

Caracterización del hueso homólogo acelular como andamio para ingeniería tisular

Dr. Cristián A Erazo Cortés,* Dr. Fernando Molina Montalva*

RESUMEN

La regeneración de tejido mediante ingeniería tisular requiere de andamios para que las células obtenidas en condiciones de laboratorio reproduzcan la estructura tridimensional del tejido *in vivo*, restaurando forma y función. El presente trabajo pretende caracterizar biológicamente un nuevo andamio para la ingeniería tisular ósea correspondiente al hueso homólogo, al cual se le despoja de sus células y proteínas de la matriz extracelular mediante calor húmedo. Para comprobar la acelularidad efectiva de este andamio se diseñó un estudio experimental en seis conejos Nueva Zelanda adultos, a los cuales se les tomaron dos muestras de hueso trabecular de cresta iliaca, una de las cuales fue expuesta a calor húmedo, según nuestro protocolo. Se realizaron cultivos celulares de ambas muestras que se siguieron por seis semanas, siendo negativos en la totalidad de las muestras sometidas a calor húmedo, con lo que se comprueba la acelularidad de nuestro andamio biológico. Por otra parte, en nuestro andamio existiría una pequeña cantidad de colágena residual identificable por electroforesis de proteínas.

Palabras clave: Hueso acelular, andamio, ingeniería tisular.

SUMMARY

Tissue regeneration by tissue engineering requires scaffolds for culture cells to reproduce the in vivo three dimensional arrays restoring form and function. This work aims to characterize the acellular homologous bone as a new biological scaffold for bone tissue engineering. The homologous bone is stripped from its cells and proteins by humid steam, leaving the mineral matrix. To prove that no viable cell is left in the scaffold we designed an experimental study in six New Zealand adult rabbits. Two samples of trabecular iliac crest bone were taken and one of them was exposed to humid steam according to our protocol. Cellular cultures from both samples were followed for six weeks. No cellular growth at six weeks was observed in the humid steam group compared to the full cellular growth in the control group since week one. We prove that homologous bone treated by humid steam according to our protocol is acellular. On the other hand, there seems to be small quantities of residual collagen, identified by protein electrophoresis in our scaffold.

Key words: Acellular bone, scaffold, tissue engineering.

INTRODUCCIÓN

La reparación y regeneración efectiva de tejidos dañados y órganos depende del rápido reestablecimiento del flujo sanguíneo necesario para la migración celular y el soporte metabólico. Los biomateriales implantables diseñados para reemplazar el tejido dañado o enfermo deben actuar como un soporte (a modo de andamio) a través del cual las células puedan migrar y establecer-

se, restaurando forma y función. Un andamio ideal debe ser: (1) biocompatible en estructura y forma degradada; (2) presentar propiedades mecánicas adecuadas; (3) ser poroso y permeable; (4) poseer una superficie adecuada estructural y químicamente para dar sostén y fijación a las células, y (5) debe tener interconexión entre sus canales para la adecuada penetración de éstas.¹

Una opción para lograr un andamio ideal es usar polímeros sintéticos biocompatibles. Los andamios

* División de Cirugía Plástica y Reconstructiva. Hospital General «Dr. Manuel Gea González».

sintéticos son resistentes y algunos se fabrican para ser degradados luego de la implantación a una velocidad determinada. También se pueden diseñar para simular las características materiales del tejido a reemplazar y pueden moldearse a voluntad.² Su principal desventaja radica en el costo. Son ejemplos de estos materiales sintéticos los polímeros como el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y la policaprolactona (CPL). También se usan materiales cerámicos como andamios sintéticos, dentro de los que se encuentran los bioinertes (aluminio y zirconio), los de superficie bioactiva (hidroxiapatita y vidrio bioactivo) y los bioabsorbibles (BiCaP, TriCaP y OctaCaP).

Otra opción, tal vez más adecuada para nuestro medio, es usar andamios biológicos que se obtienen de distintos órganos y organismos, los que se someten a mínimos procesos para conservar al máximo sus características, removiendo sus células nativas para ser implantados en forma acelular. Son ejemplos de andamios biológicos la mucosa de intestino delgado, la dermis acelular, la matriz acelular de vejiga, la fascia cadavérica y las membranas amnióticas.³ El hueso acelular no ha sido descrito en la literatura como andamio biológico; sin embargo, los materiales sintéticos utilizados para fabricar andamios en ingeniería tisular ósea están compuestos de derivados de fosfato de calcio, principal componente mineral del hueso. Los más efectivos en cuanto a proliferación celular son los que se asemejan estructuralmente a éste, simulando su grado de porosidad.^{4,5}

En un estudio realizado en nuestra división,⁶ se utilizó hueso acelular homólogo de conejo como andamio para ingeniería tisular ósea, con el fin de rellenar defectos en hueso craneal, con excelentes resultados. Para obtener este hueso eventualmente acelular se utilizó calor húmedo a 121 °C por 15 minutos. El andamio resultó tan efectivo que, incluso, luego de ser poblado por osteoblastos diferenciados a partir de células madre y cultivados *in vitro*, se logró reproducir por completo la estructura trilaminar del hueso de cráneo, situación no descrita aún en la literatura.

El objetivo de este trabajo fue determinar la acelaridad efectiva del hueso esponjoso esterilizado por calor húmedo y caracterizar biológicamente al hueso homólogo acelular esterilizado por calor húmedo con respecto a proteínas residuales de la matriz.

MATERIAL Y MÉTODO

Se diseñó un estudio experimental en conejos Nueva Zelanda adultos. El número de muestras controles y casos fue de seis para cada grupo calculado, con un nivel alfa de 0.05 y potencia de la prueba de 0.8.

A continuación se detalla la metodología utilizada en cada etapa de la investigación:

1. Toma de injerto óseo: bajo técnica estéril, anestesia general con hidrocloreto de xilacina a una dosis de 5 mg/kg, clorhidrato de ketamina a una dosis de 20 mg/kg y profilaxis con cefalotina 40 mg/kg por siete días; se tomó una muestra de 4 mL (a) y otra de 1 mL (b) de tejido óseo trabecular de cresta iliaca de conejo Nueva Zelanda adulto previamente rotulado. Cada conejo se suturó y cuidó durante el postoperatorio con analgesia basada en meglumina de flunixinil 1.1 mg/kg IM cada 24 horas, por tres días y se les proporcionó alimento (*Laboratory Rabbit Diet*, 5321 PMI) y agua a libre acceso, ya que se iban a utilizar en una etapa posterior de la investigación. Las muestras se rotularon de acuerdo con el conejo del cual provenían y después una de ellas (a) se envió a protocolo de esterilización con calor húmedo. La otra (b) se almacenó en *buffer* salino de fosfatos (PBS) estéril frío y se envió como control a cultivo celular.
2. Esterilización por calor húmedo: la muestra (a) de cada conejo se sometió a un ciclo de esterilización por calor húmedo a 121 °C por 15 minutos. Finalizado el ciclo de esterilización y bajo técnica estéril, se tomaron 0.5 mL de cada una de las muestras y se procesaron para electroforesis de proteínas. Se enviaron 0.5 mL al proceso de cultivo celular y 1 mL se guardó para ser usado como homoinjerto óseo en la segunda fase de la investigación.
3. Cultivos celulares: bajo técnica estéril y campana de flujo laminar, cada muestra de 0.5 mL derivadas del proceso de esterilización y 0.5 mL de cada una de las muestras control (no esterilizadas), fue puesta en *buffer* fosfato frío estéril (BFE), homogenizada a fragmentos de 1 mm aproximadamente y lavada abundante y repetidamente con BFE. A continuación se incubó el homogenizado en una solución (2 mg/mL BFE) con collagenasa (tipo II, sigma St. Louis, Mo, EUA) a 37 °C por dos horas a baño María. Después se lavó con un medio al 10% de suero fetal bovino (SFB) y se puso en frascos de 25 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en proporción de 10 a 15 mg por cm² de superficie. Los fragmentos óseos se cultivaron en medio DMEM (Gibco), suplementados con 100 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de sulfato de estreptomina, 50 µg/mL de gentamicina, 1.25 µg/mL de fungizona, 100 µg/mL de ascorbato y 10% de SBF. El medio de cultivo se cambió si era necesario durante seis semanas. El monitoreo de los

cultivos se hizo por seis semanas mediante microscopia invertida de contraste de fases, constatando el crecimiento celular, número de células y tipo.

4. Determinación de proteínas en la matriz ósea: la presencia de factores de crecimiento óseo (BMP, VGF) residuales y proteínas estructurales no desnaturalizadas después del proceso de esterilización, se determinó mediante desmineralización, lisis y ulterior electroforesis de proteínas. El hueso después de esterilizado se sometió a tratamiento con ácido nítrico al 8% durante 30 minutos para desmineralizarlo. El resto proteínico se lisó con un detergente suave (Tritón 40) y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 12% en condiciones reductoras. El gel se tiñó con azul de Coomassie y con plata; en caso de que se observaran bandas de alguna proteína se confirmó su identidad por Western Blot con anticuerpos comerciales.
5. Análisis estadístico: el análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS 8.0, usando la prueba χ^2 para variables en escala nominal.

Todos los procedimientos se hicieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Séptimo: De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Cap. único. Art. 121-126.

El manejo y procedimiento experimental al que fueron sometidos los animales se realizó conforme a la NOM-062-200-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, D.D.F. 22-VIII-2001.

Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de nuestro hospital.

RESULTADOS

Se operaron seis conejos Nueva Zelanda adultos, a cada uno de los cuales se le extrajo una muestra de hueso trabecular de cresta iliaca por acceso posterior (*Figura 1*). No hubo morbilidad ni mortalidad perioperatoria atribuible al procedimiento quirúrgico y la totalidad de los conejos se recuperaron favorablemente.

Se procesaron un total de 12 muestras para cultivo celular, seis controles y seis tratadas según el protocolo de esterilización abreviada. Desde la primera hasta la sexta semana se observó desarrollo y proliferación celular en todos los cultivos correspondientes a las muestras controles, en las que el grupo celular predominante fue de osteoblastos (*Figura 2*), identificados



Figura 1. Acceso posterior para obtener hueso trabecular de cresta iliaca de conejo.

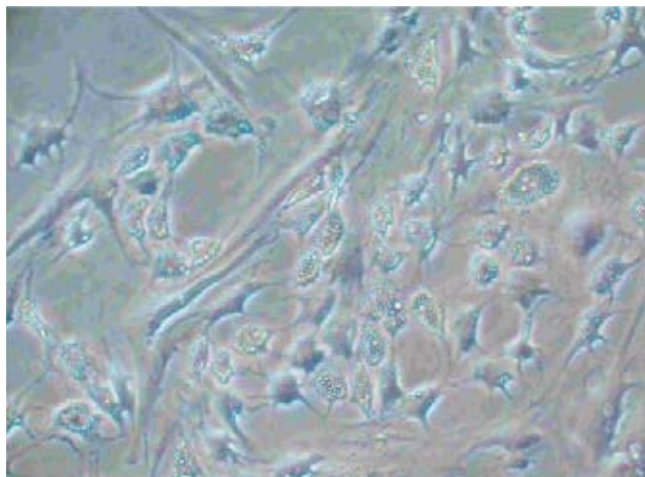


Figura 2. Cultivos controles positivos principalmente para osteoblastos.

por morfología, prueba de fosfatasa alcalina positiva y crecimiento en medio diferenciado para osteoblastos. Por el contrario, todos los cultivos de hueso esterilizado por calor húmedo fueron negativos desde la primera a la sexta semana (*Figura 3*).

Se realizó electroforesis de proteínas a tres muestras sometidas al protocolo de esterilización. Los resultados concuerdan con lo que se aprecia en la *figura 4*. La tinción del gel con azul de Coomassie muestra ausencia de proteínas viables en las columnas correspondientes a extracto proteico prerrecalcificación, extracto descalcificado y medio de descalcificación. La columna de la derecha es el control y corresponde a colágena de origen comercial, mostrando una banda a nivel de los 150 KD (cadena pesada) y dos bandas

a nivel de los 75 KD (cadena ligera). Por otra parte, la tinción de los geles con plata muestra en todas las columnas tres bandas tenues análogas a la colágena de origen comercial.

DISCUSIÓN

El homoinjerto óseo se ha utilizado en seres humanos por más de 120 años. En 1950 se creó el primer banco de tejidos para uso médico, correspondiente al Banco de Tejidos de la Marina en Bethesda, institución que hasta la fecha rige las normas para la conservación de tejidos para uso médico.⁷ Desde 1980 existe un me-

jor control biológico de los tejidos preservados, por el riesgo de transmitir infecciones virales como VIH, VHB, VHC, etcétera. En 1984 se reportó el primer caso de transmisión de VIH y en 1992, el segundo y último caso de esta infección que ocurrió en 1985. A la fecha se han realizado más de 1 millón de homoinjertos óseos de Banco en EUA, sin reportes de transmisión de VIH o virus de hepatitis. En general, en todos los bancos de tejidos del mundo se conserva hueso desmineralizado (el opuesto a nuestro hueso mineral acelular), ya que para ser utilizado como injerto se requiere que conserve tanto sus cualidades osteoinductoras como osteoconductoras, las que están determinadas por las proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo BPM, VGF, colágena, etcétera). De este modo se estimula la ocupación de la matriz por células del huésped que migran desde la periferia del defecto. El hueso desmineralizado de banco, ampliamente usado en ortopedia, se esteriliza por criopreservación a -80 °C, con o sin métodos accesorios. A esta temperatura se produce lisis celular por cristalización de las membranas plasmáticas de las células eucarióticas y procarióticas; de este modo, se elimina su contenido celular manteniendo sus propiedades de osteoinducción y osteoconducción, por no existir desnaturalización proteica. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que es posible extraer células viables de esta matriz criopreservada,⁸ lo que representa una posibilidad cierta de desencadenar una respuesta inmune en el huésped que termine en rechazo del injerto. Los resultados de nuestra investigación nos permiten comprobar que la utilización de calor húmedo a 121 °C por 15 minutos es efectivo al eliminar las células



Figura 3. Cultivos negativos de muestras esterilizadas por calor húmedo. Se aprecian restos de la matriz mineral y ausencia de células.

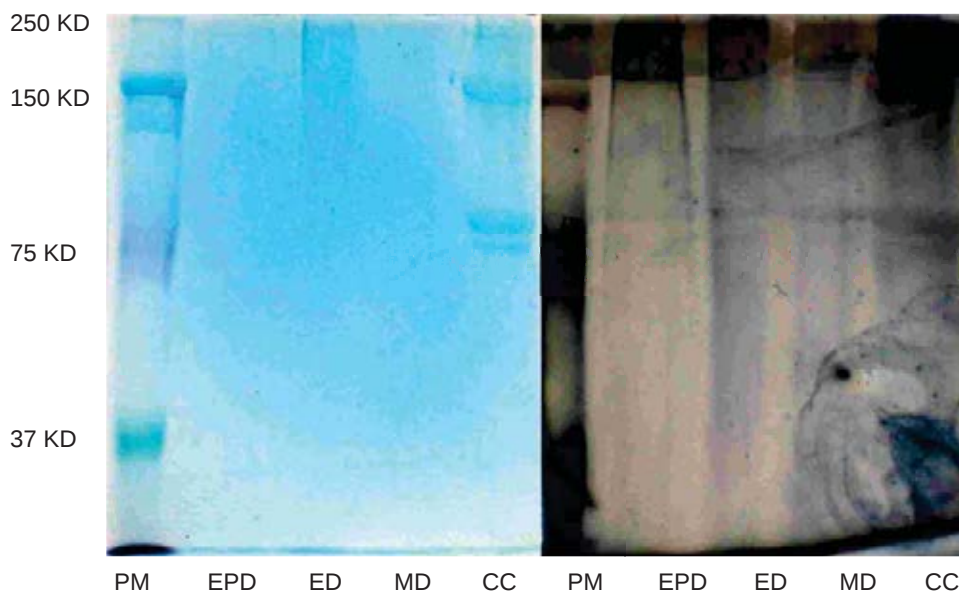


Figura 4.

Electroforesis de proteínas. Gel izquierdo teñido con azul de Coomassie. Gel derecho teñido con plata. Columnas: PM (peso molecular), EPD (extracto pre descalcificación), ED (extracto descalcificado), MD (medio de descalcificación), CC (colágena comercial).

del donante, como lo demostramos con un 100% de cultivos negativos hasta por seis semanas al utilizar este método, contra un 100% de cultivos positivos durante el mismo periodo de tiempo para los controles. Comprobamos de este modo la acelularidad del hueso homólogo trabecular de conejo sometido a nuestro tratamiento térmico, por lo que podemos llamarlo hueso homólogo acelular (HHA) como tal. Al eliminar el contenido celular en el proceso de obtención del HHA desaparece la posibilidad de rechazo por el mecanismo previamente mencionado y se obtiene un nivel de bioseguridad adecuado para ser utilizado en otros individuos de la misma especie.

El HHA ya lo ha utilizado nuestro grupo de trabajo como andamio para osteoblastos cultivados a partir de células madre de médula ósea. Como resultado del proceso térmico para la obtención de HHA se pierden sus propiedades osteo-inductivas, ya que junto con la pérdida de sus células, comprobada efectivamente en este estudio, está descrito que se produce la desnaturalización de las proteínas de la matriz,⁹ quedando aparentemente sólo la estructura mineral. Podemos afirmar, sin embargo, que el HHA conserva sus propiedades osteoconductoras, ya que en nuestro estudio previo fue capaz de ser poblado de manera fisiológica por nuevos osteoblastos cultivados *in vitro*, los cuales sintetizaron una nueva matriz proteica y mineral *in vivo*, reestableciendo la función y estructura del tejido reparado. Un trabajo reciente,¹⁰ que utilizó una metodología similar a la nuestra en cuanto a la obtención y diferenciación de osteoblastos a partir de médula ósea autóloga, usó hidroxiapatita (cerámico de PCa) como andamio osteoconductor, logrando poblar el andamio, pero una estructura tridimensional más rudimentaria que la nuestra a largo plazo. Por último, cabe destacar que el hueso trabecular sometido a tratamiento térmico conserva sus características biomecánicas por un periodo inicial de hasta ocho semanas y luego es degradado por el huésped a sustancias biocompatibles,¹¹ situación que sumada a las características ya descritas transforman al hueso homólogo acelular obtenido por nuestro procedimiento en un andamio con características ideales para ingeniería tisular ósea y de bajo costo, lo que lo hace adecuado para nuestro medio.

CONCLUSIONES

El hueso homólogo de conejo sometido a esterilización por calor húmedo es efectivamente acelular. Hasta la fecha existe una tendencia a encontrar colágena como única proteína identificable en pequeñas cantidades luego del proceso de esterilización por calor húmedo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001; 7: 679-689.
2. Dhariwala B, Hunt E, Boland T. Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography. *Tissue Eng* 2004; 10:1316-1322.
3. Hodde J. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue Eng* 2002; 8: 295-308.
4. Grimm MJ, Williams JL. Measurements of permeability in human calcaneal trabecular bone. *J Biomech* 1997; 30: 743-745.
5. Li S, De Wijn JR, Li J, Layrolle P, De Groot K. Macroporous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio. *Tissue Eng* 2003; 9: 535-548.
6. León D. Bioingeniería ósea en defectos craneales en el modelo animal: un estudio experimental. Presentado en el XXIV Concurso Nacional de Residentes "Dr. Fernando Ortiz-Monasterio". Veracruz, México, 2005.
7. Kostiac PE. The evolution of quality systems in human bone banking: The U.S. experience. *Cell Tissue Bank* 2000; 1: 155-160.
8. Heyligers I, Klein-Nulend J. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 25-31.
9. Shimizu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shin S. Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999; 119: 57-61.
10. Malarda O, Guicheux J, Boulera J et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005; 36: 323-330.
11. Shin S, Yano H, Fukunaga T et al. Biomechanical properties of heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005; 125: 1-5.

Dirección para correspondencia:

Dr. Cristián A. Erazo Cortés
Calzada de Tlalpan 4800 4to Piso,
Col. Sección Dieciséis,
14080, México, D. F.
Teléfono: 55-4000-3000 Ext. 3142.
E-mail: crerazo@vtr.net
crerazo@hotmail.com