



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Nanoegiturazko biomaterial
magnetikoen aplikazioa ehun-
ingeniaritzan**

*Izaro Solozabal Azcarate,
Raquel Zurbano Tejada,
Maria Dolores Boyano Lopez,
Beatriz Arteta Ruiz,
Aitor Benedicto Garcia,
Carolina Redondo Esteban eta
Rafael Morales Arboleya*

247-254 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.31>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Nanoegiturazko biomaterial magnetikoen aplikazioa ehun-ingeniaritzan

Izaro Solozabal¹, Raquel Zurbano¹, M^a Dolores Boyano^{2,3}, Beatriz Arteta², Aitor Benedicto², Carolina Redondo¹, Rafael Morales^{4,5},

1. Kimika-fisikoa saila, EHU/UPV, Leioa, 48940. 2. Zelulen Biologia eta histologia saila EHU/UPV, Leioa, 48940. 3. Biocruces Health Research Institute, Barakaldo 48903. 4. Kimika-fisikoa saila eta BCMaterials, EHU/UPV, Leioa, 48940. 5. IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbo, 48011.
izaro.solozabal@ehu.eus

Laburpena

Ehun konektiboko zelulak magnetikoki kontrolatzeko ahalmenak aukera berriak sortu ditu medikuntza birsortzailean. Nanopartikula magnetikoak barneratuta dituzten zelulak kanpoko eremu magnetikoen bidez manipula daitezke. Eremu magnetikoek zelulen kanal mekano-sentsitiboak estimulatu dituzte, eta horiek erantzun biologiko bat aktibatzen dute: ehunen eraketa, zelulen ugalketa eta atxikipena eta zelula-zelula arteko elkarrekintzak, besteak beste. Tesi honen helburua da nanoiman biobateragarrien garapena baliozkotzea kanpoko eremu magnetikoen laguntzaz ehun-birsorkuntza prozesuetan. Horretarako, disko-formako nanoegiturak fabrikatuko dira, orain arte erabili diren nanopartikulen aldean bi ezaugarri bereizgarriekin: erantzun magnetikoa altuagoa da eta forma-asimetriari esker, torkeak aplikatu ahal izango dira zelulak estimulatzen. Biomaterial hauen eraginkortasuna zelula endotelialen eta fibroblastoen hazkuntza bidimentsionalean (2D) eta irla magnetikoak dituzten substratuetan egiaztatuko da eta esferoideen eraketa duten hazkuntza tridimentsionalean (3D) heltzea da azken helburua.

Hitz gakoak: ehun-ingeniaritza, lebitazio magnetikoa, nanopartikula magnetikoak, medikuntza birsortzailea, esferoideak

Abstract

The possibility to control remotely magnetically on connective tissue cells has opened up new possibilities in regenerative medicine. Cells that internalise magnetic nanoparticles can be manipulated by external magnetic fields. The action of these fields stimulates mechanosensitive channels, which trigger a biological response that affects proliferation, adhesion and intercellular interaction in tissue formation. The aim of this thesis is to validate the development of new biocompatible nanomaterials that allow effective control of magnetic field-assisted tissue regeneration. To this end, disc-shaped nanostructures will be fabricated with two important distinctive features compared to the nanoparticles that have been used to date: their magnetic moment is much higher and their shape asymmetry will allow torques to be applied as a source of cell stimulation. The efficacy of these biomaterials will be verified in two-dimensional cultures of endothelial cells and fibroblasts on substrates with magnetic island patterns and in three-dimensional cultures with the formation of spheroids.

Keywords: tissue engineering, magnetic levitation, magnetic nanoparticles, regenerative tissue, spheroids

1. Sarrera eta motibazioa

Medikuntza birsortzailea diziplina mediko berria da eta kaltetutako zelulak konpontzea eta ehun berriak garatzea sustatzen du, zelula-terapia eta ehun-ingeniaritzako prozesuen bidez. Zeharkako diziplina bat da, eta haren aurrerapenetatik onura ateratzen dute gaixotasun kardiobaskularren terapiak, hezurretako lesioek, endekapenezko gaixotasun neurologikoei, muskuluak edo tendoiak sendatzeko praktikek edo ebakuntza kirurgikoei, diabetesak edo pazienteen adin aurreratuak prozesu ultzeradun eta orbainetan eragindako konplikazioek.

Zelula amen ezagutzan azken urteetan lortutako aurrerapenak eta ehun-egituraren osagai ezberdinetan bereizteko duten gaitasuna kontuan hartuta, medikuntza birsortzaileak

organismoaren zelulen arteko autokonponketarako teknika oparoak eskaintzen ditu, eta, beraz, gaurkotasan eta interes handiko azterketa-eremu bihurtu da, biztanleriaren osasunean duen eraginagatik (Kharbikar et al., 2022).

Zelulek etengabe behar dute substratu eta seinale-biologikoen elkarrekintza. Seinale horiek zelulak ugaltzea sustatzeaz gain, bideragarritasuna areagotzen dute. Oro har, hazkuntza bidimentsionaleko sistema tradizionalak, non zelulak geruza bakarrean hazten diren, muga batzuei aurre egin behar diete zelula-anitzeko baldintzetan (*in vivo*). Horrek, besteak beste, zelulen ezaugarriak eta minbizi-zelulak dituzten azterketa zelularrak mugatzen dituzte. Horregatik, hiru dimentsioko zelula-hazkuntza sistemek zelula-mikroingurunearen antzeko baldintzak berrosa ditzakete. Sistema horiek zelula-zelula eta zelula-matrize interakzio-sareak eraikitzen dituzte, eta, horrela, zelula-mekanismoak sakonago ikertu daitezke.

3Dko hazkuntza-ereduak oso interesgarriak dira birsorkuntza-medikuntzan, organismoaren jatorrizko ehunaren antzeko mikroingurunea sortzen dutelako eta zelulen dinamika konplexua modu espezifikoagoan aztertzea ahalbidetzen dutelako. Bi metodologia daude 3D eredu horiek prestatzeko: aldamiok eta esferoideak deritzenak. Aldamioak biomaterial porotsuen egiturak dira, zelulak finkatzeko eta hazteko euskarri gisa balio dutenak. Aldiz, esferoideak zelulen agregazio tridimentsionalak dira, non aldamiorearen euskarririk gabe, lekuko ehuna hobeto imitatzen duen zelula-hazkuntza lortzen den. Hazkuntza-eredu hauek lortzeko modu bat zera da: zelula imanduek eta iman iraunkorrek sortutako eremu magnetiko estatikoak erabiltzea. (Kim et al., 2020).

Tesi-proiektu honek lebitazio magnetikoan oinarritutako hazkuntzan enfokatzen du bere ikerketa-ildoak. Teknika horrek zelula indibidualak isolatzea eta, horrela, mekanismo zelularrak eta kanal ionikoen aktibazioa aztertzea ahalbidetzen du (Dobson, 2008). Horrela, zelulen posizioa eta migrazioa kontrola daiteke kanpoko eremu magnetiko bat aplikatuz. Imanek sortutako eremu magnetikoak nanopartikulak barneratuta dituzten zelulak atxikitzen ditu, eta ehunen sorrera erraztu.

Lebitazio magnetikoan oinarritutako azken ikerkuntzek partikula formako imanak erabiltzen dituzte zelulekin kontaktuan. Kanpoko eremu magnetikoaren eraginez, partikula magnetikoak dituzten zelulak grabitatearen aurka lebitatzen dira eta zelula-masaren geometria aldatu egiten da. Izan ere, zelulen arteko interakzioa errazten da eta horrek zelula-agregazioa eragiten du (Tocchio et al., 2018). Eremu magnetikoek nanoegiturak barneratuta dituzten zelulen gain urrutiko kontrola ahalbidetzen dute, zelula eta molekulen arteko interakzioak sortzen baitituzte, eta honek ehunen birsorkuntza edo sendatze-prozesuak erregulatzeko lagundu dezake (Henstock et al., 2018).

Azken hamarkadan, hainbat ikerketak erakutsi dute nanopartikula superparamagnetikoek (NPSP) ahalmen handia dutela teknika horretan. NPSPak burdina (III) oxidoz (Fe_3O_4) osatuak daude. Egoera superparamagnetikoa material ferromagnetiko baten neurriak oso txikiak direnean lortzen da, anisotropia magnetikoa gainditzen da eta materialak ezin du bere une magnetikoaren norabidea egonkor mantendu. Norabide hori etengabe dabil noranzko guztietatik, eta materialaren une magnetikoaren batezbestekoa zero da. Ezaugarri hori funtsezkoa da NPSPen edozein aplikazio biomedikorako; izan ere, zero izango ez balitz, organismoan aglomeratu eta tronboak sortuko lirakeke. Hala ere, eremu magnetikoen eraginpean jartzerakoan, une magnetiko bat sortzen da partikuletan, eta horrela lortzen da gure helburua: haiengan urrutitik eragin ahal izatea, hain zuzen (Liu et al., 2020).

Zelulen antolamendua hainbat parametroren menpe dago. Hala nola, eremu magnetiko mota (estatikoa edo alternoa), denbora, uniforme edo gradienteduna, espazioa, intentsitatea, maiztasuna eta, azkenik, partikulen tamaina, forma eta kopurua. Partikula horien erantzun magnetikoak aldaketak eragin ditzake zelulen kanal ionikoetan eta ehunen hazkuntza hobetzen duten ibilbide intra-zelularrak kitzikatu ditzake (Dasari et al., 2022).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun, ehun birsorkuntzako aplikazio preklinikoetan eta klinikoetan egindako aurrerapenak ehunen birsorkuntzan faktore kitzikatzaileak identifikatzen eta lortzeko datuak nagusiki. Faktore horiek dira kaltetutako ehunaren ingurunea aldatzea eta zelulak eremu horietara mugitzea ahalbidetzen duten faktore kimikoak edo biokimikoak, eta, kaltetutako ehunerako migrazio zelularra eta zelulak leku batean finkatzea ahalbidetzen dute. Estrategia berriak aurkitu dira azken urteotan, besteak beste, metodo fisikoetan oinarritutakoak, hala nola eremu elektrikoak, argiaren esposizioa, beroa, ultrasoinuak eta magnetismoa.

Aukera horien artean, nanopartikula magnetikoetan oinarritutako biomaterialek ikerketa-ildo berri bat zabaldu dute. Ezaugarri nagusi gisa, zera esan genezake: mota horretako materialek aukera ematen dutela kokapen eta mobilizazio espezifiko bat gidatzeko, kanpoko eremu magnetikoen urruneko ekintzaren bidez kontakturik gabeko manipulazio bat egiteko. Horrek aukera ematen du gutxieneko esku-hartze inbaditzaileak diseinatzeko eta aldi baterako modulazio zehatz bat egiteko, kanpoko eremu magnetikoak aktibatuz eta desaktibatuz (Van de Walle et al., 2020).

Orain arte partikula magnetikoekin egindako ehun-ingeniaritzako ikerketa gehienek burdina oxidoz osatutako nanomaterialak erabili dituzte; disko-formako nanoimanek, berriz, %95eko purutasuna dute burdinan. Horren ondorioz, materialaren parametro intrintsekoa, imanazioa (une magnetikoa/bolumena) oxido-partikulena baino lau aldiz handiagoa da. Gainera, partikula superparamagnetikoek 15 nm-tik beherako neurriak izan behar dituzte egoera magnetiko berezi horri eusteko; diskoek, berriz, mikrako tamainak har ditzakete, baita haien konfigurazio-bortizea mantendu ere. Horren ondorioz, diskoen une magnetikoa NPSPena baino milaka aldiz handiagoa da. Horrelako nanoimanekin, eremu magnetikoa aplikatuz ehunak sortzeko egungo erronketako bati aurre egitea da helburua: erantzun magnetiko handiagoa duten biomaterialak lortzea, zelulen manipulazioan eremu magnetikoen intentsitatea murrizteko, eta material-kantitatea minimizatzea, arrisku zitotoxikoak murrizteko.

Ezaugarri hauei esker, kanpoko eremu magnetiko uniformeek torke bat sortzen dute zelulen estimulazio-iturri gisa jarduten duena. Hau da, eremu magnetikoa aplikatzean nanoimanak birarazteko indarrak zelulen atxikipena eta finkapena areagotuko du ehunen eremu kaltetuetan, eta zelulak eremu horietara urrutitik gidatzeko gaitasuna ere.

Beraz, ikerketaren helburu nagusia bortize-egoeran dauden burdinazko nanoimanak fabrikatzea eta karakterizatzea da, disko-formarekin. Horretarako, diametro eta lodiera desberdineko diskoen karakterizazio magnetiko bitartez aplikazio honetarako tamaina egokiena dutenak aukeratuko dira.

Zelula-hazkuntza (zelula endotelialak eta fibroblastoak) probetan efektu toxikorik eragiten ez dutela baieztatuko da; eta gainera, zelulek diskoak barneratzeko behar duten denbora aztertuko da. Horrela, zelula-mota bakoitzerako nanodiskoek zelulen barruan irauten duten denbora aztertuko da, inkubazio-denbora bakoitzerako barneratze-mailarekin lotuz, eta ondorengo azterketetarako nanodiskoek kontzentrazioa, inkubazio-denbora eta zelula barnealdean emandako denbora hoberena aukeratuko dira iraupen luzeko hazkuntza-azterketetarako.

Izan ere, zelulek ibilbide desberdinak erabiltzen dituzte diskoak barneratzeko: fagozitosia, mikropinozitosia eta errezeptoreen bidezko endozitosia, besteak beste. Oro har, fagozitosiak >500 nm tamainako partikulekin gertatzen da; mikropinozitosiaren bidez molekula eta ioiak barneratzen dira; eta, partikula txikiagoak errezeptore bidez barneratzen dira: klatrina edo kabeolina bidez, esaterako (Vercauteren et al., 2010). Mekanismo hauek kontuan izanda, zelulak tamaina desberdineko diskoak barneratzeko zein bide erabiltzen duen aztertzea interesgarria litzateke.

Diskoak urrez estalita dauden arren burdinaren oxidazioa saihesteko eta nanoegituren biobateragarritasuna errazteko, zelula-hazkuntzan nanodiskoek biokonpatibilitatea aztertuko da.

Hazkuntza bidimentsionaletan zelulen proliferazioa aztertzea da helburua, patroi magnetikoak dituzten substratuetan, ea berrantolatzeko gai diren eremu magnetikoak aplikatu ondoren.

Azterketa honek 0.1 Hz eta 10 Hz arteko maiztasuna duten eremu estatikoak edota txandakako eremuak erabiltzea du xedea, parametro horiek erabakigarriak baitira NPSP bidezko erantzun zelularren ikerketetan.

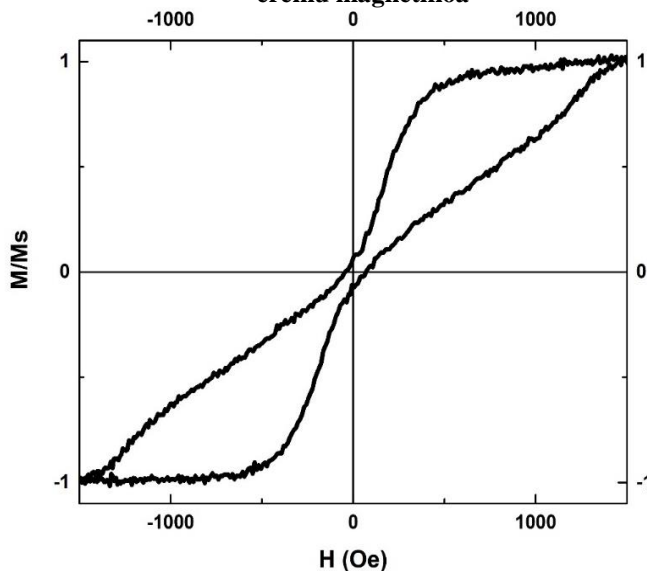
Beraz, zelula endotelialak eta fibroblastoak plaka ez-itsasgarrietan haziko dira eta nanodiskoekin batera inkubatuko dira. Aurretik azaldutako eremu magnetikoaren eraginpean jarriko dira, eta indar magnetikoak gidatutako lebitazioan dauden bi zelula-moten agregazio-dinamika aztertuko da.

Zelula endotelialek ehunen sorreran parte hartzen dute, hori dela eta, ehun ingeniartzako ikerketan erabiltzen dira. Izan ere, odol-hodiak osatzen dituzte, ehun birsorketan funtsezkoa dena. Hauekin batera, fibroblastoak, ehun konjuntiboko zelularik ohikoenak, ikerketa hauetan erabili ohi izan dira, hainbat egituraren euskarri direlako. Fibroblastoen funtzioa zelulaz kanpoko matrizearen sintesia eta hura mantentzea da, eta zuzenean lotuta dago ehunen orbaintze- eta sendatze-prozesuetan (Shimizu et al., 2022).

3. Ikerketaren muina

Tesi-proiektu honek diziplina anitzeko ikerketa proposatzen du, medikuntza birsortzailean aplikatuko diren biomaterial magnetiko berriak garatzeko. Magnetismoaren (Fisika) eta biologia tisularren (Medikuntza) arloetako ikerketa taldeen arteko lanak materialen diseinuaren eta zelula-hazkuntzaren arteko etengabeko atzeraelikadura lagunduko du. Oraindik medikuntzan aztertu ez diren espin-konfigurazioa duten nanoimanak sortuko dira (Irudia 1) eta substratu magnetikoz eta iman iraunkorrez osatutako plataformak diseinatuko dira, 2D eta 3D zelula-hazkuntza azterketak egiteko. Helburu nagusia diseinu horiek optimizatu eta nanoimanen propietate magnetikoak eta zelulen hazkuntza egokitzea da, ehunak sortzeko prozesuetan egungo errendimendua hobetzeko. Funtzio zelularren kontrolak eragin nagusia du aplikazio klinikoetan. Proiektu honetan garatutako biomaterialeekin gaur egun ehun-ingeniartzan erabiltzen diren materialen muga teknikoak gaizto nahi dira, eremu magnetikoen bidez estimulu fisikoa jarduera biokimiko bihurtzen duten mekano-transdukzio ibilbideak areagotuz.

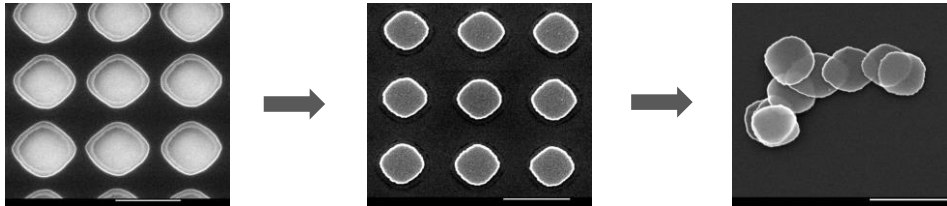
Irudia 1. Bortize- egoeran dagoen burdinazko disko baten histeresi magnetikoa. M/M_s diskoaren imanazio normalizatua da eta H aplikatutako eremu magnetikoa



3.1. Diskoen fabrikazioa

Taldeak esperientzia du litografia-interferentziaren bidez geometria zirkularreko ereduak ekoizteko. Erretxina negatiboetarako esposizio-denborak optimizatuko dira diskoen tamaina bakoitzerako. Karakterizazio morfologikoa ekorketa-mikroskopia elektroniko bidez (SEM) egingo da. *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM) magnetometria-neurketekin, espinen konfigurazioa aztertuko da, diskoen bortize-egoera baieztatzeko. Material magnetikoa elektroio bidezko lurrentze bidez jalkiko da. Izan ere, diskoek geruza anitzeko egitura dute; hau da, burdina oxidaziotik babestuko da goiko eta azpiko urregeruza batekin. Bestalde, substratutik askatzeko, aluminio-geruza bat jarriko da (Irudia 2).

Irudia 2. Fabrikazio-prozesuko etapak: Interferentzia-litografia, elektroio bidezko lurrentzea eta diskoen askapena



3.2. Nanodiskoaren barneratze- eta zitotoxikotasun azterketak

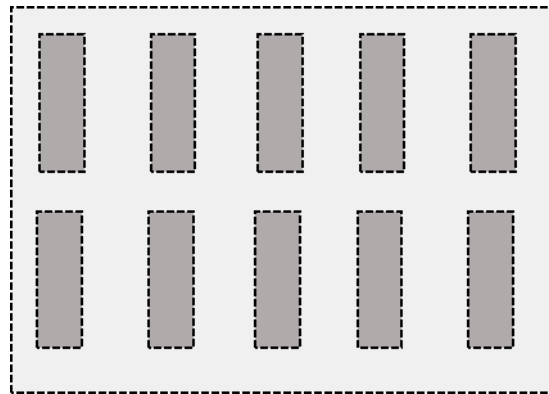
Lehenik eta behin nanodiskoek, nahiz eta urrez estali diren, eragin toxikorik ez dutela sortzen baieztatuko da. Horretarako, nanodiskoak zelula endotelial eta fibroblastoen haziko dira kontzentrazio eta denbora desberdinetan eta zelulen biziraupena PrestoBlue zundaren bitartez baieztatuko da.

Gainera, barneratze-azterketak egingo dira, zelula mota bakoitzak denbora desberdina behar baitu nanodiskoak barneratzeko. Zelulak barneratutako diskoen kopurua *Super Quantum Interference Device* (SQUID) magnetometria-neurketekin estima daiteke. Horrela, inkubazio-denbora bakoitzerako barneratze-kontzentrazioarik altuena aukeratu da kanpoko eremu magnetikoen aplikazioko entseguetarako.

3.3. 2D zelula-hazkuntza: patroio magnetikoak dituzten substratuak

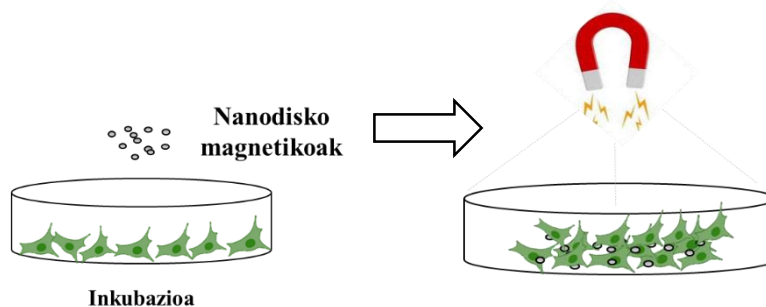
Litografia optiko bidez, laser bidezko idazkera erabilia, irla magnetikoak deritzenak (Irudia 3) sortuko dira. Irla horietan material magnetikoa jalkiko da elektroio bidezko lurrentze bidez eta, ondoren, zelula-hazkuntza aztertuko da substratu hauetan. Hau izango da migrazio zelularra eta zelulen proliferazioa aztertzeko diseinatuko den esperimentua diskoak barneratuta dituzten zelulekin.

Irudia 3. Litografia optiko bidez fabrikatzea espero diren irla magnetikoak



Funtsezkoa izango da zehaztea zenbat denboran aplika daitezkeen kanpoko eremu magnetikoak, zelulen funtzionaltasuna mantenduz. Horretarako, patroï magnetikoak dituzten substratuetan, zelula endotelial eta fibroblastoen hazkuntzetan zelulen bizirautea baieztatuko da, PrestoBlue metodoarekin kanpoko eremu magnetikoa aplikatu ondoren. Horrela, bi zelula-motek 1, 2, 4 eta 8 egunez duten distribuzioa aztertuko da; eremu magnetiko mota eta intentsitatea optimizatu ahal izateko (Irudia 4).

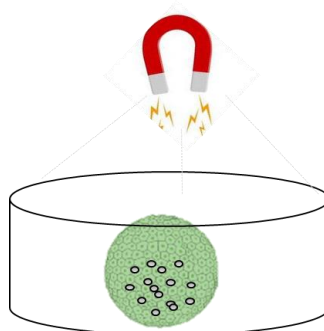
Irudia 4. 2D hazkuntza zelularretarako diseinatutako esperimentua



3.4. 3D zelula-hazkuntza: esferoideak

Zelula endotelialak eta fibroblastoak plaka ez-itsasgarrietan haziko dira nanodiskoekin batera. Aurreko atalean diseinatutako eremu magnetikoaren menpe jarriko dira, eta indar magnetikoak gidatutako lebitazioan dauden bi zelula-motek agregazio-dinamika aztertuko da (Irudia 5). Eremu magnetikoa hazkuntza-denbora desberdinetan aplikatuko da, eta 18-24 orduko inkubazioaren ondoren, esferoideak bildu egingo dira aztertzeko.

Irudia 5. 3D esferoideen formazioa



4. Ondorioak

Proiektu honetan aurkeztu den zelula-funtzioa aktiboki kontrolatzeko mekanismo honek oso ikerketa-tresna erabilgarria eskaintzen du banakako zeluletako, bi dimentsioko hazkuntzako eta hiru dimentsioko ehunetako prozesuen ezagutzan aurrera egiteko, aplikazio biologiko eta klinikoen azken helburuarekin.

Lehenik eta behin, kanpoko eremurik aplikatu gabe, zero imanazioa duten burdinazko nanodiskoak fabrikatuko dira, diametro eta lodiera egokiarekin. Ondoren, nanopartikulek efektu toxikorik ez dutela baieztatu behar da; eta, horrela, patroi magnetikoak dituzten substratuetan zelulen forma eta haien zitoeskeletoaren antolamenduari zuzenean eragitea dugu helburu kanpoko eremu magnetiko bat aplikatuz. Aplikatutako eremu magnetiko uniformeek mugimendu eta migrazioa sortuko dute diskoak barneratu dituzten zelulen gainean. Nanodisko magnetikoak dituzten zelula-hazkuntzetan prozesu biokimikoak, seinaleztapen molekularra eta zelulen adierazpen genetikoak aztertuko dira; zelulen proliferazio-azterketa hori baita esferoideen hazkuntzara salto egiteko pauso erabakigarria.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

3D esferoideen hazkuntza ereduak erabilera ugari dituzte: zelulen egitura-funtzio erlazioei buruzko *in vitro* ikerketak egiteko aukera ematen dute eta ingurune organikoko zelula-substantzia edo egituren arteko interakzioari buruzko ikerketetarako tresna egokiak dira. Halaber, hazkuntza-faktoreak, zitokinak, zelulaz kanpoko matrizearen osagaiak eta abar, edo zelulen eta inguruneari buruzko hainbat eragileren arteko erlazioaren analisia egiteko erabili daitezke. 3D hazkuntza-eredu horien erabilerarekin lortutako emaitzei esker estimatu daiteke zein diren zelulak mantentzeko baldintzak, organismo bizioan dauden baldintzen oso antzekoak baitira.

Horrela, gaixotasun neurodegeneratiboen edota tumoralen eredu gisa erabili daitezke, izan ere, animalia-ereduek ez dituzte gizakiengan dauden ezaugarri adierazgarriak, eta horrek haien aplikagarritasuna mugatzen du. Honekin lotuta gaur egun animalia-ereduak erabiltzea murriztu nahi da bioetika dela eta, beraz, esferoideekin lan egiteko aukera biziki haziko da etorkizunean.

Azkenik, zelulen transplante-terapiarako genetikoki eraldatutako esferoideak garatu dira azken urte hauetan. Esferoide horiek suspentsioan prestatzen dira, ondoren pazientearengan injektatzeko. Esferoide horien transplantearen ondoren, aldatutako adierazpen genikoa luzaroago mantentzen da pazientearen ehunetan; aldiz, geruza bakarreko plaken bidez hazitako zelulen adierazpena (2D) murriztu egiten da transplantea egin eta denbora gutxira (Ryu et al., 2019).

6. Erreferentziak

- Dasari, A., Xue, J., & Deb, S. (2022). Magnetic Nanoparticles in Bone Tissue Engineering. *Nanomaterials*, 12(5), 757. <https://doi.org/10.3390/nano12050757>
- Dobson J. (2008). Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 3(3), 139–143. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.39>
- Henstock, J. R., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2018). Magnetic ion channel activation of TREK1 in human mesenchymal stem cells using nanoparticles promotes osteogenesis in surrounding cells. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418808695. <https://doi.org/10.1177/2041731418808695>
- Kharbikar, B. N., Mohindra, P., & Desai, T. A. (2022). Biomaterials to enhance stem cell transplantation. *Cell stem cell*, 29(5), 692–721. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.04.002>
- Kim, S. J., Kim, E. M., Yamamoto, M., Park, H., & Shin, H. (2020). Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advanced healthcare materials*, e2000608. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000608n>
- Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, W., Li, G., Ma, X., Zhang, Y., Chen, S., Tiwari, S., Shi, K., Zhang, S., Fan, H.M., Zhao, Y.X., Liang, X.J. (2020). Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics*, 10(8), 3793-3815. <https://doi.org/10.7150/thno.40805>

- 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>
- Shimizu, Y., Ntege, E. H., & Sunami, H. (2022). Current regenerative medicine-based approaches for skin regeneration: A review of literature and a report on clinical applications in Japan. *Regenerative Therapy*, 21, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.05.008>
- Tocchio, A., Durmus, N. G., Sridhar, K., Mani, V., Coskun, B., El Assal, R., & Demirci, U. (2018). Magnetically Guided Self-Assembly and Coding of 3D Living Architectures. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 30(4), 10.1002/adma.201705034. <https://doi.org/10.1002/adma.201705034>
- Van de Walle,A; Perez,J.E.; Abou-Hassan,A.; Hémadi,M.; Luciani,N. and Wilhelm,C.(2020). Magnetic nanoparticles in regenerative medicine: what of their fate and impact in stem cells?,*Materials Today Nano*, Volume 11, 2020, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2020.100084>
- Vercauteren, D., Vandenbroucke, R. E., Jones, A. T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S. C., Sanders, N. N., & Braeckmans, K. (2010). The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(3), 561–569. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.281>

7. Eskerrak eta oharrak

MAGNAMED proiektu europarrari esker lana aurrera eramateko laguntza ekonomikoa jaso dugu.

Izaro Solozabalek Investigo Programaren diru-laguntza jaso du lana burutzeko (27-10-2022 eta 16-04-2023 artean) eta EHU ikertzaileak prestatzeko kontratazioa jasoko du hurrengo urteetan.