

Desarrollo Científico Chileno: Evaluación de viabilidad y proliferación celular en biomateriales de origen natural sembrados con células madre mesenquimales (MSCs).

Ubaldo Taladriz Ramírez
Universidad Adolfo Ibáñez

Resumen

La ingeniería de tejidos se cataloga como una técnica utilizada en el campo de la medicina regenerativa, la cual involucra conocimientos de distintas áreas. Una de ellas es la de biología celular, otra es la de biomateriales, y por último del área de ingeniería, siendo los pilares fundamentales en cuanto a conocimientos que sustentan su aplicación. Se pretende en los centros de investigación, el proveer de sustitutos biológicos de tejidos que puedan ser reparados, restaurados, mantenidos y mejorados. Estos pueden ser tejidos cardíacos, óseos, articulares, cartílagos, tejidos renales, hepáticos, ya sea en partes específicas u órganos completos. En este experimento que es parte de un taller del ramo de biomateriales de la universidad, se estudió la viabilidad y proliferación celular en un biomaterial de origen natural el cual es la concha de molusco, en donde será cultivado con células madre mesenquimales (MSCs).

Introducción

Dentro de la bioingeniería, la medicina de tejidos es fundamental para la regeneración de tejidos dañados, en donde un factor determinante y que se debe tener en cuenta, es la biocompatibilidad de los biomateriales.

La descripción de biocompatibilidad ha ido madurando con el transcurso de las décadas, una de las definiciones propuestas por el *Consensus Conference of Biomaterials*, la define como: “the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application” (Sousa et al., 2017) (ver **Figura 1**).

El objetivo de este experimento in vitro, es analizar fragmentos de conchas de moluscos como un biomaterial de origen natural, en donde se medirá su viabilidad y capacidad para promover la proliferación de células MSCs (Células Madres Mesenquimales)

Las células madre tienen una alta capacidad de regeneración y se clasifican respecto a su origen, estas pueden ser embrionarias, pluripotenciales inducidas y adultas (MSCs). Pueden adquirirse de diversos tejidos como las encías, médula ósea, adipocitos (grasa corporal), entre otros...

Las células también se pueden clasificar según su potencialidad, ya sean totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, teniendo la capacidad de adherirse a andamios provenientes de biomateriales y diferenciarse con un objetivo o aplicación determinada, como se definió anteriormente.

La hipótesis alternativa (H1) del experimento, es:

“Las conchas de moluscos al cultivarse con células madre mesenquimales tienen una mayor proliferación celular al de las células madre mesenquimales por sí solas”.

Siendo la hipótesis nula (H0): *“Las conchas de moluscos al cultivarse con células madre mesenquimales no tienen una mayor proliferación celular al de las células madre mesenquimales por sí solas”.*

Materiales y métodos

Para el experimento, se utilizó como metodología el ensayo de proliferación celular MTS. El ensayo de MTS se puede usar en forma de kits comerciales, tales como el “CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” (Promega). Un método colorimétrico para determinar el número de células viables para ensayos de proliferación celular y citotoxicidad en una condición determinada. El reactivo contiene un compuesto de sal de tetrazolio (MTS) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] y un reactivo transportador de electrones, PMS (phenazine methosulfate).

El MTS es reducido por las células metabólicamente activas en un producto de formazán (está biorreducción está relacionada con la producción de NAD(P)H a través de la glucólisis), el cual es soluble en medio de cultivo (Bartrop et al., 1991) (ver **Figura 2**).

Adicionalmente, la absorbancia del formazán a 490 nm puede medirse directamente en las placas de cultivo mediante un lector ELISA, sin requerir de un

procesamiento adicional (Cory et al., 1991). Así, la cantidad de producto de formazán, medida por la absorbancia de la solución a 490 nm, es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo (ver **Figura 3**).

Al añadir el reactivo de MTS combinado con PMS a los pocillos de una placa de cultivo celular (20 µl de MTS/PMS por cada 100 µl de medio de cultivo con células) se deben incubar las muestras a 37° por 1-4 h. Luego de transferir el sobrenadante a una nueva placa, se mide la absorbancia a 490 nm en un lector de placas, como el Biotek 800TS (ver **Figura 4**).

Para este experimento, se evaluará la capacidad de un biomaterial de origen natural para promover la proliferación celular en MSCs. para ello, se esterilizan fragmentos de conchas de moluscos en una solución de etanol al 70% durante toda la noche. Al siguiente día, movemos todas las muestras a un gabinete de bioseguridad dentro de una sala blanca, en donde se lavan con buffer salino estéril para remover el alcohol. A continuación, se incuban los fragmentos de conchas con el medio de cultivo completo, para que las proteínas del medio se adsorban en el biomaterial, promoviendo la adhesión celular (Persson et al., 2014). Luego de transferir los fragmentos de conchas a una placa de cultivo usando pinzas estériles, se siembran con una cantidad determinada de MSCs, manteniendo el cultivo durante 14 días, con cambios de medio regulares cada 2-3 días (ver **Figura 5**).

Para evaluar la viabilidad y proliferación celular de MSCs en contacto con conchas de moluscos, se usó una placa de 48 pocillos, evaluando la respuesta en tres tiempos: 3, 7 y 14 días, esto por 3 para obtener un promedio y tener mayor precisión con los datos. Para ello, la organización de la placa de cultivo fue la siguiente (ver **Figura 6**).

Resultados

Los resultados corresponden a valores de densidad óptica a 490 nm, medidos en un lector de placas Biotek 800TS (ver **Tabla 1**).

Se calculó el promedio de cada medición junto a su respectiva desviación estándar (ver **Tabla 2**).

También se realizó un gráfico de barras agrupado, en donde la variable independiente (eje X) es el

tiempo, y la variable dependiente (eje Y) es la densidad óptica a 490 nm (ver **Figura 7**).

Discusión y conclusión

Se puede apreciar en los resultados de la **Tabla 2** que, en los tiempos analizados, el promedio del control negativo C- (Conchas sin MSCs) permanece constante con una densidad óptica a 490 nm de 0.12, para el día 3, 7 y 14.

Por otro lado, se puede apreciar que el control positivo C+ (MSCs sin Conchas) aumenta, pero no tanto en comparación a las condiciones experimentales E3, E7 y E14 (Conchas sembradas con MSCs). Por lo que se puede concluir que existe una mayor proliferación celular en función del uso de conchas de moluscos como biomaterial para promover la viabilidad y regeneración celular.

Una técnica que permite profundizar este estudio para describir de mejor forma la morfología y adhesión celular en este biomaterial, sería el método histológico, el cual tiene 6 pasos fundamentales:

- 1) Introducción: en la cual tiene lugar la obtención del tejido.
- 2) Fijación: proceso que pretende preservar las características del tejido mediante técnicas diversas.
- 3) Inclusión: método para endurecer el tejido a fin de facilitar los cortes para el estudio por secciones.
- 4) Corte: se refiere al proceso de corte de los tejidos endurecidos, los cuales se ejecutan con la ayuda de un artefacto denominado microtomo.
- 5) Tinción: es un proceso que aumenta el contraste por medio de la coloración, ya que, a la vista del microscopio, muchos tejidos son incoloros.
- 6) Observación: se refiere al proceso de observación y análisis realizado por el especialista a través del microscopio, a partir del cual es posible arrojar conclusiones.

Un parámetro importante para analizar en un futuro es el nivel de diferenciación al que llegan estas células, ya que, lo que finalmente se busca, es lograr que las MSCs lleguen a convertirse en las células que se necesitan según su aplicación que es específica.

A modo de conclusión y respecto a lo que compete

la ingeniería de tejidos, este material cobra importancia, ya que produce la regeneración del tejido óseo a partir de células madre mesenquimales propias del paciente. Los más importante, es que permite que sean generadas fuera del cuerpo, es decir, bajo condiciones de laboratorio controladas (in vitro) formando el tejido

necesario, ya sea tanto en lo que se refiere a su función (nivel de diferenciación) como estructura del tejido óseo necesario según sea el caso. Por otro lado, este material es relativamente fácil de conseguir, algo relevante ya que esto reduce significativamente los costos y el tiempo de fabricación del tejido requerido.

Bibliografía

1. Barltrop, J. A., Owen, T. C., Cory, A. H., & Cory, J. G. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indica. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 1(11), 611–614. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)81162-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)81162-8)
2. Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications*, 3(7), 207–212. Hu, L., Yin, C., Zhao, F., Ali, A., Ma, J., & Qian, A. (2018). Mesenchymal stem cells: Cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020360>
3. Noh, S., Myung, N., Park, M., Kim, S., Zhang, S.-U., & Kang, H.-W. (2018). 3D Bioprinting for Tissue Engineering. In B. W. Kim (Ed.), *Clinical Regenerative Medicine in Urology* (pp. 105–123). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2723-9_5
4. Persson, M., Lorite, G. S., Kokkonen, H. E., Cho, S. W., Lehenkari, P. P., Skrifvars, M., & Tuukkanen, J. (2014). Effect of bioactive extruded PLA/HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.029>
5. Tanzi, M. C., & Farè, S. (2017). *Characterization of Polymeric Biomaterials*. Woodhead Publishing.
6. Sousa, A., Neves, S. C., Gonçalves, I. C., & Barrias, C. C. (2017). In vitro interaction of polymeric biomaterials with cells. In *Characterization of Polymeric Biomaterials* (pp. 285–315). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00012-1>
7. Shang, F., Yu, Y., Liu, S., Ming, L., Zhang, Y., Zhou, Z., ... & Jin, Y. (2020). Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioactive materials*, 6(3), 666–683.
8. García, A., Patiño, L., & Rueda, G. (2014). Medición de la citotoxicidad y producción de citocinas en fibroblastos gingivales humanos estimulados con Mercurius-Heel®S: Un estudio piloto. *Universitas Scientiarum*, 19(3), 225–232. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-3.mcpc>
9. Mata-Miranda, Maribel, Vázquez-Zapién, Gustavo J, & Sánchez-Monroy, Virginia. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*, 27(3), 194–199. Recuperado en 05 de noviembre de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000300009&lng=es&tlng=es.

Figuras y Tablas

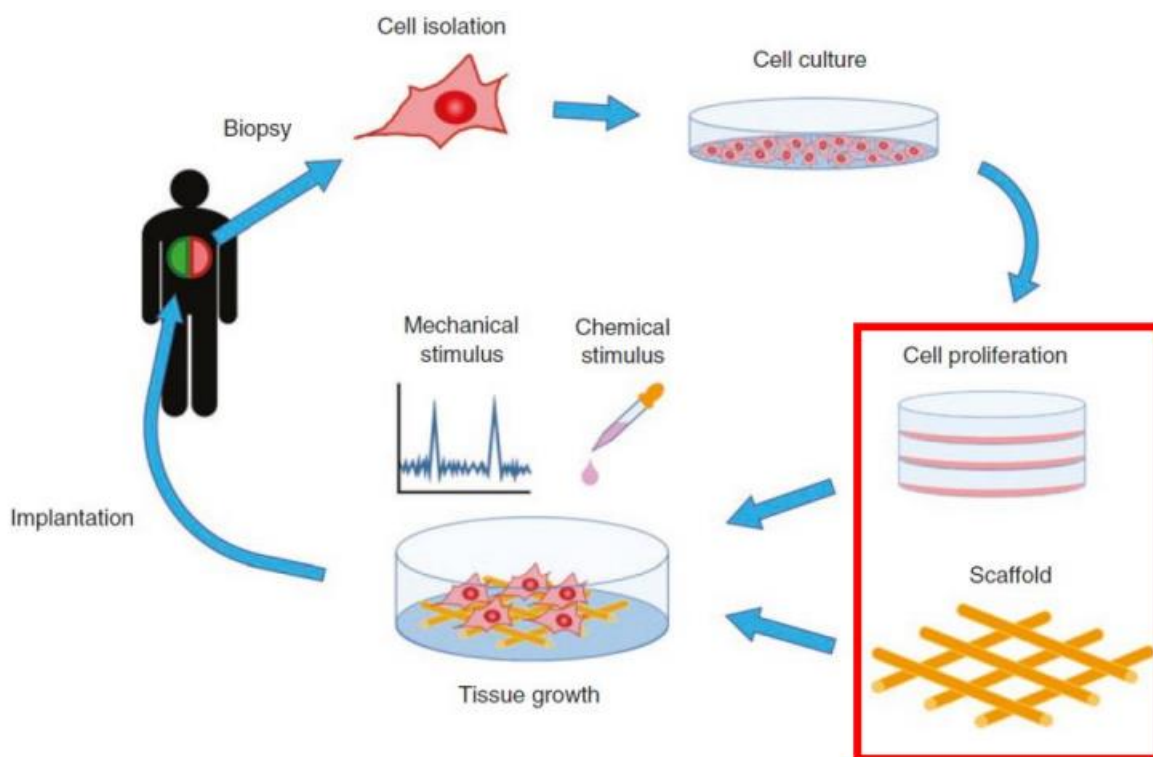


Figura 1. El concepto de la ingeniería de tejidos. El recuadro rojo muestra el paso de combinación de células con biomateriales o andamios fabricados a partir de ellos. Modificado de (Noh et al., 2018).

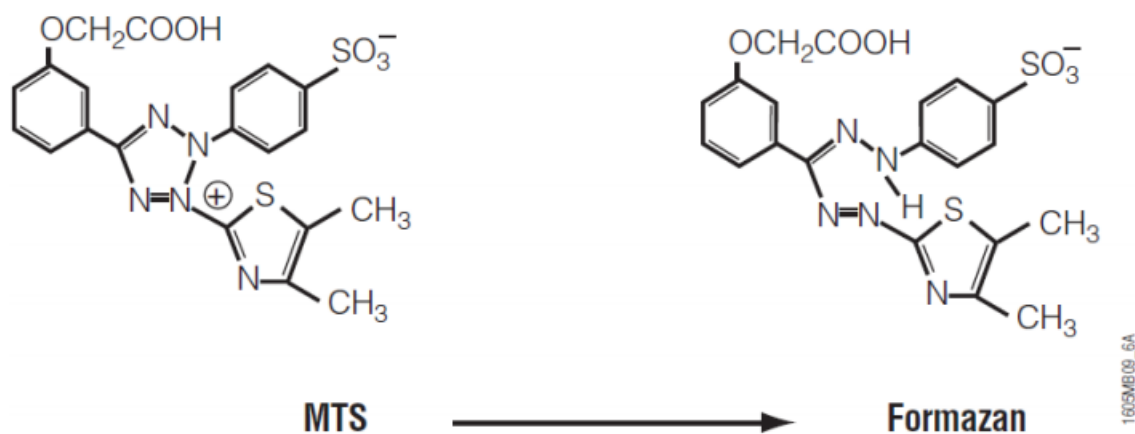


Figura 2: Estructura molecular de la sal de tetrazolio MTS y su producto de formazán. (Promega Technical Bulletin, revised 12/12).

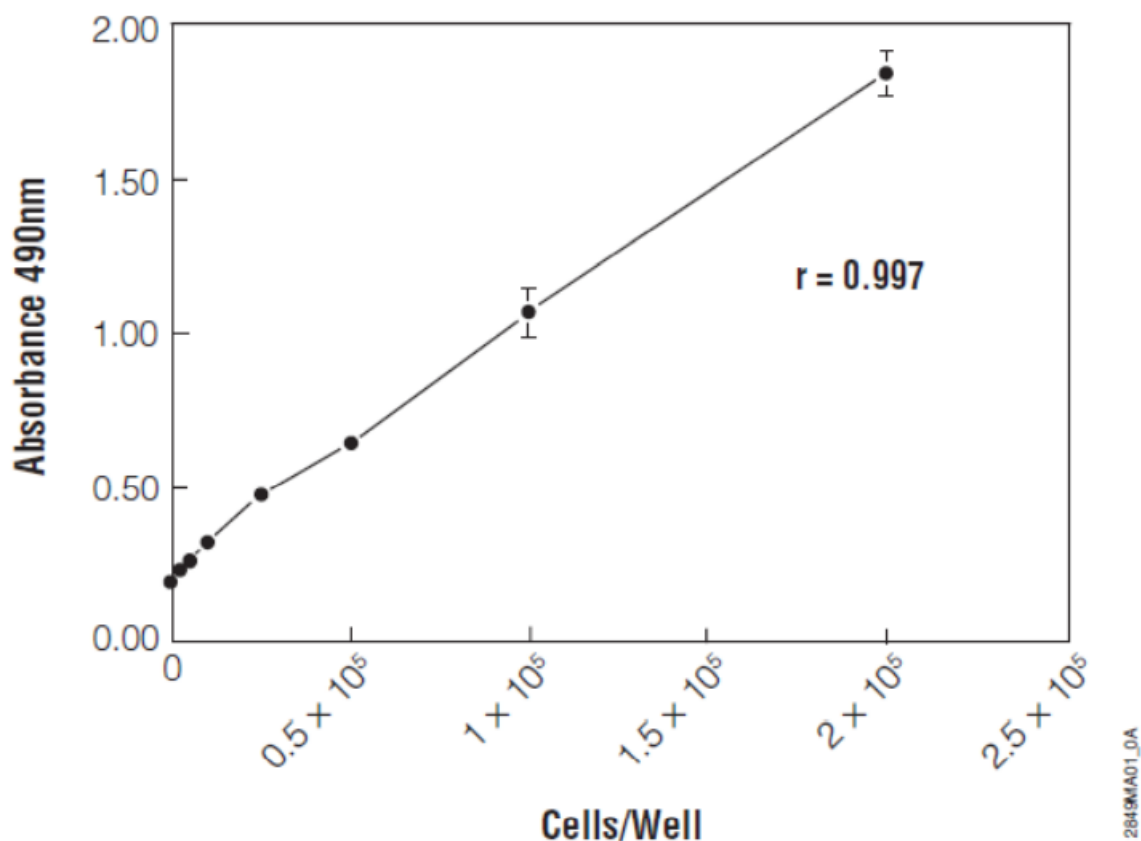


Figura 3: Efecto del número de células sobre la absorbancia a 490 nm utilizando el kit “CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay”. (Promega Technical Bulletin, revised 12/12).

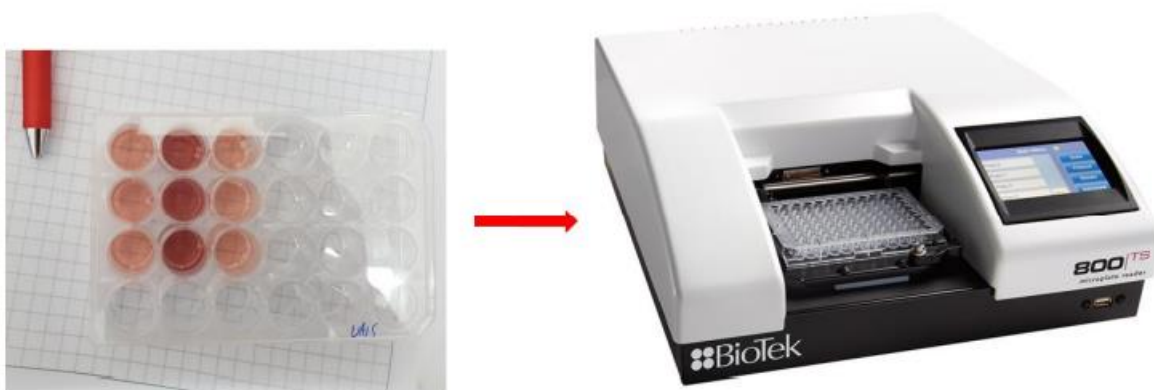


Figura 4: Placa de cultivo celular representativa luego de realizada la reacción de MTS y lector de placas Biotek 800TS. (Fotografía de Raúl Vallejos, foto de equipo desde catálogo web).

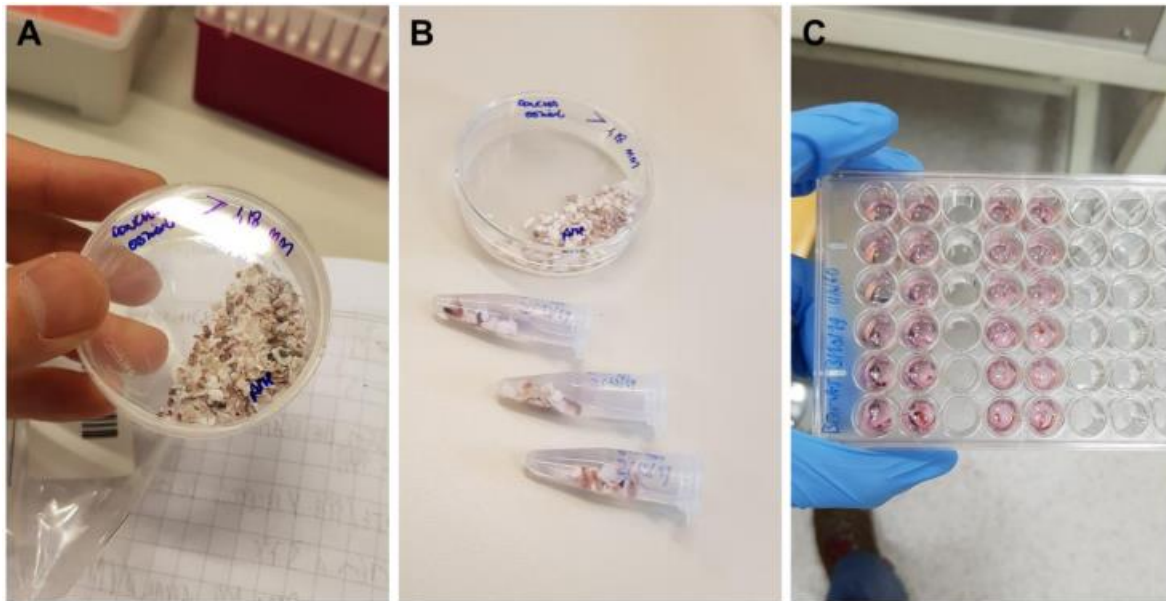


Figura 5: Preparación de muestras y siembra para cultivo celular. (A) Biomaterial granulado proveniente de conchas de moluscos. (B) Incubación de muestras en etanol al 70% para esterilizarlas. (C) Placa de cultivo representativa con conchas sembradas con MSCs en medio de cultivo. (Fotografías de Raúl Vallejos).

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	C-	C+	E3	C-	C+	E7		
B	C-	C+	E3	C-	C+	E7		
C	C-	C+	E3	C-	C+	E7		
D	C-	C+	E14					
E	C-	C+	E14					
F	C-	C+	E14					

Figura 6: Organización de placa de cultivo para experimento de viabilidad y proliferación celular con MTS. Ver leyenda:

- C- = Control negativo (Conchas sin MSCs).
- C+ = Control positivo (MSCs sin conchas).
- E3 = Condición experimental al día 3 (conchas sembradas con MSCs).
- E7 = Condición experimental al día 7 (conchas sembradas con MSCs).
- E14 = Condición experimental al día 14 (conchas sembradas con MSCs).

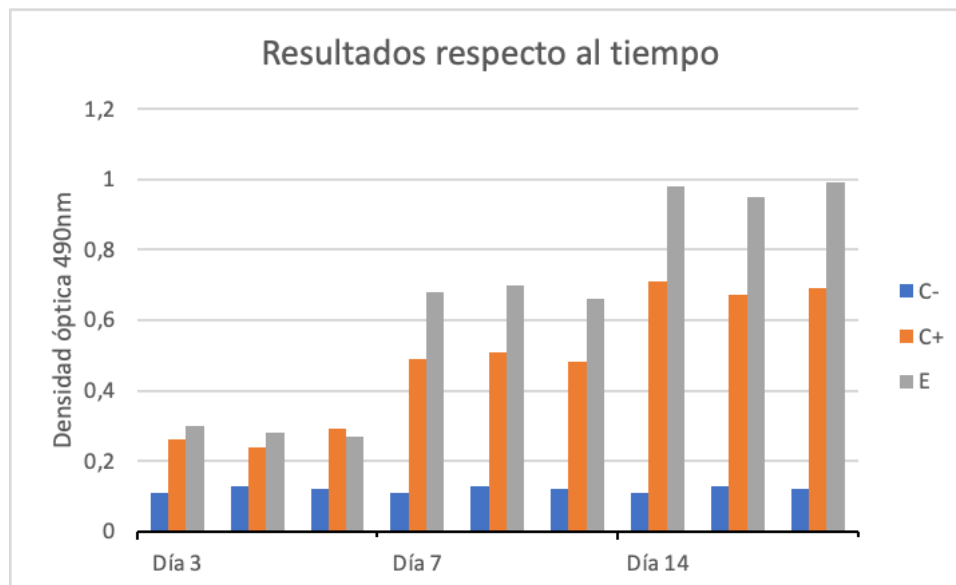


Figura 7: Gráfico de barras agrupado, en donde la variable independiente (eje X) es el tiempo, y la variable dependiente (eje Y) es la densidad óptica a 490 nm.

Tabla 1: Resultados obtenidos.

Día 3			Día 7			Día 14		
C-	C+	E	C-	C+	E	C-	C+	E
0,11	0,26	0,3	0,11	0,49	0,68	0,11	0,71	0,98
0,13	0,24	0,28	0,13	0,51	0,7	0,13	0,67	0,95
0,12	0,29	0,27	0,12	0,48	0,66	0,12	0,69	0,99

Legenda:

C- = Control negativo (Conchas sin MSCs)

C+ = Control positivo (MSCs sin conchas)

E = Condición experimental (MSCs con conchas)

Resultados corresponden a valores de densidad óptica a 490 nm, medidos en un lector de placas Biotek 800TS

Tabla 2: Promedio de cada medición junto a la desviación estándar.

	C-	Promedio C-	Desviacion estandar C-	C+	Promedio C+	Desviacion estandar C+	E	Promedio E	Desviacion estandar E
Día 3	0,110	0,120	0,010	0,260	0,263	0,025	0,300	0,283	0,015
	0,130			0,240			0,280		
	0,120			0,290			0,270		
Día 7	0,110	0,120	0,010	0,490	0,493	0,015	0,680	0,680	0,020
	0,130			0,510			0,700		
	0,120			0,480			0,660		
Día 14	0,110	0,120	0,010	0,710	0,690	0,020	0,980	0,973	0,021
	0,130			0,670			0,950		
	0,120			0,690			0,990		