

## **Tela de carbón activo: biomateriales para la proliferación y diferenciación de células mesenquimales**

V. de Araujo Farías<sup>1,5</sup>, J.J. López Peñalver<sup>1,4,5</sup>, J.L. Linares<sup>1,5</sup>, M.V. López-Ramón<sup>2</sup>, F.J. Oliver<sup>3</sup>, C. Moreno-Castilla<sup>4</sup>, J.M. Ruiz de Almodóvar<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, España.

<sup>2</sup>Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, España.

<sup>3</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC. 18100, Armilla, Granada, España.

<sup>4</sup>Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Granada, 18071 Granada, España.

<sup>5</sup>Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, IBIMER, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, España.

*Palabras claves:* Tela de carbón activado, biomateriales y células madre.

## 1. Introducción

El desarrollo creciente de la ingeniería tisular, así como los diversos procedimientos clínicos de terapia celular están estrechamente ligados a la búsqueda de nuevos biomateriales que faciliten:

- i) La consecución de líneas celulares capaces de proliferar indefinidamente y diferenciarse a diversos tipos de tejidos,
- ii) La expansión de esas células hasta alcanzar densidades de  $1\text{-}5\cdot 10^6$  células por kg de peso del paciente [1], y
- iii) La regeneración de tejidos dañados [2-4].

Las estructuras tridimensionales de los biomateriales proporcionan el soporte adecuado para que las células se adhieran, proliferen e, incluso, se diferencien cuando se les suministran los factores de crecimiento y diferenciación apropiados.

Diversos estudios se han centrado en el desarrollo de estructuras tridimensionales "scaffolds" a partir de los compuestos biológicos naturales existentes en el hueso o en la matriz extracelular [2, 3, 5-7] que, además de proporcionar un soporte de fijación para las células, suministran a éstas un microambiente similar al de los tejidos naturales, al actuar como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento [7] y facilitar la interacción de las moléculas señalizadoras con los receptores de la superficie celular [6, 8]. Por otra parte se ha descrito que los biomateriales basados en macromoléculas pueden afectar a las capacidades celulares de fijación, migración, proliferación y diferenciación [9]. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevos biomateriales entre los que se encuentran los nanotubos de carbono [10, 11] y las fibras de carbón activo [12], ya que estos son materiales biocompatibles sobre los que las células pueden adherirse y proliferar. La adhesión de las células vivas sobre el carbón activo incluye, en primera aproximación, un fenómeno de adsorción que tiene lugar entre la superficie del carbón y las macromoléculas que conforman la estructura de la membrana celular (entre ellas los antígenos de membrana). La adsorción puede explicarse mediante la teoría de la química de los coloides y las superficies, que incluye tanto la atracción electrostática como la no-electrostática entre las que se encuentran las interacciones hidrófobas. Esta última depende de la hidrofobicidad de la superficie de interacción entre las células y el carbón. Cuanto mayor sea esta fuerza de atracción mejor será el enlace entre el biomaterial y la célula. Una vez adheridas las células a la superficie del carbón, éste facilita el crecimiento celular debido a sus propiedades adsorptivas que hacen que el oxígeno y los nutrientes disueltos en el medio de cultivo se concentren sobre su superficie [13] favoreciéndose así la disponibilidad de los mismos por las células.

## 2. Telas de carbón activo (TCAs)

Las telas de carbón activado (TCAs) son tejidos cuyos hilos entrecruzados alternativa y regularmente están constituidos por fibras de carbón activado. Estos materiales presentan muchas ventajas frente a los carbonos activados tradicionales en forma pulverulenta o granular. Así, las fibras de carbón activado presentan un área superficial elevada y su estructura porosa típica está desarrollada perpendicularmente al eje de la fibra. Estas características hacen que posean una alta capacidad y rápida cinética de adsorción, tanto en fase líquida como gaseosa. Además, las TCAs son fáciles de

manejar y de adaptar a cualquier sistema experimental. Por todo ello estos materiales han encontrado numerosas aplicaciones como adsorbentes en usos militares, en procesos de descontaminación ambiental y en medicina.

La TCA usada en los experimentos de crecimiento y diferenciación de células madre mesenquimales fue una tela comercial que se caracterizó adecuadamente para conocer su superficie, porosidad y química superficial [14]. Así, a partir de la isoterma de adsorción de  $N_2$  a  $-196^\circ C$  se calculó una área superficial BET de  $2128\text{ m}^2/\text{g}$ , un volumen de microporos y anchura media (mediante DR) de  $0,931\text{ cm}^3/\text{g}$  y  $1,69\text{ nm}$ , respectivamente, y un volumen de mesoporos de  $0,028\text{ cm}^3/\text{g}$ . El volumen de poros accesibles al agua fue de  $0,650\text{ cm}^3/\text{g}$ . La acidez y basicidad superficial total fueron similares,  $0,44$  y  $0,40\text{ meq/g}$ , respectivamente y el pH del punto de carga cero ( $\text{pH}_{\text{PCC}}$ ) fue de  $7,0$ .

Las células mesenquimales tienen un tamaño del orden de algunas decenas de micrometros, por tanto quedarán sobre la superficie más externa de la TCA atrapadas entre el entramado de fibras de carbón activado que componen su estructura. Cabe la posibilidad de que algunas de las cadenas de proteínas que forman la membrana celular penetren en mayor o menor extensión en los poros de las fibras, interaccionando con sus paredes para actuar como anclaje de las células mesenquimales. El pH de la disolución usada para el cultivo de estas células ( $7,4$ ) es muy cercano al del  $\text{pH}_{\text{PCC}}$ , por lo que la superficie de la TCA prácticamente estará desprovista de cargas electrostáticas. En estas condiciones predominan las interacciones no electrostáticas entre la TCA y las células mesenquimales.

## 3. Proliferación de células mesenquimales sobre TCAs

El término célula madre puede aplicarse a un diverso grupo de células que con independencia del tejido del que hayan sido derivadas, comparten dos propiedades características: i) poseen la capacidad de producir otras células madres del mismo tipo de manera ilimitada; y ii) dan origen a células diferenciadas que posibilitan el mantenimiento de la homeostasia tisular [15-17].

Por su potencialidades de desarrollo las células madres se han clasificado como [18]: i) *Totipotenciales*, aquellas que son capaces de dar origen a cualquier tejido embrionario o extra-embrionario; ii) *Pluripotenciales*, son células que dan origen a cualquier tipo de tejido que pertenezca al embrión; iii) *Multipotenciales*, son células capaces de originar un conjunto limitado de tipos celulares; iv) *Oligopotenciales*, son aquellas células que pueden derivarse a un conjunto más limitado de tipos celulares relacionados; y v) *Unipotenciales*, células que se diferencian a un único tipo celular maduro.

Dentro de las células multipotenciales cabe destacar las células mesenquimales, MSCs, que pueden dar origen a condrocitos, osteocitos, adipocitos, miocitos y neuronas [19-25] (Figura 1). El uso de estas células tanto en terapia celular como en ingeniería tisular presenta las siguientes ventajas: i) La utilización de células MSCs del ser humano adulto para investigación biomédica plantea pocos problemas de orden ético, moral o legal; ii) Se ha puesto de manifiesto la existencia de MSCs en diferentes tejidos humanos [26-29]; iii) El cordón umbilical contiene una abundante, no controvertida, y

fácilmente obtenible fuente de células MSCs [21, 22]; iv) Las células MSCs podrían emplearse en terapia celular [30]; v) Las células MSCs pueden ser expandidas extensivamente en cultivos *in vitro* sin pérdida de su función ni cambios apreciables en su fenotipo [29]; y vi) El trasplante de células

mesenquimales derivadas de tejidos del ser humano adulto ha demostrado ser un tratamiento cuya eficacia, en problemas de salud tales como el infarto de miocardio o los trastornos isquémicos de los miembros inferiores, se está estudiando [31-35].

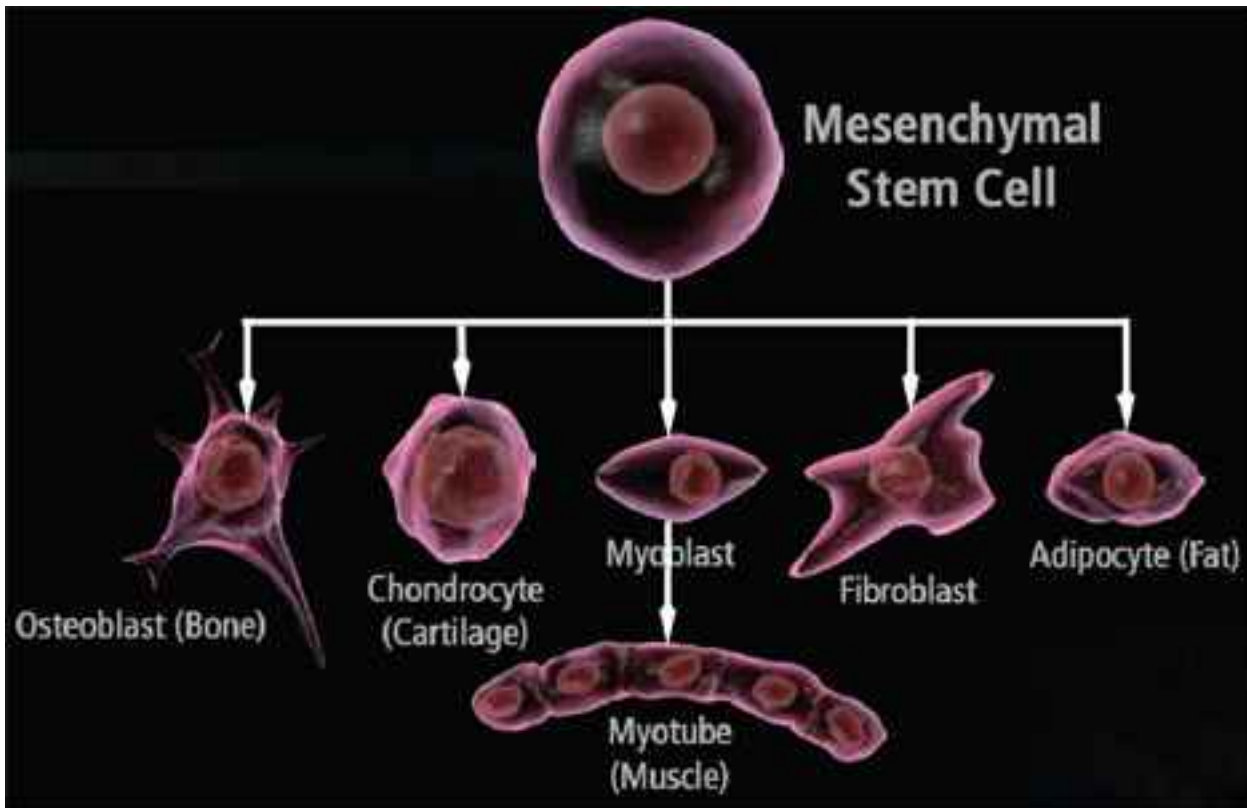
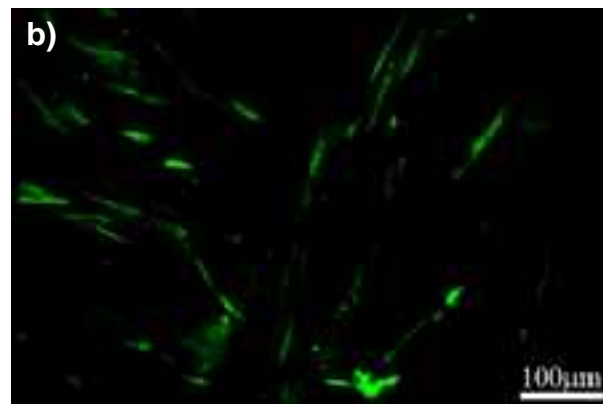
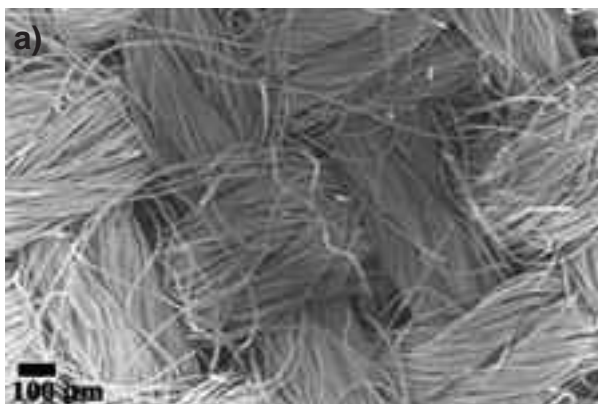


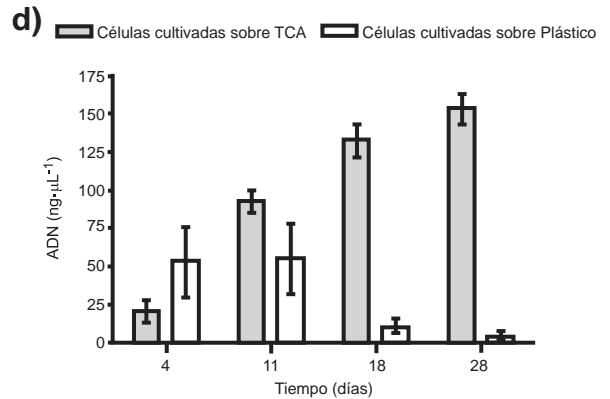
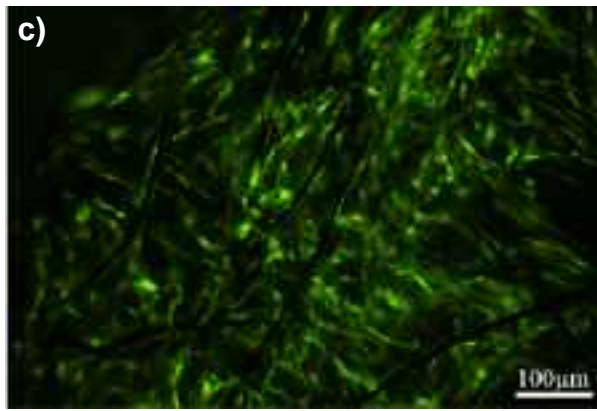
Figura 1. Capacidad de diferenciación de células MSCs. (Adaptada de BD Stem Cell Resource.)

Considerando que la utilidad de las células MSCs en clínica es cada vez más prometedora y que es necesario encontrar fuentes de células mesenquimales que sean seguras y fáciles de obtener, en un trabajo previo [36] hemos estudiado y caracterizado las células MSCs derivadas del tejido perivascular (Wharton's jelly) del cordón umbilical humano y esas células las hemos hecho crecer sobre TCAs (Figura 2B y 2C) [12].

Las células MSCs obtenidas de la región perivascular del cordón umbilical se cultivaron a 37°C en atmósfera de hipoxia (5% CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>), cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días [37]. El crecimiento de las células adheridas en las TCAs se realizó en cajas de cultivo de 96 pocillos en cada uno de los cuales se introdujo un fragmento circular de TCA de 6 mm de diámetro y sobre éste se sembraron 10<sup>4</sup> células. El cultivo se mantuvo durante

28 días. El incremento en el número de células, en función del tiempo, se realizó por extracción y cuantificación del ADN existente sobre la TCA. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que, al menos, tras dos semanas de cultivo las células adheridas a las TCAs crecen con tiempos de duplicación comparativos a los que caracterizan el crecimiento del cultivo sobre plástico. Por otra parte, cuando el mismo número de MSCs se siembran sobre plástico, y se mantienen en cultivo durante 28 días, cambiándoles el medio cada 2-3 días, se observa que a partir de los 11 días de cultivo su número comienza a disminuir, ya que al llegar a confluencia se origina una estructura tridimensional que limita el crecimiento y promueve la muerte –apoptosis, autofagia o necrosis– de las células situadas en su interior disminuyendo de esa forma el número de células viables (Figura 2D).





**Figura 2. A)** Imagen de la TCA obtenida mediante SEM. **B)** Proliferación celular de células MSCs transducidas con GFP a los 7 días de la siembra sobre TCAs. **C)** Proliferación celular de células MSCs transducidas con GFP a los 28 días de la siembra sobre TCAs. **D)** Valores de DNA extraídos: Comparación entre el cultivo en monocapa sobre plástico (barra blanca) y cultivo sobre TCAs para 4, 11, 18 y 28 días de cultivo, respectivamente.

**4. Diferenciación a osteocitos de MCs cultivadas sobre TCAs**

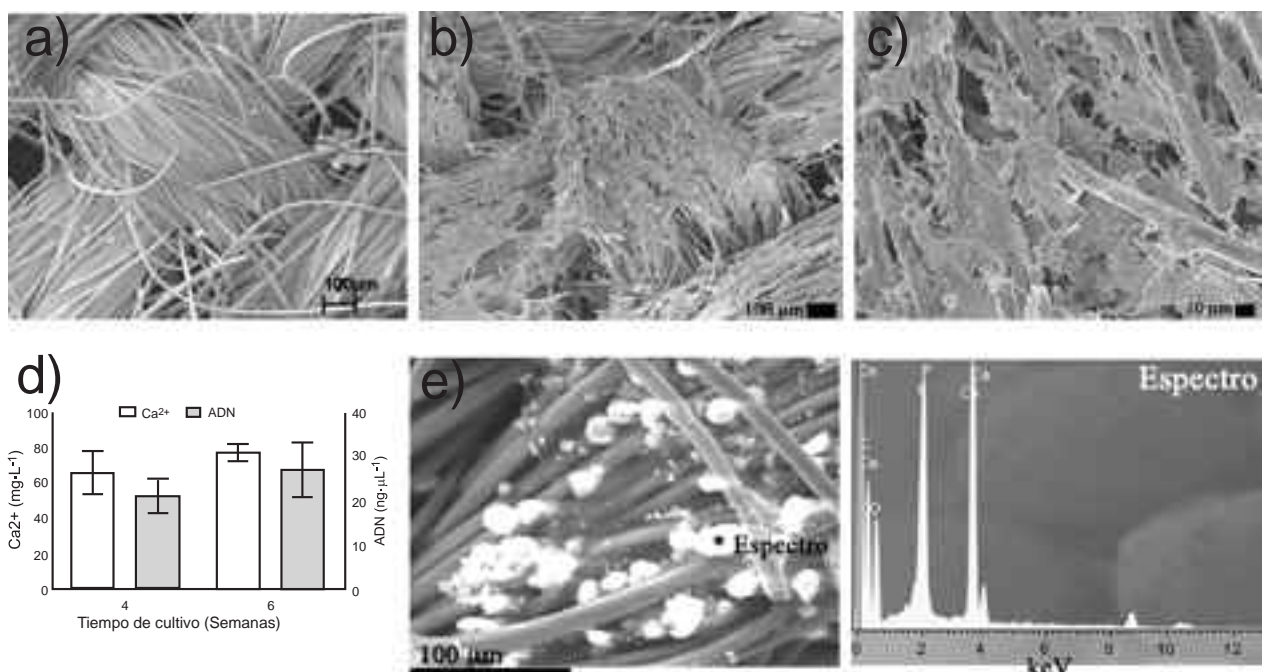
La diferenciación a osteocito se llevo a cabo mediante la siembra de 10 MSCs, sobre TCAs circulares de 6 mm de diámetro, en cajas de 96 pocillos, empleando un medio de diferenciación osteogénica [38]. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Transcurridas 4 y 6 semanas se procedió al estudio de las TCAs mediante microscopia de fluorescencia, microscopia electrónica de barrido, difracción de Rayos X, microanálisis superficial mediante microscopia electrónica de barrido y cuantificación del Ca<sup>2+</sup> extraído mediante espectroscopia de absorción atómica.

Los resultados de la diferenciación osteogénica muestran que: i) Es posible inducir la diferenciación a osteocito de células MSCs cuando estas se cultivan sobre TCAs (Figura 3-B, 3-C); ii) Los osteocitos cultivados sobre las TCAs muestran autofluorescencia bajo la luz UV (Figura 3-G) [12]; iii) El microanálisis por SEM-EDX confirma la presencia de núcleos de hidroxiapatita sobre la superficie de las TCAs (Figura 3-E), poniendo de manifiesto la existencia de este material que es

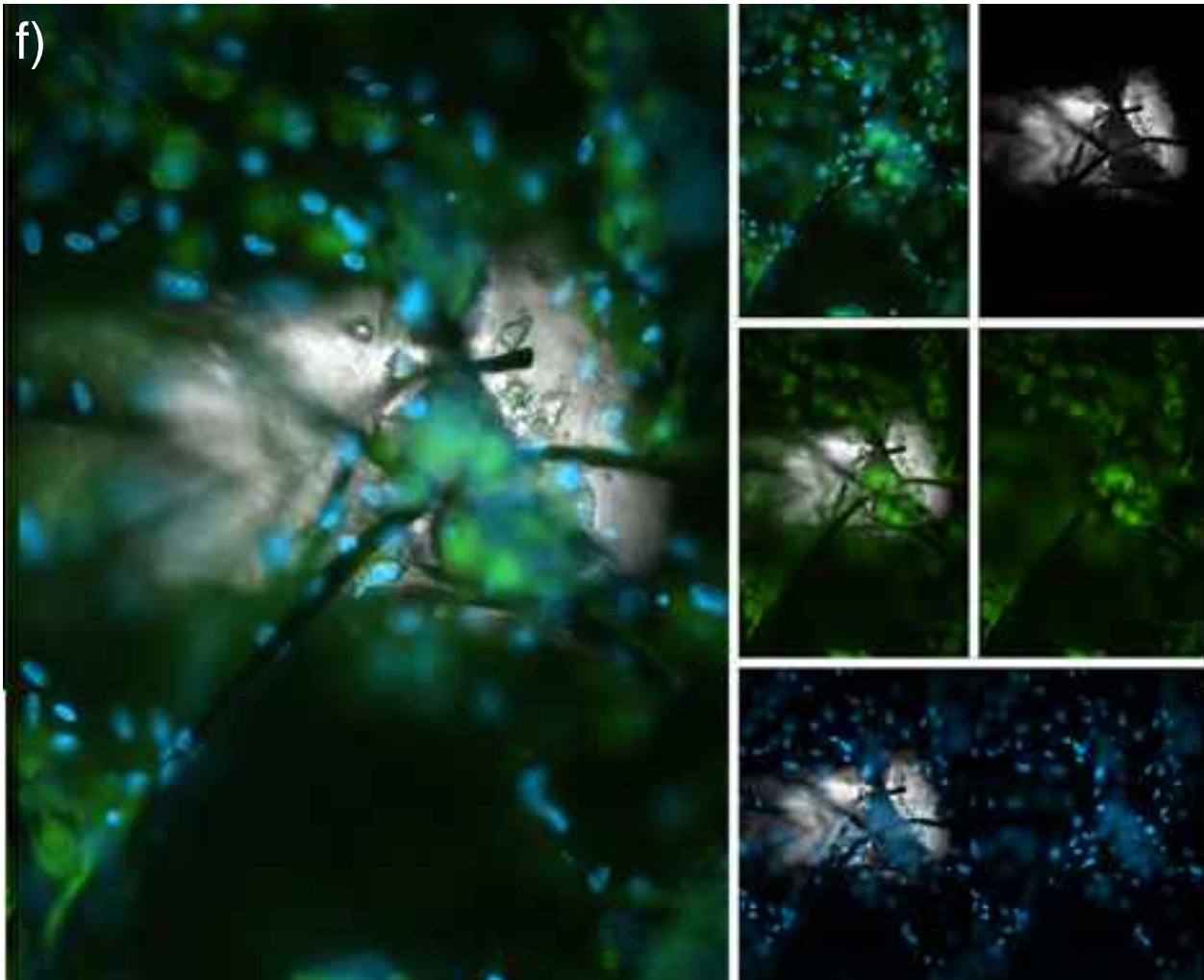
parte fundamental del hueso [12, 39]; iv) Los valores determinados de ADN y de Ca<sup>2+</sup> (Figura 3-D), tras 4 y 6 semanas de cultivo, así como el marcaje con DAPI de los núcleos (Figura 3-F), indican que los osteocitos son viables y funcionales durante todo el período de estudio.

**5. Diferenciación a condrocitos de MCs cultivadas sobre TCAs**

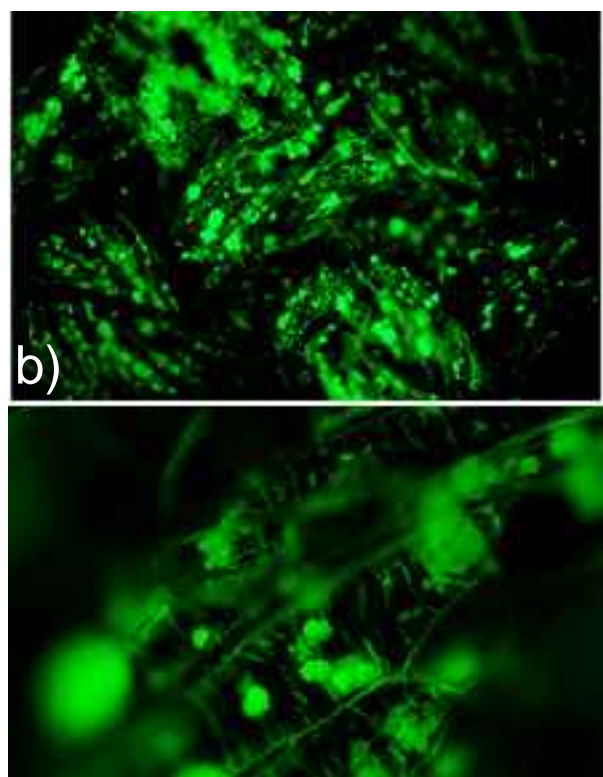
La diferenciación a condrocito se ha llevado a cabo sembrado 5·10<sup>5</sup> células MSCs en TCAs circulares de 16 mm de diámetro, en placas de 24 pozos, con medio de diferenciación condrogénica (DMEM (4,5 g/l glucosa) enriquecido con dexametasona (10<sup>-7</sup> M), 1x insulina-transferrina-selenio (Gibco), ácido ascórbico (5·10<sup>-5</sup> M) y 1x penicilina-streptomicina (Gibco). El medio de diferenciación se cambió cada 3 días. Tras 14 días de cultivo las TCAs con células MSCs diferenciadas a condrocitos se examinaron mediante microscopia de fluorescencia (Figura 4-A), observándose la formación de fibras de colágeno extracelular como sugiere la Figura 4-B en la que las fibras de carbón quedan recubiertas por una capa autofluorescente, colágeno Tipo-II, que se prolonga para interconectar las fibras de carbón.



**Figura 3. A)** Imagen de la TCA de control obtenida mediante SEM tras 6 semanas de cultivo en medio de diferenciación osteogénico. **B)** Proliferación celular de células MSCs diferenciadas a osteocitos tras 6 semanas de cultivo. **C)** Detalle de la proliferación celular de células MSCs diferenciadas a osteocitos tras 6 semanas de cultivo. **D)** Valores de DNA extraídos y Ca<sup>2+</sup> a las 4 y 6 semanas de cultivo. **E)** Análisis EDX de núcleos de hidroxiapatita tras la diferenciación a osteocito.



**Figura 3. F)** Marcaje de los núcleos de células diferenciadas a osteocito con DAPI. **G)** Autofluorescencia bajo luz UV de células MSCs diferenciadas a osteocito tras 4 semanas de cultivo.



**Figura 4. A)** Proliferación celular de células MSCs diferenciadas a condrocitos tras 14 días de cultivo. **B)** Detalle de la formación de colágeno extracelular recubriendo las fibras de la TCA.

## 6. Conclusiones

El análisis de los resultados pone de manifiesto que es posible realizar el cultivo de células mesenquimales sobre telas de carbón activo y que mediante el empleo de medios de diferenciación osteogénica y condrogénica se pueden diferenciar éstas células MSCs a osteocitos y condrocitos.

## 7. Referencias

- 1 Giordano A, Galderisi U, R. Marino I. From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2007;211(1):27-35.
- 2 Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*. 2003;22(1):81-91.
- 3 Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, Redl H, van Griensven M. State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2011;5(4):e36-e51.
- 4 Minuth WW, Sittlinger M, Kloth S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell and Tissue Research*. 1997;291(1):1-11.
- 5 Badylak SF, Park K, Peppas N, McCabe G, Yoder M. Marrow-derived cells populate scaffolds composed of xenogeneic extracellular matrix. *Experimental Hematology*. 2001;29(11):1310-8.
- 6 Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials*. 2005;26(35):7339-49.
- 7 Chen J, Chen H, Li P, Diao H, Zhu S, Dong L, et al. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials*. 32(21):4793-805.
- 8 Reddi AH. Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Biomaterials. *Tissue Engineering*. 2000;6(4):351-9.
- 9 Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*. 1999;11(5):634-40.
- 10 Namgung S, Baik KY, Park J, Hong S. Controlling the Growth and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by the Arrangement of Individual Carbon Nanotubes. *ACS Nano*.
- 11 McCullen SD, Stevens DR, Roberts WA, Clarke LI, Bernacki SH, Gorga RE, et al. Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(2):253-63.
- 12 López Peñalver JJ, Linares-Fernández J-L, de Araujo Fariás V, López-Ramón MV, Tassi M, Oliver FJ, et al. Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes. *Carbon*. 2009;47(15):3574-7.
- 13 Moreno-Castilla C. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon*. 2004;42(1):83-94.
- 14 López-Ramón MV, Fontecha-Cámara MA, Álvarez-Merino MA, Moreno-Castilla C. Removal of diuron and amitrole from water under static and dynamic conditions using activated carbons in form of fibers, cloth, and grains. *Water Research*. 2007;41(13):2865-70.
- 15 Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):93-106.
- 16 Osawa M, Hanada K-i, Hamada H, Nakauchi H. Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. *Science*. 1996;273(5272):242-5.
- 17 Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell*. 2004;116(6):769-78.
- 18 Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*. 2004;116(5):639-48.
- 19 Charge SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews*. 2004;84(1):209-38.
- 20 Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, et al. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*. 2004;22(4):617-24.
- 21 Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*. 2007;25(2):319-31.
- 22 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
- 23 McKay R. Stem Cells in the Central Nervous System. *Science*. 1997;276(5309):66-71.
- 24 Slack JMW. Stem Cells in Epithelial Tissues. *Science*. 2000;287(5457):1431-3.
- 25 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2002;13(12):4279-95.
- 26 Meirelles LdS, Caplan AI, Nardi NB. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.
- 27 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
- 28 Meirelles LdS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. 2006;119(11):2204-13.
- 29 Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood*. 2004;103(5):1647-52.
- 30 Karahuseyinoglu S, Kocaefe C, Balci D, Erdemli E, Can A. Functional Structure of Adipocytes Differentiated from Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26(3):682-91.
- 31 Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2003;75(1):204-9.
- 32 Flynn A, O'Brien T. Stem cell therapy for cardiac disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2011;11(2):177-87.

- 33 Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovascular Research*. 2005;66(3):543-51.
- 34 Kim H, Choi O. Neovascularization in a mouse model via stem cells derived from human fetal amniotic membranes. *Heart and Vessels*. 2011;26(2):196-205.
- 35 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. *Circulation*. 2004;109(12):1543-9.
- 36 Farias VA, Linares-Fernandez JL, Penalver JL, Paya Colmenero JA, Ferron GO, Duran EL, et al. Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta*. 2011;32(1):86-95.
- 37 Sercin K, Ozgur C, Emine K, Fadil K, Guvem Gumus A, Duygu Ozel D, et al. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*. 2007;25(2):319-31.
- 38 Eblenkamp M, Aigner J, Hintermair J, Potthoff S, Hopfner U, Jacobs V, et al. Umbilical Cord Stromal Cells (UCSC). *Der Orthopäde*. 2004;33(12):1338-45.
- 39 Morimoto D, Tomita T, Kuroda S, Higuchi C, Kato S, Shiba T, et al. Inorganic polyphosphate differentiates human mesenchymal stem cells into osteoblastic cells. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2010;28(4):418-23.