

Citotoxicidad de Nukbone®
Resumen

Responsables: M. en C. Ma. Angeles Aguilar Santamaría
Profesor Titular C
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Departamento de Ciencias de la Salud

Dra. Ma. Cristina Piña Barba
Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

Colaboradores: P. de Biol. Exp. Fabiola Martínez
Biól. Exp. Karla Berenice Dávalos de la Cruz
Biól. Marina Hurtado Maldonado

Enero, 2007

PRUEBA DE CITOTOXICIDAD DE Nukbone®

Antecedentes. Nukbone® es un material de implante xenogénico (xenoimplante, trasplante de tejido de otra especie) que se elabora con matriz ósea de hueso de bovino la cual está constituida por cristales nanométricos de hidroxiapatita (HA) depositados sobre colágena tipo I, composición que es igual en todos los mamíferos. Nukbone ha sido caracterizado y cumple con todos los elementos para ser empleado como material de xenoimplante pero se requiere demostrar plenamente su biocompatibilidad, es decir, su capacidad de establecer una relación armónica con el tejido del organismo donde se insertará para contribuir a su restauración o fortalecimiento (1).

Para realizar los ensayos de biocompatibilidad, la *American Standard for Testing Materials (ASTM)* recomienda el empleo del cultivo en monocapa de líneas celulares y el registro de la deformación y desprendimiento de las células como marcadores de daño en esos sistemas. No obstante, estos parámetros no consideran la posibilidad de que una fracción de la población celular pueda sobrevivir a la exposición de un material o agente particular, a menos que sea extremadamente tóxico o letal. Por ello es recomendable realizar también ensayos que permitan determinar si las células sobrevivientes son portadoras de alguna modificación no letal que afecte la estabilidad del sistema biológico (2).

Uno de los primeros parámetros que debe ser evaluado en una prueba de toxicidad es la capacidad de proliferación de las células y esto puede llevarse a cabo mediante el índice mitótico, es decir, a través de la proporción de células en división. Se basa en el ciclo celular y los puntos de control del mismo que regulan la progresión del ciclo o dirigen a la célula al proceso de apoptosis (3). El índice mitótico es un biomarcador muy útil porque además de mostrar la viabilidad de las células indica si conservan la capacidad para proliferar; por ello es que ha sido ampliamente utilizado para detectar efectos de agentes químicos y físicos tanto *in vitro* como *in vivo* (4-5).

Entre los modelos experimentales más empleados en pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad, destaca el cultivo primario de linfocitos de sangre periférica humana por su fácil manejo, su capacidad de conservar sus características fisiológicas bajo las condiciones del cultivo, la posibilidad de detectar diversos marcadores y de obtener resultados en un plazo relativamente corto (6).

Considerando que Nukbone pretende ser una respuesta de calidad y económicamente accesible a la gran necesidad que existe en México de materiales para esos defectos óseos, se llevó a cabo el presente proyecto de investigación cuyo objetivo fue determinar la citotoxicidad del hueso anorgánico Nukbone en cultivos de linfocitos humanos.

Material y método.

Cultivo de linfocitos. Se tomaron muestras de sangre de 10 donadores adultos (6 hombres y 4 mujeres) con edad promedio de 28 años. Los criterios de inclusión fueron:

- Que los donadores estuvieran sanos al momento de tomar las muestras.
- Que no hubieran tomado medicamento al menos 1 semana antes de la donación.
- Que no tuvieran hábitos de tabaquismo, alcoholismo u otra adicción de este tipo.

De cada donador se prepararon 6 cultivos. Se colocaron 0.4 ml de sangre completa en cada tubo estéril de cultivo (NUNC) 2.5 ml de medio de cultivo Mc Coy 5a (Microlab) añadido con Fitohemaglutinina, agente mitogénico, al 4 % (Microlab) y solución antibiótica al 0.4 % (In vitro). Los cultivos se incubaron a 37° C durante 72 h.

Preparación de Nukbone. El material en forma de cubos de 2 mm por lado fue preparado en Biocriss.

Exposición a Nukbone Transcurridas las primeras 24 h de incubación a 37° C, de cada muestra sanguínea se formaron 2 lotes de tres cultivos cada uno: al primero se le añadieron 4 cubos de Nukbone (lote experimental) y al otro no se le expuso a ningún material (lote testigo). Se reincubaron a 37° C por 48 h más.

Citotoxicidad: Índice mitótico. Una hora antes de iniciar la cosecha se añadieron 0.06 ml de Colcemid (Microlab) a cada tubo de cultivo. Las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos; se les aplicó un tratamiento hipotónico (KCl 0.4 %; J. T. Baker) durante 20 minutos y se fijaron

con solución Carnoy (ácido acético:metanol, 3:1; J. T. Baker). Las preparaciones se hicieron dejando caer gotas de la suspensión celular sobre portaobjetos desengrasados y fríos, se secaron al aire y se tiñeron con colorante de Giemsa (Merck) al 10 %. Se obtuvieron 2 preparaciones por cultivo y en cada una de ellas se registró la proporción de mitosis de un total de 1000 células (6,000 células por lote por donador). La revisión de estas preparaciones se realizó aplicando el método del doble ciego.

Análisis estadístico. Para cada una de las variables (testigo y experimental) se analizó la normalidad (Prueba de Shapiro) y la homoscedasticidad (Prueba de Levene) y, en función de éstas se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) paramétrico (de una vía) o no paramétricas (Kruskal – Wallis) para las diferentes comparaciones. Todos los análisis se efectuaron con el paquete estadístico STATA (8).

Resultados y Discusión.

Tanto en los cultivos expuestos a Nukbone como en los no expuestos la apariencia y consistencia de los cultivos, el tamaño del paquete celular obtenido al final de periodo de incubación y la calidad del material en las preparaciones teñidas fueron prácticamente iguales.

En la Tabla 1 se presentan los valores de índice mitótico que se registraron en los lotes testigo y experimental de cada donador así como el promedio general de los 10 donadores. Las diferencias que se observan entre los donadores han sido reportadas en trabajos previos de diferentes autores y se atribuyen a la variabilidad individual que existe en la población ante un mismo estímulo (2, 4, 5).

Al comparar la respuesta de cada donador ante la presencia de Nukbone en el medio de cultivo, no se registran diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$). El hecho de que la proporción de células en proliferación sea la misma en ambos lotes (testigo y experimental) indica que la presencia del material no afecta la supervivencia celular ni su capacidad proliferativa.

El índice mitótico promedio de los 10 donadores es muy similar (Tabla 1) y la ligera diferencia entre ellos no es estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Este resultado confirma la inocuidad del Nukbone.

Tabla 1: Valores de índice mitótico promedio de cultivos de linfocitos expuestos por 48 h al material Nukbone . Se presentan los datos obtenidos de cada donador (promedio \pm error estándar) así como el promedio de los 10 donadores.

| Donador | Testigo | Experimental |
|-------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 1.66 \pm 0.26 | 1.50 \pm 0.35 |
| 2 | 2.73 \pm 0.37 | 2.25 \pm 0.4 |
| 3 | 2.75 \pm 1.07 | 2.53 \pm 0.58 |
| 4 | 2.49 \pm 0.46 | 2.95 \pm 0.43 |
| 5 | 2.98 \pm 0.71 | 3.27 \pm 0.93 |
| 6 | 3.99 \pm 0.64 | 2.32 \pm 0.29 |
| 7 | 1.98 \pm 0.22 | 3.29 \pm 0.56 |
| 8 | 1.26 \pm 0.15 | 1.27 \pm 0.16 |
| 9 | 1.22 \pm 0.25 | 1.55 \pm 0.25 |
| 10 | 1.66 \pm 0.26 | 1.50 \pm 0.35 |
| Promedio \pm EE | 2.27 \pm 0.28 | 2.24 \pm 0.24 |

También se analizó la respuesta del grupo de donadores masculinos (1 a 6, Tabla 1) y de las donadoras sin registrarse diferencias significativas dentro de cada grupo ni entre los dos grupos (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Este resultado indica que la susceptibilidad femenina a la presencia del material es la misma que la masculina y confirma que en ninguno de los grupos hay evidencia de citotoxicidad del material Nukbone.

El índice mitótico como parámetro para estimar la proliferación celular es uno de los más empleados al igual que el cultivo de linfocitos de sangre periférica por haberse comprobado ampliamente su valor como modelo experimental (4). Si las células en cultivo en presencia de un agente ajeno particular no proliferan puede inferirse que, o

bien murieron por el efecto tóxico de ese agente, o que el mismo afecte su capacidad proliferativa ya sea inhibiéndola o retardándola. También puede ocurrir que el índice mitótico se incremente de manera significativa, lo cual sería indicativo de que ese agente actúa muy posiblemente sobre el mecanismo de regulación de la proliferación celular.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el Nukbone en el cultivo primario de linfocitos humanos no afecta la proporción de células en mitosis y, por lo tanto no es citotóxico.

Referencias

- 1 Piña BMC, Murguía AN., Palma BR., Lima E. [Caracterización de hueso de bovino anorgánico: Nukbone](#). Acta Ortopédica Mexicana 20(4): 150-155 (2006).
- 2 Aguilar, M. A., Piña, M. C., López, R., Rodríguez, L., Driessens, F. Cytotoxic and genotoxic effects of the exposition of human lymphocytes to a ceramic material in vitro. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics 3(1):29-34 (2005).
- 3 Alberts B, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. Biología molecular de la célula. Garland science Publishing. USA. (2002).
- 4 Ostrosky-Wegman P., El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico, Gaceta médica de México, Academia Nacional de Medicina, 130:432-437 (1994).
- 5 Aguilar, M.A., Espinosa, S., Rodríguez, L., Piña, C. Biocompatibility in vitro tests of Zinalco. Mutat Res 446:129-134 (1995).
- 6 Gonsebatt M, Herrera L, Ostrosky-Wegman P. Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring. In: Butterworth, F. *et al.* Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. Plenum Press. USA. (1995).
- 7 Rojas, E., Montero, R., Herrera, L. Are mitotic index and human lymphocyte proliferation reproducible endpoints in genetic toxicology testing? Mutat res 282:283-286 (1982).
- 8 STATA Corp. 2000. STATA Statistical Software: release 8. College Station, TX. STATA Corporation.