

## Introducción

El uso de animales como modelos de experimentación ha sido fundamental para la investigación, sin embargo, en la actualidad existe una variedad de alternativas que no solo resultan ser éticas, sino que permiten obtener información significativa, dando lugar a la reducción o incluso el reemplazo de los modelos animales, siendo el cultivo celular tridimensional (3D) una de las opciones para sustituir o disminuir el uso de los modelos clásicos de experimentación.

Al igual que los cultivos celulares bidimensionales (2D) o tradicionales, los cultivos 3D consisten en un conjunto de técnicas que permiten la obtención y el desarrollo de nuevas células en un entorno artificial pero con la diferencia de que le otorgan a las células un medio en el cual pueden generarse interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular en un entorno similar al natural, formando cultivos con propiedades más cercanas a las que tendrían estando *in vivo*. Los cultivos 3D han mostrado mejoras en la viabilidad, morfología, proliferación, metabolismo de fármacos, entre otros (Antoni et al., 2015); dando lugar a resultados que pueden extrapolarse con el organismo objetivo.

El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una matriz de hidrogel de *Aloe vera* y agarosa que proporcione al cultivo un soporte para promover su crecimiento en 3D.

## Metodología

Se extrajo el gel de *Aloe vera* procesado con aditivos (GP) y sin procesar (GSP) para poder preparar un hidrogel de cada muestra con 25% de agarosa al 0.25% y 25% de medio DMEM suplementado con 10% de SFB en placas petri de 33 mm con cubreobjetos y en placa de 96 pozos. Como control 3D se preparó otro hidrogel con el mismo contenido, pero en lugar de gel tenía PBS.

Las células de la línea celular SiHa (carcinoma de cuello uterino) fueron sembradas en los hidrogeles con una confluencia del 13% y aparte en medio DMEM suplementado que se utilizó como control 2D. Luego de 72 horas de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, se analizó la morfología celular en un microscopio de campo claro usando los cubreobjetos de las placas petri y se evaluó la viabilidad celular con una prueba de MTT en la placa de 96 pozos. Los resultados se analizaron mediante una prueba de Mann Whitney (Figura 1).



Figura 1. Resumen de metodología.

## Resultados y discusión

En los últimos años los esferoides han sido utilizados como una alternativa al uso de modelos animales en diversas investigaciones como detección de fármacos, pruebas de nanomateriales, estudios de enfermedades neurodegenerativas, proliferación tumoral, entre otras (Białkowska et al., 2020; Ryu et al., 2019; Katt et al., 2016). Al revisar los cultivos de los hidrogeles fue posible notar que el gel de *Aloe vera* no tuvo un efecto sobre el metabolismo celular dado que el comportamiento fue similar al del cultivo 2D como se observa en las pruebas de MTT (Gráfico 1).

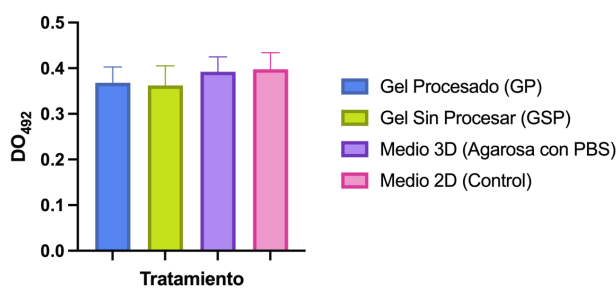


Gráfico 1. Media de los resultados de MTT con filtro de 492 nm. La prueba de Mann Whitney no encontró diferencias significativas lo que indica la ausencia de efectos positivos o negativos por parte del *Aloe vera* sobre los cultivos celulares (GP vs 2D: U=11, p=0.3095; GP vs 3D: U=11.50, p=0.3312; GSP vs 2D: U=11.50, p=0.3290; GSP vs 3D: U=13.50, p=0.5130).

## Bibliografía

- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
- Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., & Miłowska, K. (2020). Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6225. <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). *In Vitro* Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
- Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 8(12), 1620. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>

Lo anterior indica que el hidrogel es inerte a pesar de las propiedades del *Aloe vera*, siendo esta una característica importante debido a que al no afectar positiva o negativamente a las células, el uso de esta matriz puede extenderse a investigaciones con tratamientos sin que los afecte. En términos de morfología, se identificó la presencia de esferoides (Tabla 1), siendo esta una prueba de la capacidad del hidrogel para desarrollar cultivos 3D al mejorar la interacción con la matriz y entre las mismas células. Así mismo, esto también podría ser un indicativo de que estos cultivos tengan una vida útil mayor debido a que su confluencia no se limita a la superficie de la placa que suele llegar a su límite en casi una semana, sino que puede continuar mediante la aglomeración de células (Antoni et al., 2015).

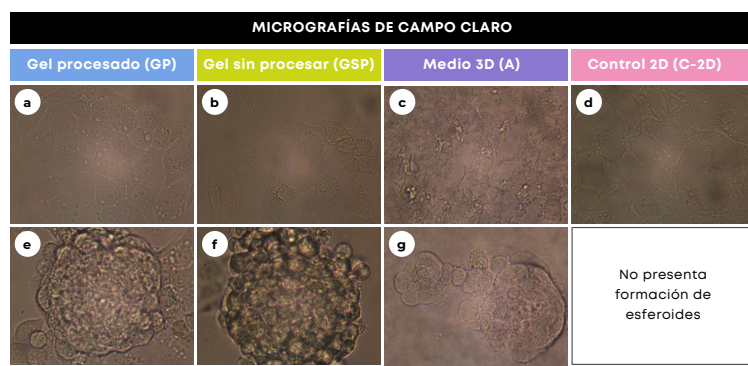


Tabla 1. Micrografías de campo claro al 40X. Las micrografías a-d muestran los cultivos extendidos como monocapa que pueden observarse en un cultivo tradicional. Por otra parte, las micrografías e-g muestran la aglomeración de células conocidas como "esferoides" características de un cultivo 3D.

## Conclusión

A pesar de que el uso de modelos animales sigue siendo fundamental en muchas investigaciones, es importante comenzar a mejorar aquellas alternativas que permitan reemplazar o reducir la implementación de estos modelos. Por ejemplo, los cultivos 3D pueden dar una mejor representación del comportamiento *in vivo* que el que dan los cultivos tradicionales, dando información más significativa del resultado de tratamientos y reduciendo el uso de ejemplares animales, enfocándose específicamente en el organismo de interés.

El protocolo que aquí se presenta muestra ser una opción para el desarrollo de cultivos celulares 3D y podría utilizarse en diversas investigaciones y protocolos de citotoxicidad en pruebas preliminares de forma que se pueda reducir el uso de animales. Sin embargo, aún se requiere realizar otras pruebas y verificar si las propiedades del *Aloe vera* tienen algún efecto sobre el cultivo, siendo una de las razones por la cual se seleccionó esta planta para el desarrollo del hidrogel. Los experimentos muestran que se logró formar una matriz que permite la proliferación y viabilidad de cultivos 3D de una manera similar al de un cultivo celular tradicional 2D.