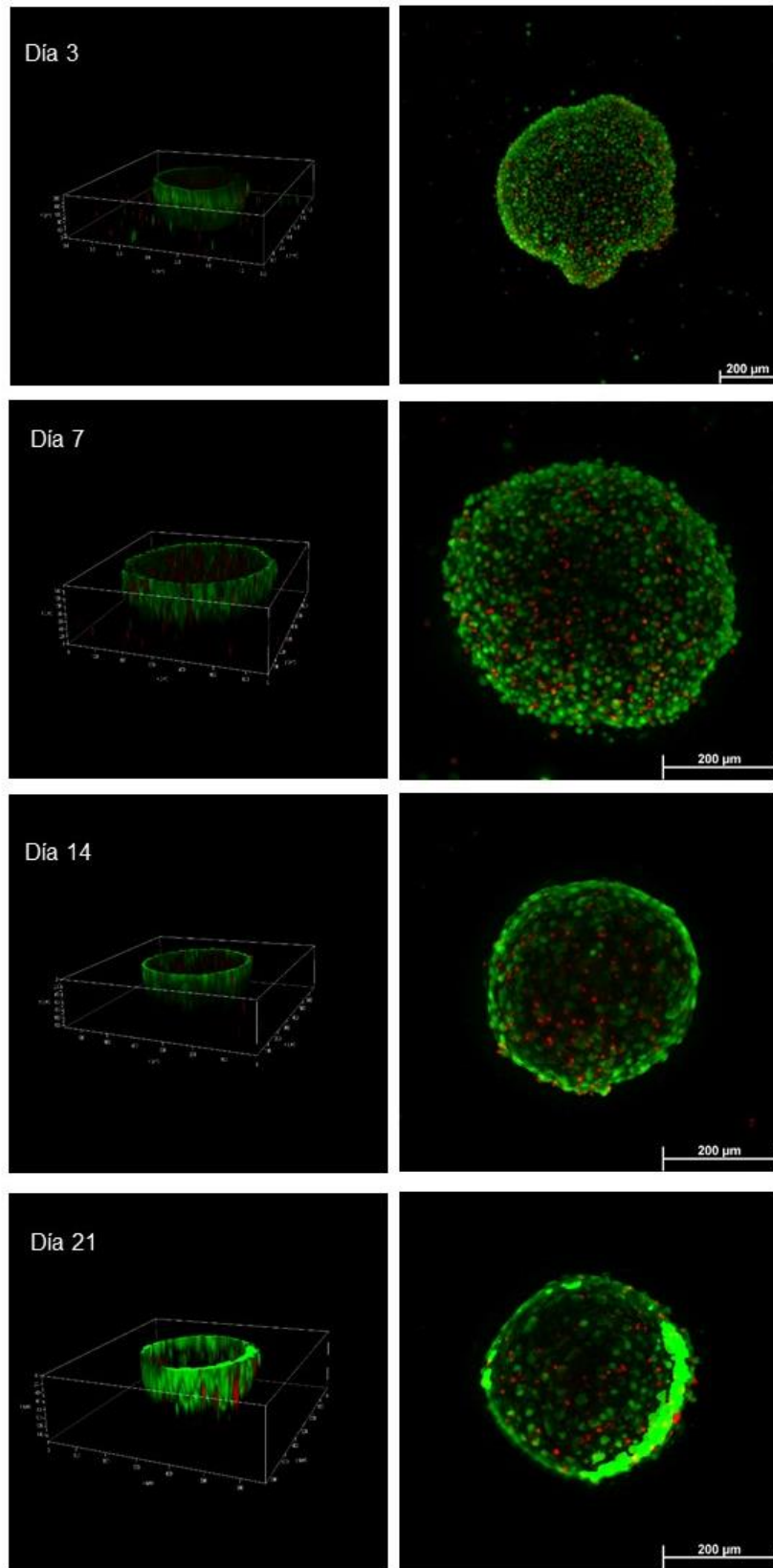
### Esferoide de 30.000 células



**Figura 5.** Tinción de viabilidad de esferoides de 30.000 células a días 3, 7, 14 y 21. Series de imágenes de distintos planos en Z fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia confocal. A la derecha se muestran las proyecciones en Z de los esferoides (2D) y a la izquierda la reconstrucción 3D.



## Esferoide de 50.000 células



**Figura 6.** Tinción de viabilidad de esferoides de 50.000 células a días 3, 7, 14 y 21. Series de imágenes de distintos planos en Z fueron obtenidas mediante microscopía de fluorescencia confocal. A la derecha se muestran las proyecciones en Z de los esferoides (2D) y a la izquierda la reconstrucción 3D.

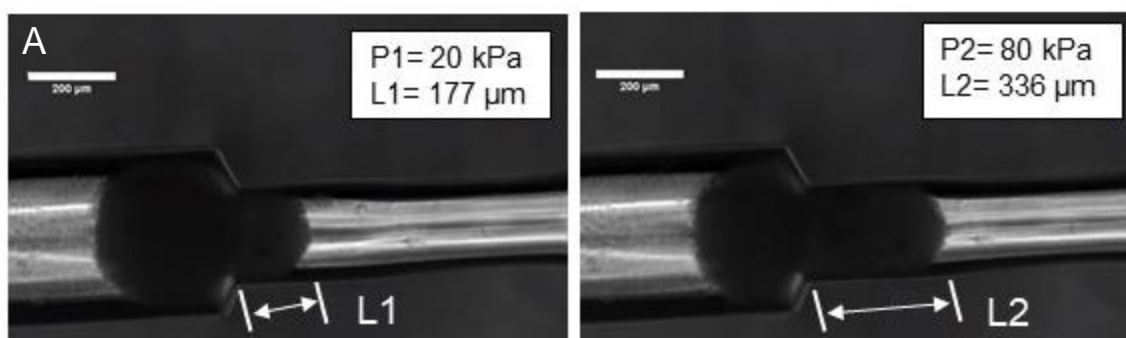
---

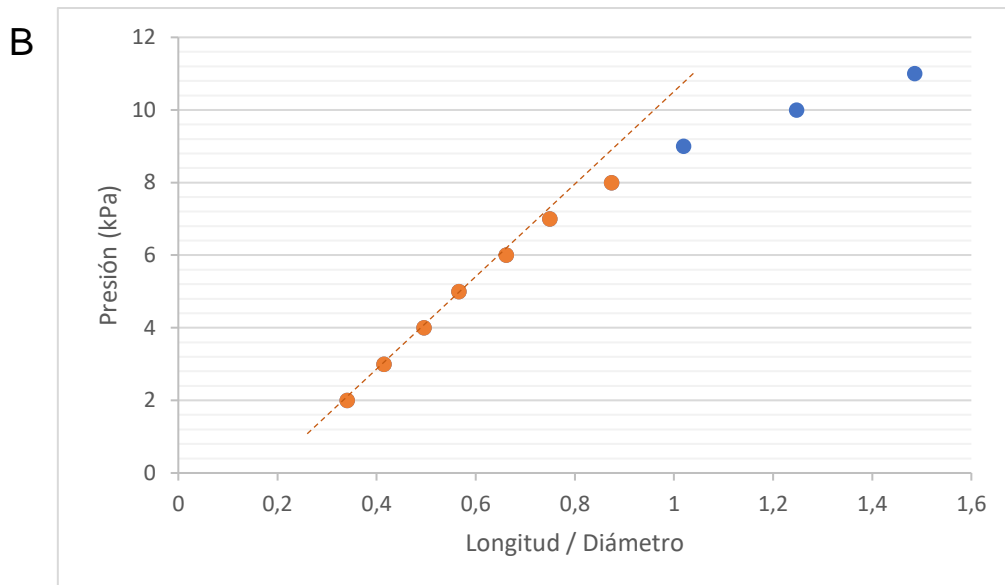
### 5.3. RIGIDEZ

---

Para determinar la presencia de un core necrótico por otra técnica distinta a la de la viabilidad, se estudió la rigidez de los esferoides mediante un ensayo de extrusión, ya que se ha descrito la relación de la presencia de core necrótico con cambios en la rigidez del esferoide (14). Para ello se utilizó un dispositivo microfluídico de un solo canal de 400  $\mu\text{m}$  de diámetro que se estrecha hasta alcanzar un diámetro de 200  $\mu\text{m}$ . Los esferoides fueron forzados a atravesar este estrechamiento mediante la presión ejercida por una bomba. A diferentes presiones aplicadas, se midió la longitud de penetración del esferoide en el canal estrecho (Figura 7A). La rigidez se obtuvo de la representación de la presión aplicada sobre el esferoide frente a la deformación, calculada como porcentaje de longitud de penetración sobre el diámetro inicial del esferoide, (Figura 7B). Los esferoides tienen un comportamiento elástico-plástico y por ello la relación presión/deformación sigue una curva en la que se distinguen dos tramos muy diferenciados.

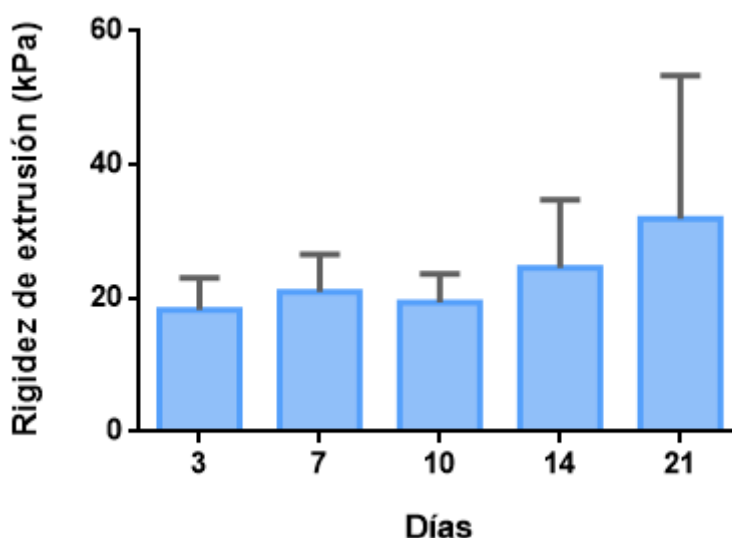
En el primer tramo, representado mediante puntos naranjas en la gráfica, la tendencia de la curva es recta ya que en esa parte la relación es constante debido a que es una región de comportamiento elástico. Los valores que se representan en esta recta son los que nos van a interesar para determinar la rigidez del esferoide ya que su pendiente va a ser el valor de rigidez del esferoide. En el segundo tramo, representado con puntos azules en la gráfica, la tendencia es curva ya que la relación presión/deformación deja de ser constante debido a que esta segunda región el comportamiento es plástico. Estos valores ya no nos interesan puesto que el esferoide al sufrir grandes deformaciones deja de comportarse como un material elástico lineal y es más difícil determinar su rigidez.





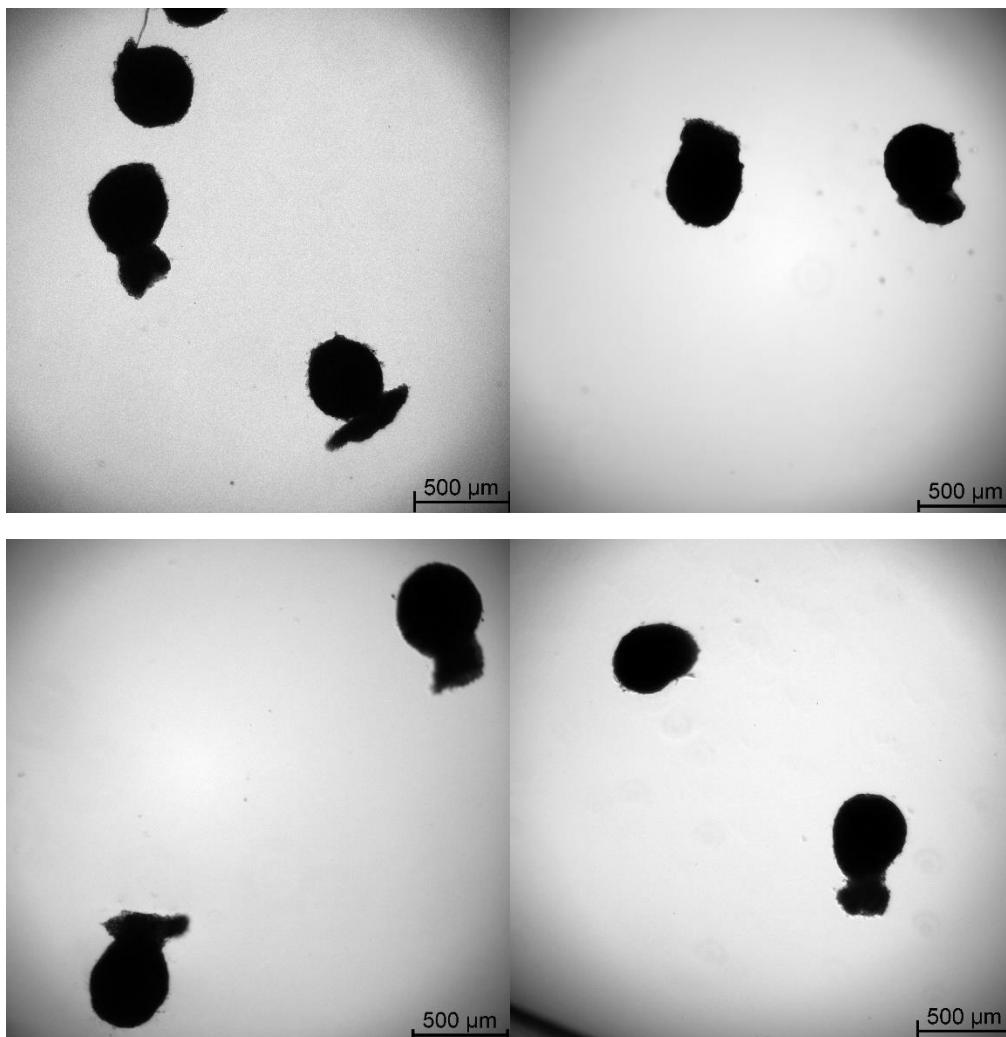
**Figura 7. A)** Imágenes de microscopía (Leica) de un esferoide en un ensayo de extrusión. Esquema del proceso del ensayo de extrusión y la longitud del esferoide que atraviesa el cambio de anchura del canal (indicada como L) a una determinada presión (indicada como P). **B)** Representación gráfica de la presión (kPa) con respecto a la deformación de esferoides cardiacos.

Así, se determinó la rigidez en los esferoides a distintos tiempos de cultivo de los mismos. Sin embargo, los valores de rigidez obtenidos no fueron estadísticamente significativos en ninguno de los días estudiados, por lo que se podría afirmar que la rigidez de los esferoides es constante con el tiempo. Esto se puede interpretar como que no hemos conseguido simular la isquemia de manera natural en los esferoides, ya que tampoco podemos confirmarlo con los estudios de viabilidad por fluorescencia, o que las técnicas para determinar la formación de la isquemia no son las adecuadas.



**Figura 8.** Rigidez de los esferoides determinada mediante el ensayo de extrusión frente a los días que llevan en cultivo estos esferoides.

Los esferoides extruidos se observaron ópticamente (figura 9). Algunos se mantuvieron intactos, mientras que la mayoría sufrieron deformaciones o se dividieron en partes dando lugar a pequeñas masas de esferoide. Esto era esperable puesto que el método de la extrusión es un proceso muy invasivo y supone un estrés mecánico muy grande para los esferoides, dando lugar a esta multitud de formas y divisiones. Cabe recordar que los esferoides tienen un comportamiento elástico-plástico, por lo que cuando llegan al régimen plástico las deformaciones son irreversibles, lo que justifica el estado de los esferoides tras el proceso de extrusión. Aquellos esferoides que tras extruirse se deforman más podría deberse a que son más plásticos que elásticos.



**Figura 9.** Esferoides extruidos observados mediante microscopio óptico invertido.

---

## 6. CONCLUSIONES

---

Respecto a la formación de esferoides cardíacos, se estudió el número de células por esferoide y el tamaño de los esferoides. Se extrajeron las siguientes conclusiones:

- Conforme aumenta el tiempo de cultivo de un esferoide, éste se vuelve más compacto y disminuye su tamaño hasta estabilizarse.
- La disminución del tamaño del esferoide no es igual para todos los esferoides, es variable para esferoides de diferente número de células y no sigue una proporcionalidad.
- El tiempo de estabilización del tamaño del esferoide es muy variable en función del número de células del propio esferoide.
- El tamaño óptimo del esferoide para obtener un diámetro de unos 400  $\mu\text{m}$  para inducir naturalmente la isquemia es de 35.000 células/esferoide.

Además, se estudió la viabilidad de las células que forman parte del esferoide, determinando que:

- Con nuestro microscopio no somos capaces de ver la fluorescencia en el centro y en la parte superior del esferoide, por lo que no podemos estar seguros de la presencia de un núcleo necrótico.
- Podemos mantener la viabilidad de un cultivo de esferoides durante 21 días porque no hay diferencia en el número de células muertas a lo largo del tiempo.
- No hay diferencia en el número de células muertas en función del tamaño del esferoide porque los cambios deben verse en el centro del esferoide donde la fluorescencia no pasa.

En cuanto a la rigidez, debido a la hipótesis de que una situación de isquemia cardíaca se correlacionaría con una variación de la rigidez, se estudió esta característica de los esferoides utilizando un sistema de extrusión. De este estudio se puede concluir que:

- La rigidez de los esferoides se mantiene constante en el tiempo
- La isquemia cardíaca parece no estar relacionada con la variación de la rigidez o la isquemia no se ha desarrollado en los esferoides estudiados

---

## CONCLUSIONS

---

Regarding cardiac spheroids, the number of cells per spheroid and the size of the spheroids were studied. The following conclusions were drawn:

- As the culture time of a spheroid increases, it becomes more compact and decreases in size until it stabilises.
- The decrease in spheroid size is not the same for all spheroids, it is variable for spheroids of different cell numbers and does not follow a proportionality.
- The stabilisation time of spheroid size is highly variable depending on the number of cells in the spheroid itself.
- The optimal spheroid size to obtain a diameter of around 400  $\mu\text{m}$  to naturally induce ischaemia is 35,000 cells/spheroid.

In addition, the viability of the cells that form part of the spheroid was studied, determining that:

- With our microscope we are not able to see the fluorescence in the centre and at the top of the spheroid so we cannot be sure of the presence of a necrotic core.
- We can maintain the viability of a spheroid culture for 21 days because there is no difference in the number of dead cells over time.
- There is no difference in the number of dead cells depending on the size of the spheroid because the changes should be seen in the centre of the spheroid where the fluorescence does not pass through.

As for stiffness, due to the hypothesis that a situation of cardiac ischaemia would correlate with a variation in stiffness, this characteristic of spheroids was studied using an extrusion system. From this study it can be concluded that:

- The stiffness of spheroids remains constant over time.
- Cardiac ischaemia appears to be unrelated to variation in stiffness or ischaemia has failed to develop in the spheroids studied.

---

## 7. REFERENCIAS

---

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. Vol. 139, *Circulation*. 2019. 56–528 p.
2. Landesberg G. Ischemic heart disease. *Preoperative Assess Manag* Third Ed. 2018;77–88.
3. Lund LH, Khush KK, Cherikh WS, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report—2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Hear Lung Transplant*. 2017;
4. Welsch U. Sobotta, *Lehrbuch Histologie*. 1. Auflage, Urban & Fischer. 2003.
5. Hartung T. Thoughts on limitations of animal models. *Park Relat Disord*. 2008;14(SUPPL.2):83–5.
6. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):839–45.
7. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids - A review on cellular aggregates in cancer research [Internet]. Vol. 113, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Springer-Verlag; 1987. p. 101–22. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00391431>
8. Polonchuk L, Chabria M, Badi L, Hoflack JC, Figtree G, Davies MJ, et al. Cardiac spheroids as promising in vitro models to study the human heart microenvironment. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
9. LaBarge W, Mattappally S, Kannappan R, Fast VG, Pretorius D, Berry JL, et al. Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation. *PLoS One*. 2019;
10. Lee MO, Jung KB, Jo SJ, Hyun SA, Moon KS, Seo JW, et al. Modelling cardiac fibrosis using three-dimensional cardiac microtissues derived from human embryonic stem cells. *J Biol Eng*. 2019;
11. Beauchamp P, Moritz W, Kelm JM, Ullrich ND, Agarkova I, Anson BD, et al. Development and Characterization of a Scaffold-Free 3D Spheroid Model of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2015;
12. Christoffersson J, Meier F, Kempf H, Schwanke K, Coffee M, Beilmann M, et al. A cardiac cell outgrowth assay for evaluating drug compounds using a cardiac spheroid-on-a-chip device. *Bioengineering*. 2018;
13. Sebastião MJ, Gomes-Alves P, Reis I, Sanchez B, Palacios I, Serra M, et al. Bioreactor-based 3D human myocardial ischemia/reperfusion in vitro model: a novel tool to unveil key paracrine factors upon acute myocardial infarction. *Transl Res*. 2020;
14. Richards DJ, Li Y, Kerr CM, Yao J, Beeson GC, Coyle RC, et al. Human cardiac organoids for the modelling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity. *Nat Biomed Eng* [Internet]. 2020;4(4):446–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41551-020-0539-4>

15. Schwarz US, Bischofs IB. Physical determinants of cell organization in soft media. *Med Eng Phys*. 2005 Nov 1;27(9):763–72.
16. Guimarães CF, Gasperini L, Marques AP, Reis RL. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nat Rev Mater* [Internet]. 2020;5(5):351–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-019-0169-1>
17. Gray A, Egan S, Bakalis S, Zhang Z. Determination of microcapsule physicochemical, structural, and mechanical properties. *Particuology* [Internet]. 2016;24:32–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2015.06.002>
18. Virumbrales-Muñoz M, Paz-Artigas L, Ciriza J, Alcaine C, Espona-Noguera A, Doblaré M, et al. Force Spectroscopy Imaging and Constriction Assays Reveal the Effects of Graphene Oxide on the Mechanical Properties of Alginate Microcapsules. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;
19. Carlsson J, Acker H. Relations between ph, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int J Cancer*. 1988;42(5):715–20.
20. Shi W, Kwon J, Huang Y, Tan J, Uhl CG, He R, et al. Facile Tumor Spheroids Formation in Large Quantity with Controllable Size and High Uniformity. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–9.
21. Kessel S, Cribbes S, Bonasu S, Rice W, Qiu J, Chan LLY. Real-time viability and apoptosis kinetic detection method of 3D multicellular tumor spheroids using the Celigo Image Cytometer. *Cytom Part A*. 2017;91(9):883–92.