

Medio osteogénico para evaluar la diferenciación celular *in vitro* sobre andamios tisulares

Osteogenic medium to evaluate cell differentiation *in vitro* on tissue scaffolds

FLORES-CEDILLO, María Lisseth^{1*†}, OROS-MÉNDEZ, Lya Adlih¹, ROSALES-IBÁÑEZ, Raúl² y MARTIN DEL CAMPO-FIERRO, Marcela³

¹Instituto Tecnológico Superior de San Luis Potosí, Capital, Departamento de Ingeniería Industrial, Carr. 57 México -Piedras Negras Km 189+100 No. 6501, C.P. 78421, San Luis Potosí, S.L.P., México

²Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, Avenida de los Barrios N° 1, Iztacala Tlalnepantla, C.P. 54090, Estado de México, México

³Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Av. Dr. Salvador Nava No. 2, Zona Universitaria, C.P. 78290, San Luis Potosí, S.L.P.

ID 1^{er} Autor: *María Lisseth, Flores-Cedillo* / ORC ID: 0000-0002-2693-6734, Researcher ID Thomson: E-6827-2018, CVU CONACYT ID: 426793

ID 1^{er} Coautor: *Lya Adlih, Oros-Méndez* / ORC ID: 0000-0003-2432-7713, Researcher ID Thomson: S-5792-2018, CVU CONACYT ID: 251355

ID 2^{do} Coautor: *Raúl, Rosales-Ibáñez* / ORC ID: 0000-0003-0714-4421, Researcher ID Thomson: S-5910-2018, CVU CONACYT ID: 345784

ID 3^{er} Coautor: *Marcela, Martin Del Campo-Fierro* / ORC ID: 0000-0002-3028-6228, Researcher ID Thomson: S-6679-2018, CVU CONACYT ID: 302493

Recibido Enero 15, 2018; Aceptado Marzo 04, 2018

Resumen

En el área de medicina regenerativa, continuamente se buscan alternativas para la regeneración de diferentes tejidos corporales. En lo que respecta al tejido óseo se han redoblado esfuerzos debido a que los huesos pueden sufrir daños por diversas causas como infecciones agravadas, daños congénitos, accidentes y traumas. Evaluando el potencial de diferenciación de las células madre a diferentes líneas celulares, en este estudio se emplearon células madre de pulpa dental embebidas en un medio de cultivo que contiene dexametasona, ácido ascórbico y betaglicerol fosfato, sustancias conocidas por inducir la osteoinducción. Se empleó una estructura polimérica para que fungiera como soporte, sin embargo, esta estructura polimérica no posee las características mecánicas adecuadas para asemejar la resistencia de un hueso, por lo que reforzó con nanotubos de carbono que es un nanomaterial que tiene con gran resistencia mecánica. Según los resultados de los ensayos de caracterización mecánicos demostraron un incremento en el módulo elástico. Los ensayos biológicos demuestran que al ser funcionalizados los nanotubos de carbono, se eliminan sus efectos citotóxicos al observarse células vivas y en constante proliferación. El ensayo osteogénico pudo demostrar que se formaron depósitos de calcio, lo que sugiere que pueden ser empleados como andamios tisulares para regenerar óseo.

Andamios tisulares, Células madre, Osteodiferenciación, Nanotubos de Carbono, Regeneración ósea

Abstract

In the area of regenerative medicine, alternatives are continually being sought for the regeneration of different body tissues. Regarding the bone tissue, efforts have been redoubled due to the fact that the bones can suffer damages due to various causes such as aggravated infections, congenital damage, accidents and traumas. Evaluating the differentiation potential of stem cells to different cell lines, this study used dental pulp stem cells embedded in a culture medium containing dexamethasone, ascorbic acid and betaglycerol phosphate, substances known to induce osteoinduction. A polymer structure was used to act as a support, however, this polymer structure does not have the appropriate mechanical characteristics to resemble the strength of a bone, so it reinforced with carbon nanotubes which is a nanomaterial that has great mechanical resistance. According to the results of the mechanical characterization tests, they showed an increase in the elastic modulus. The biological tests show that when carbon nanotubes are functionalized, their cytotoxic effects are eliminated when living cells are observed and in constant proliferation. The osteogenic assay could demonstrate that calcium deposits formed, suggesting that they can be used as tissue scaffolds to regenerate bone.

Tissue scaffolds, Stem cells, Osteo differentiation, Carbon nanotubes, Bone regeneration

Citación: FLORES-CEDILLO, María Lisseth, OROS-MÉNDEZ, Lya Adlih, ROSALES-IBÁÑEZ, Raúl y MARTIN DEL CAMPO-FIERRO, Marcela. Medio osteogénico para evaluar la diferenciación celular *in vitro* sobre andamios tisulares. Revista de Ciencias de la Salud. 2018. 5-14: 9-13.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: maria.flores@tecsuperiorslp.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer Autor

Introducción

Se ha reportado sobre múltiples investigaciones sobre el potencial de las células madre para poder diferenciarse en células óseas gracias a tres componentes principales: dexametasona (Porter, Huckle, and Goldstein 2003), ácido ascórbico (Xing, Pourteymoor, and Mohan 2011) y beta glicerol fosfato (Langenbach and Handschel 2013; Wang, Cao, and Zhang 2017); por lo que al ser empleados en el medio de cultivo de células madre derivados de pulpa dental humana, se observó una preferencia hacia la diferenciación osteogénica gracias a los resultados de los ensayos realizados *in vitro*, al notarse la formación de depósitos cálcicos (Baykan et al. 2014).

Los materiales que se emplean en el área médica, deben ser aprobados por la *Food and Drugs Administration* (FDA), por lo que en este estudio se empleó el ácido poliláctico (PLA) que es un biomaterial biocompatible que ha demostrado múltiples aplicaciones en el área médica (Rajendran and Venugopalan 2015), los cuales debieron ser reforzados con nanotubos de carbono (NTCs) funcionalizados para que asemejen la resistencia de los huesos (Mukherjee et al. 2016).

Posteriormente, los materiales fueron caracterizados física, química y biológicamente para conocer si tendrán el potencial para ser empleados como andamios tisulares. Los NTCs fueron funcionalizados químicamente mediante oxidación ácida (Avilés et al. 2009), lo que permitió eliminar la citotoxicidad y permitir su biocompatibilidad al modificar químicamente su estructura (Vardharajula et al. 2012; Flores-Cedillo et al. 2016).

Gracias al ensayo de vida/muerte se comprobó la existencia de células vivas y con el ensayo de von Kossa (Analysis of New Bone, Cartilage, and Fibrosis Tissue in Healing Murine Allografts Using Whole Slide Imaging and a New Automated Histomorphometric Algorithm, 2016) se notó la formación de depósitos minerales como el calcio que es el principal componente de los huesos. La proliferación de las HDPSCs gracias al ensayo de alamar blue se observó que estos biomateriales presentan un ambiente favorable para que en un futuro se puedan utilizar para regenerar defectos óseos empleando biomodelos.

Descripción del método

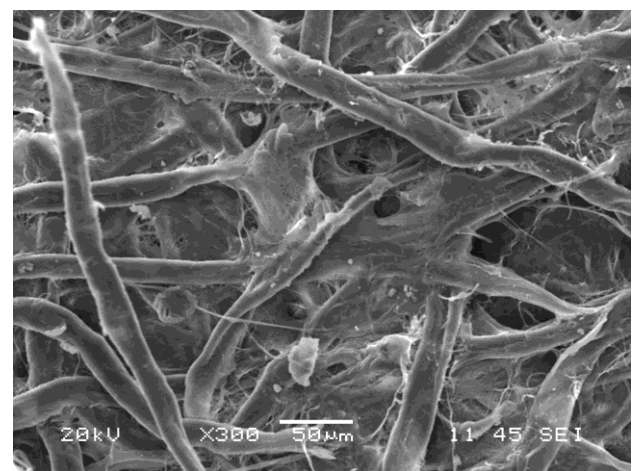
En este estudio se preparó un andamio con 2 gramos de ácido poliláctico (PLA) disueltos en 30 ml de cloroformo de grado histológico y se dispersaron con el mismo disolvente 0.3% los CNTs funcionalizados con HNO₃ y H₂SO₄ para eliminar su citotoxicidad. Posteriormente se mezcló el polímero con los CNTs y se dejaron por 120 minutos en un baño de ultrasonido para asegurar la correcta interacción molecular de ambas sustancias.

Se sembraron células madre derivadas de pulpa dental (HDPSCs, por sus siglas en inglés) y cultivadas por explante (Kawai et al. 2013) empleando un medio de cultivo enriquecido con dexametasona, ácido ascórbico y betaglicerol fosfato para favorecer la osteodiferenciación de las HDPSCs. Se realizó el ensayo microscopía electrónica de barrido (MEB) para poder visualizar la adherencia de las células en la estructura del andamio.

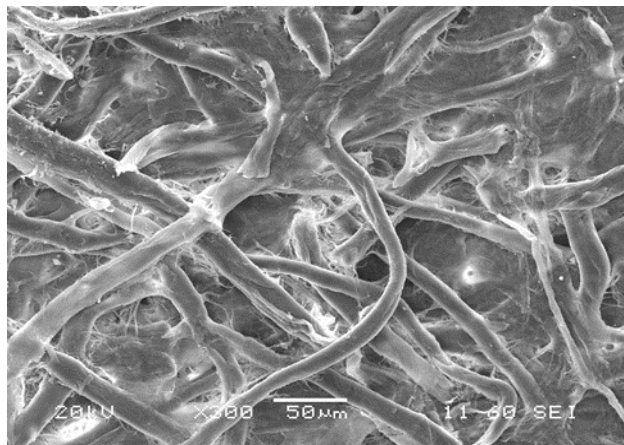
Se evaluó la viabilidad celular con el ensayo de vida/muerte y se cuantificó la proliferación celular mediante el ensayo von Kossa hasta los 21 días. El grupo control empleado es el PLA puro, contra el cual se compararon los resultados obtenidos.

Resultados y discusión

En la Figura 1 (a) se observa la microscopía del andamio de PLA donde pueden notarse algunas células entre las fibras del polímero y en 1 (b) CNTs se muestran también células adheridas a la superficie del andamio, lo que demuestra que con los CNTs y sin ellos, la superficie es favorable para las HDPSCs.



(a)



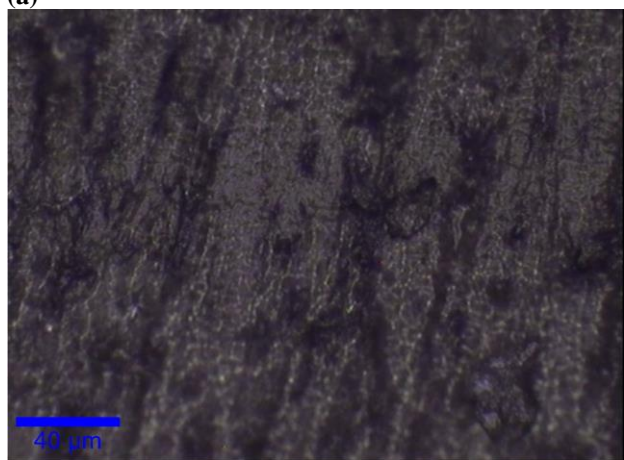
(b)

Figura 1 Micrografías en microscopio electrónico de barrido (a) PLA y (b) PLA-CNTs

En la Figura 2 (a) se observa la microscopía de fuerza atómica con el modo *tapping* del andamio de PLA donde pueden observarse una superficie de con porosidad homogénea y en la Figura 2 (b) los andamios de PLA-CNTs se muestran una distribución no homogénea de los CNTs y una reducción del tamaño de poros sobre la superficie para que permita la interacción entre las células y sus nutrientes.



(a)



(b)

Figura 2 Micrografías en microscopio de fuerza atómica de campo claro (a) PLA y (b) PLA-CNTs

En la Figura 3 se muestra el conteo de células vivas y muertas, obteniendo un porcentaje de viabilidad del 99 % en los andamios de PLA, lo que no sorprende porque se sabe que este biopolímero por sí solo está aprobado por la FDA por su biocompatibilidad, en los andamios de PLA-CNTs se obtuvo un 98 % de células vivas al día 21, lo que indica según lo que se ha reportado que un porcentaje superior al 90% indica una viabilidad óptima (Niles et al. 2007), lo cual significa que los CNTs no presentan condiciones significativas de citotoxicidad.

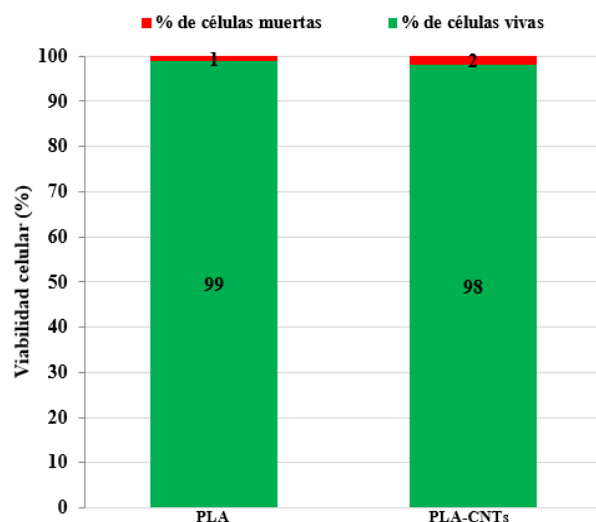


Figura 3 Gráfico de Live/Dead al día 21 para los andamios de PLA y PLA-CNTs

En la Figura 4 se presentan los resultados del ensayo de tensión de cuyo promedio se obtuvo de 20 muestras. Puede notarse que el Módulo elástico del PLA al introducir los CNTs aumenta de 808.14 a 1521.25 MPa, es decir casi una relación de 1:2 por la adición de los CNTs, lo que se buscaba para poder reforzar mecánicamente la estructura del polímero.

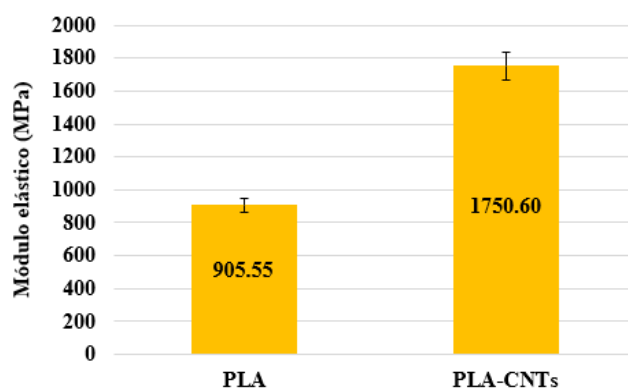
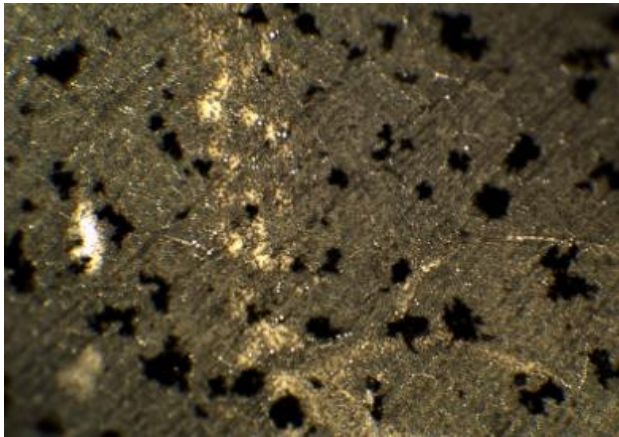
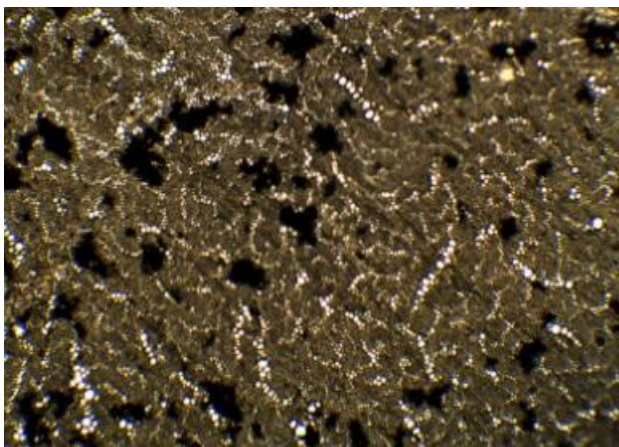


Figura 4 Resultados del ensayo de tensión de los andamios PLA y PLA-CNTs

Al realizar el ensayo histológico de von Kossa mostrado en la Figura 5 b, pueden observarse manchas de color rojizo oscuro en diversos sectores de la superficie del andamio, lo que indica la formación de depósitos de calcio, en contraste con el *scaffold* del PLA puro de la Figura 5 (a).



(a)



(b)

Figura 5 Ensayo de rojo von Kossa al día 21 para (a) PLA y (b) PLA-CNTs

Conclusiones

De acuerdo a las micrografías realizadas con el microscopio electrónico de barrido, se muestran células adheridas en la superficie de los andamios con PLA-CNTs, lo que coincide los resultados obtenidos en el ensayo de Live/Dead en los que se observa que los CNTs al ser funcionalizados elimina sus posibles efectos citotóxicos, por lo que se podrían ser empleados como andamios tisulares sugiriendo que estos andamios puedan ser empleados en la regeneración de hueso esponjoso y cortical por las características mecánicas que adquiere al reforzar el PLA con los CNTs, lo que representa un aumento en su Módulo elástico y por ser un material que soporta cargas este aspecto es fundamental.

Al confirmarse la diferenciación de las células HDPSCs en osteoblastos gracias al ensayo histológico de von Kossa, donde se observó la formación de depósitos cálcicos, puede afirmarse que el medio de cultivo adicionado con las tres sustancias osteogénicas de ácido ascórbico, dexametasona y betaglicerol fosfato favorece la osteodiferenciación (Ciapetti et al. 2012) por lo que estos andamios deberán ser probados con biomodelos para evaluar si efectivamente se acelera la formación de hueso, lo que resultaría en un material prometedor para la regeneración ósea en la Ingeniería Tisular.

Referencias

Analysis of New Bone, Cartilage, and Fibrosis Tissue in Healing Murine Allografts Using Whole Slide Imaging and a New Automated Histomorphometric Algorithm | Bone Research 2016.

<https://www.nature.com/articles/boneres201537>, accessed July 11, 2018.

Avilés, F., J. V. Cauich-Rodríguez, L. Moo-Tah, A. May-Pat, and R. Vargas-Coronado 2009 Evaluation of Mild Acid Oxidation Treatments for MWCNT Functionalization. Carbon 47(13): 2970–2975.

Baykan, Esra, Aysel Koc, Ayse Eser Elcin, and Yasar Murat Elcin 2014 Evaluation of a Biomimetic Poly(ϵ -Caprolactone)/ β -Tricalcium Phosphate Multispiral Scaffold for Bone Tissue Engineering: *In Vitro* and *in Vivo* Studies. Biointerphases 9(2): 029011.

Ciapetti, Gabriela, Donatella Granchi, Valentina Devescovi, et al. 2012 Enhancing Osteoconduction of PLLA-Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Regeneration Using Different Biomimetic Signals to MSCs. International Journal of Molecular Sciences 13(2): 2439–2458.

Flores-Cedillo, M. L., K. N. Alvarado-Estrada, A. J. Pozos-Guillén, et al. 2016 Multiwall Carbon Nanotubes/Polycaprolactone Scaffolds Seeded with Human Dental Pulp Stem Cells for Bone Tissue Regeneration. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 27(2). <http://link.springer.com/10.1007/s10856-015-5640-y>, accessed May 18, 2018.

Kawai, Gou, Takatoshi Ohno, Tomoko Kawaguchi, et al. 2013 Human Dental Pulp Facilitates Bone Regeneration in a Rat Bone Defect Model. *Bone and Tissue Regeneration Insights* 4: BTRIS10687.

Langenbach, Fabian, and Jörg Handschel 2013 Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid and β -Glycerophosphate on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells in Vitro. *Stem Cell Research & Therapy* 4(5): 117.

Mukherjee, Susmita, Samit Kumar Nandi, Biswanath Kundu, et al. 2016 Enhanced Bone Regeneration with Carbon Nanotube Reinforced Hydroxyapatite in Animal Model. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 60: 243–255.

Niles, Andrew L., Richard A. Moravec, P. Eric Hesselberth, et al. 2007 A Homogeneous Assay to Measure Live and Dead Cells in the Same Sample by Detecting Different Protease Markers. *Analytical Biochemistry* 366(2): 197–206.

Porter, Ryan M., William R. Huckle, and Aaron S. Goldstein 2003 Effect of Dexamethasone Withdrawal on Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 90(1): 13–22.

Rajendran, Tamilanbu, and Suresh Venugopalan 2015 Role of Polylactic Acid in Bone Regeneration –A Systematic Review. *J. Pharm. Sci.* 7: 7.

Vardharajula, Sandhya, Sk Z. Ali, Pooja M. Tiwari, et al. 2012 Functionalized Carbon Nanotubes: Biomedical Applications. *International Journal of Nanomedicine* 7: 5361–5374.

Wang, Chao, Xuecheng Cao, and Yongxian Zhang 2017 A Novel Bioactive Osteogenesis Scaffold Delivers Ascorbic Acid, β -Glycerophosphate, and Dexamethasone in Vivo to Promote Bone Regeneration. *Oncotarget* 8(19): 31612–31625.

Xing, Weirong, Sheila Pourteymoor, and Subburaman Mohan 2011 Ascorbic Acid Regulates Osterix Expression in Osteoblasts by Activation of Prolyl Hydroxylase and Ubiquitination-Mediated Proteosomal Degradation Pathway. *Physiological Genomics* 43(12): 749–757.