

Aislamiento y cultivo de células osteoblásticas: Interés para la investigación en cirugía ortopédica y traumatología

L. MESEGUER OLMO, A. BERNABEU ESCLAPEZ, M. CLAVEL-SAINZ NOLLA, J. MUÑOZ RUIZ-SEIQUER
y L. RUANO GARCÍA

Servicio de COT, Hospital Universitario «Morales Meseguer», Murcia. Unidad de Cultivos Celulares, Universidad de Murcia. Servicio de COT, Hospital Universitario «Virgen de la Arrixaca», Murcia. Laboratorio de Cirugía Ortopédica Experimental (Prof. Clavel-Sainz). Facultad de Medicina, Murcia.

Resumen.—Describimos un método de aislamiento y caracterización de células osteoblásticas procedentes de la superficie de trabéculas óseas de explantes obtenidos de metafisis de fémures y tibias de conejo y de cabezas femorales humanas de pacientes sometidos a cirugía protésica de cadera. Después de eliminar las células de la médula ósea de los explantes, estos se despositaron sobre dos tipos de mallas, de 80 y 100 μm ., obteniéndose un cultivo en monocarpa que se mostró confluyente a partir de los 20 días. La población celular aislada presentó un fenotipo osteoblástico utilizando métodos colorimétricos para determinación de la actividad de fosfatasa alcalina (FA) y morfológicos por medio de la observación con microscopía electrónica de barrido. Las células cultivadas exhibieron una morfología diferente según el grado de confluencia de cultivo, siendo en todo momento positivas las sucesivas determinaciones colorimétricas de FA realizadas a lo largo de la experiencia. Consideramos el método de gran interés en investigación en ortopédica, pues permite el estudio de comportamiento de estas células cuando están sometidas a cualquier tipo de estímulo externo, así como cuando se enfrentan a nuevas generaciones de biomateriales, etc.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF OSTEOBLASTIC CELLS: ITS VALUE IN ORTHOPAEDIC RESEARCH

Summary.—We describe a method of isolation and characterization of osteoblastic cells taken from the surface of bone trabeculae of explants obtained from femur and tibia metaphysis in rabbits and human femoral head in patients undergoing orthopaedic surgery. After removing the cells from the bone marrow of explants, they were placed over two mesh, 80 and 100 μm , obtaining then a culture in monolayer which showed to be confluent after 20 days. The isolated cell population showed an osteoblastic phenotype using colourmetric methods to determinate the alkaline phosphatase (AF) activity and morphologic methods by means of scanning. The cultivated cell showed a different morphology according to the degree of confluence of the culture, being always positive the sucesive colourmetric determinations of AF along the experiment. We consider the method of a great interest for orthopaedic investigations, since it allows the study of the behaviour of these cells when they are subject to different types of external stimulus as well as meet they the new generations of biomaterials.

INTRODUCCIÓN

Desde principios de siglo las técnicas de cultivos celulares han aportado un poderoso méto-

do analítico para el estudio de los fenómenos celulares.

A partir de los primeros trabajos de Peck y cols. (1) que reconocieron la posibilidad de aislar y cultivar células óseas, se han descrito diferentes técnicas para tal fin, digestión enzimática con colagenasa (2-5), clonación (6-8), aislamiento mecánico (9, 10), y aplicadas sobre diferentes fuentes tales como

Correspondencia:
Dr. LUIS MESEGUER OLMO
Ronda de Levante, 2-1°
30008 Murcia

calota de fetos de roedores (11-13), embriones de pollo (14, 15), calota y huesos largos de conejo (16), y hueso humano (9, 17-19).

Una vez establecido un cultivo celular la caracterización es esencial para estudios adicionales. Esta se basa, de una parte, en la producción de ciertas sustancias asociadas a este tipo de células, como el colágeno tipo I (20, 21), actividad fosfatasa alcalina (22-24), producción de osteocalcina (25-27) y osteonectina (28), respuesta celular a la PTH y prostaglandina E₁ (8, 28-31) y la capacidad osteogénica (26-30), y por otra, en la morfología de las células cultivadas pero su difícil diferenciación de otras células mesenquimales obliga a que los métodos de identificación deban combinar ambos procedimientos, bioquímicos o inmunocitoquímicos y los morfológicos.

En este trabajo, describirnos el procedimiento seguido para lograr iniciar una línea celular osteoblástica estableciendo sus características mediante estudio morfológico con microscopía de contraste de fase (MF) y microscopía electrónica, y bioquímicos mediante la determinación de la actividad fosfatasa alcalina (FA).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Aislamiento de osteoblastos y técnicas de cultivo

Los osteoblastos se obtuvieron de un cultivo primario iniciado mediante la técnica de explantes a partir de pequeños fragmentos de esponjosa de 1 a 3 mm. aproximadamente, obtenidos de metafisis de fémures y tibias de conejo y de cabezas femorales de pacientes sometidos a sustitución articular de cadera con edades comprendidas entre 65 a 83 años.

Para eliminar las células de la médula ósea, los fragmentos de hueso se lavaron de forma repetida con una

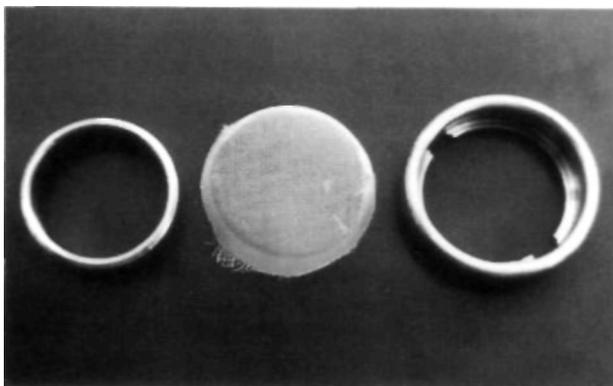


Figura 1. Anillos de diseño personal y malla de 80 µm.

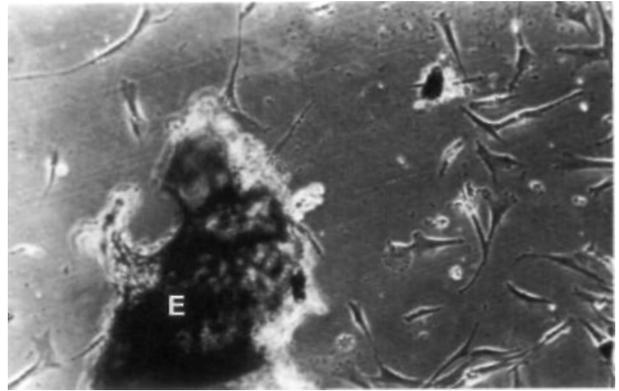


Figura 2. Microscopio de contraste de fase (MF): Células óseas emigran del explante (E) (100 X).

solución tamponada estéril PBS, (Phosphate Buffered Saline), a la que se añadió penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) para prevenir contaminaciones. Tras ello, se depositaron (en número de 6 a 8) sobre mallas de nailon de 80 y 100 µm de diámetro de poro sujetas entre dos anillos de acero inoxidable grado 304 (no tóxico para las células) (Fig. 1), especialmente diseñados para este fin, que se colocaron en placas de Petri con 5 ml. de medio de cultivo Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biochrom KG) suplementado inicialmente con un 20% de suero fetal de ternera (SBF, Biowhittaker, France) y penicilina y estreptomycin como antimicrobianos de rutina (100 UI/ml. y 100 µg/ml., respectivamente).

La incubación de los cultivos se realizó a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

El medio de cultivo se renovó a las 24 horas y posteriormente cada 3-4 días, lo que permitió eliminar sucesivamente las células no adherentes. Cuando las células tapizaron la superficie de cultivo (aproximadamente 20-30 días), se retiraron los anillos con los explantes y se realizó el primer subcultivo en frascos de 25 cm², separando las células mediante tratamiento enzimático con Tripsina-EDTA (0,1 mg./ml., 0,2 mg./ml.: Sigma). La viabilidad de las mismas se comprobó mediante el test de exclusión (tinción vital) con azul tripan al 0,05%.

2. Identificación y caracterización de osteoblastos

A) Métodos Bioquímicos

La determinación de la actividad fosfatasa alcalina, se evaluó utilizando el KIT-104 (Sigma) empleando como muestra un extracto de células preparado previo lisado de las mismas y liberación enzimática mediante choque osmótico con agua destilada y tritón X-100 al 1%, para medida espectrofotométrica a 405 nm. de la producción de paranitrofenol a partir de paranitrofenilfosfato, que bajo condiciones alcalinas se convierte en un

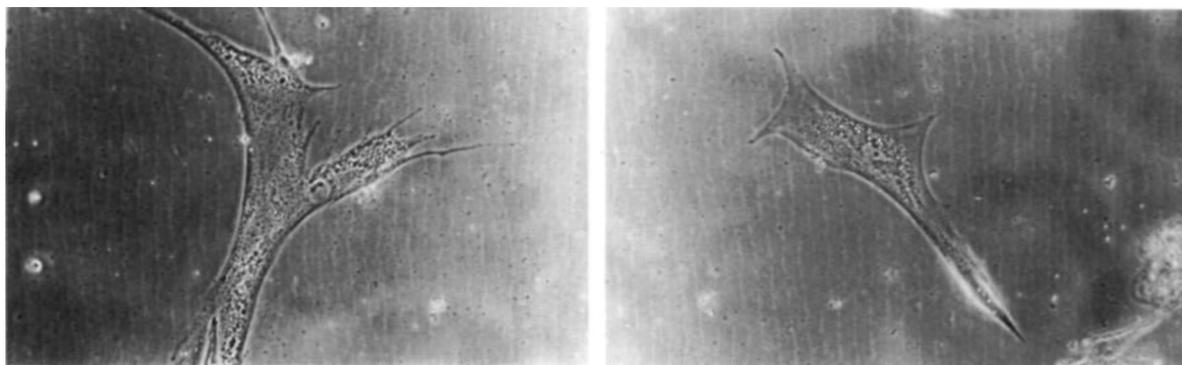


Figura 3. Imagen con MF: A) Las células presentan morfología poligonal con núcleo ovalado y B) prolongaciones citoplasmáticas (200 X).

complejo de color amarillento de intensidad variable proporcional a la actividad fosfatasa.

B) Método Morfológico: Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Transmisión (MET)

Las células óseas cultivadas se sembraron en un tubo Leighton a 20.000 células/cm.² durante 10 días, se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,15 M (pH 7,2) y tras lavado con el mismo tampón, se realizó la postfijación con tetraóxido de Osmio al 1%. La deshidratación se llevó a cabo con concentraciones decrecientes de alcohol y acetona antes del punto crítico de secado, seguidamente fueron cubiertas con oro y examinadas fotografiadas usando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6100 a 15 kV.

Para el estudio con MET, las células cultivadas fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos, y el sedimento obtenido se fijó con glutaraldehído al 2,5%, la postfijación se llevó a cabo con tetraóxido de Osmio al 1%. Seguidamente las muestras fueron deshidratadas con alcohol e incluidas en Epon. Las secciones ultrafinas

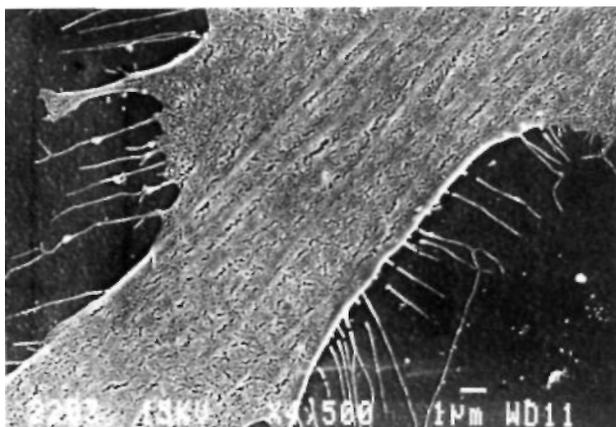


Figura 4. Imagen con MEB muestra numerosas microvellosidades de la célula. (4.500 X).

montadas sobre rejillas de cobre fueron examinadas con un microscopio electrónico Zeiss EM 109.

RESULTADOS

Las células obtenidas a partir de los explantes tanto animales (OC) como humano (OH) crecieron

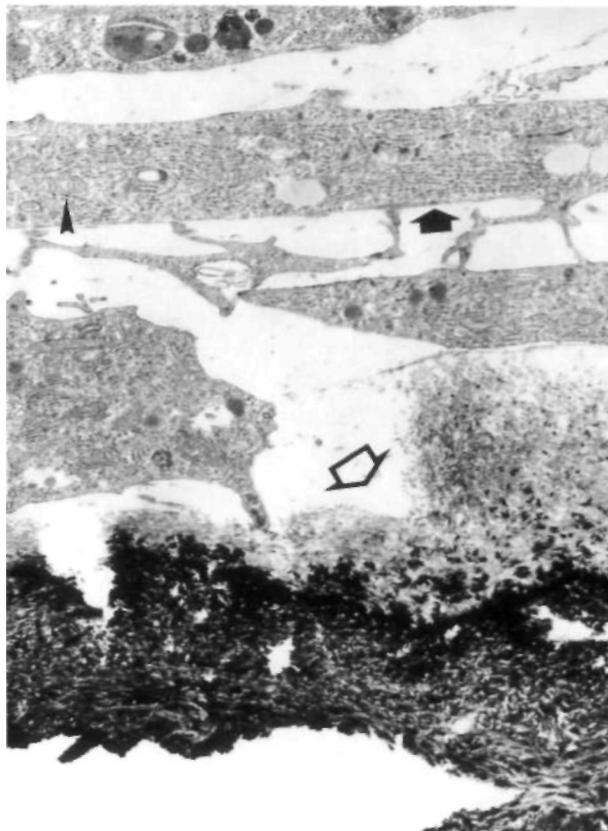


Figura 5. Imagen con MET donde se muestran características propias del osteoblasto; flecha negra: retículo endoplasmático rugoso; cabeza de flecha: mitocondrias; flecha blanca: fibras colágenas (7000 X).



Figura 6. Imagen con MF: Abundantes contactos intercelulares (cabeza de fecha) y división celular (flecha). (200 X).

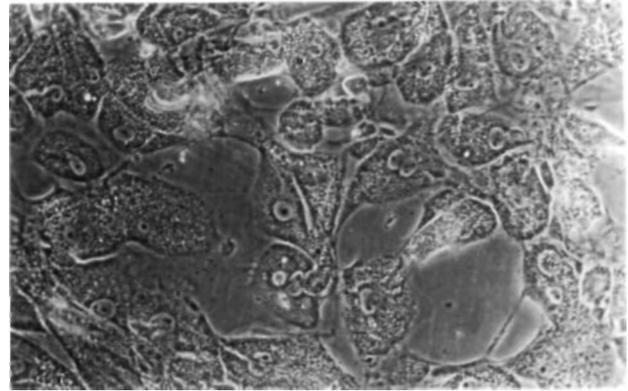


Figura 7. Imagen con MF: Cultivo confluyente y cambios morfológicos en las células. (200 X).

en general rápidamente en las placas de Petri, no influyendo el diámetro de los poros de las mallas utilizadas.

Con MF se observó que las células emigraron desde la superficie ósea de los explantes, observándose a los 7 días (Fig. 2), frecuentes células dispuestas de forma dispersa y adheridas al fondo de la placa mostrando una morfología heterogénea bi o tripolar, con núcleo central ovalado y con uno o dos nucléolos patentes, así como extensas proyecciones citoplasmáticas (Fig. 3A-B), con microvellosidades en toda la superficie de la célula (Fig. 4).

Los estudios con microscopía electrónica de transmisión (MET) (Fig. 5) mostraron las características propias de estas células como son: prominente retículo endoplasmático rugoso, un activo y bien desarrollado aparato de Golgi, numerosas mitocondrias y vacuolas dispersas, el núcleo excéntrico con uno o dos nucléolos. Este aspecto fue similar para los OC y los OH, tanto en su forma aislada como cuando más tarde las células fueron confluentes.

A los 15 días, la presencia de conexiones a través de estas proyecciones de la superficie celular, revela la abundancia de contactos intercelulares existentes entre las células orientadas de forma paralela (Fig. 6).

A los 20-30 días, se observó la confluencia de este tipo de células, mostrando en este período una morfología más poligonal o incluso redondeada disminuyendo la longitud de las prolongaciones citoplasmáticas (Fig. 7), manteniéndose las conexiones entre ellas con tendencia a una orientación en una misma dirección (Fig. 8A), como también se pudo observar con MEB (Fig. 8B).

Con las poblaciones celulares obtenidas en el primer subcultivo se procedió de nuevo a la identificación de las mismas mediante MF, MEB, MET y la determinación colorimétrica para fosfatasa alcalina.

Estas células mostraron por el método colorimétrico una alta actividad para la fosfatasa alcalina, durante todo el período del estudio (3 meses), confirmando el fenotipo osteoblástico de las mismas.

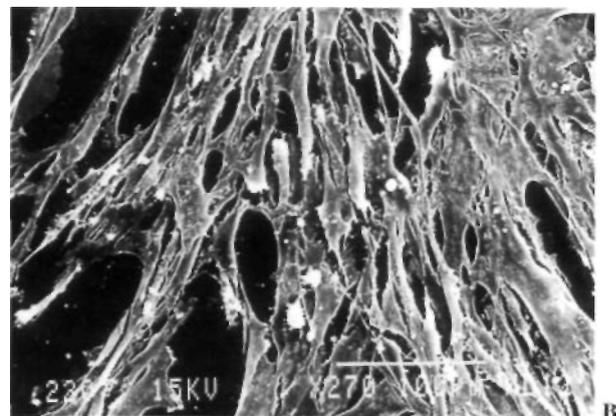
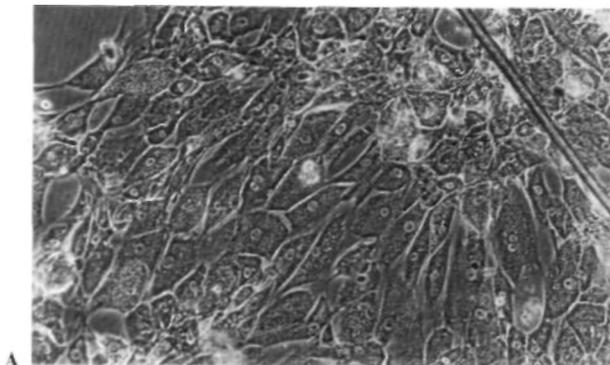


Figura 8. Orientación del cultivo confluyente: A) imagen con MF, 200 X; B) imagen con MEB, 270 X.

DISCUSIÓN

Hoy día podemos recurrir a tres modelos para llevar a cabo estos estudios: cultivos de calota fetal, cultivo de hueso humano normal y líneas celulares establecidas procedentes de sarcomas, etc. Cada procedimiento tiene sus ventajas e inconvenientes (mezcla de poblaciones celulares, cambios del funcionamiento celular, potencial de crecimiento variable, etc.).

Desde las primeras descripciones de cultivos de células óseas, se han centrado los esfuerzos en establecer las condiciones adecuadas «in vitro», para la completa expresión y mantenimiento del fenotipo osteoblástico. Así pues, una vez que el cultivo óseo está establecido, la caracterización de las células se convierte en esencial para posteriores estudios. Únicamente por la morfología de las células cultivadas no se pueden diferenciar entre varias células mesenquimales, por ejemplo, osteoblastos, condrocitos y fibroblastos. Por esta razón, se han empleado para establecer la exacta naturaleza de las células óseas cultivadas la microscopía electrónica de transmisión y barrido, métodos histoquímicos (determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina), inmunocitoquímica para colágeno tipos I-III, cuantificación de la producción de osteocalcina, respuesta a PTH, etc. (2, 3, 6-9, 11, 12, 22, 23, 25, 27, 29, 30).

El método de aislamiento utilizado en este trabajo, se basa en la cuidadosa disección de tejido óseo esponjoso retirando hueso cortical y periostio, así como en la capacidad de migración, desde los explantes, y de adhesión de los osteoblastos sobre determinadas superficies (cristal, polímeros, etc.) (5, 32) sin precisar suplementar el medio de cultivo con ácido ascórbico como ocurre con las técnicas descritas por Ecarot-Charrier et al. (1983) (11) y Ecarot-Charrier et al. (1988) (12). La eliminación de las células no adherentes de la médula

ósea se ha realizado con sucesivos lavados y cambios del medio de cultivo, con lo que evitaríamos las alteraciones celulares descritas con procedimientos de tipo enzimático con colagenasa (1, 14). Una vez obtenido éstos son cultivados en medios adecuados para su multiplicación y diferenciación.

No hemos observado efectos adversos sobre el potencial mitótico de las células con la aplicación de Tripsina-EDTA sobre las células, tal como describe Masquelier y cols. (1990) (13), pues los subcultivos realizados después de su aplicación, presentaron un crecimiento similar que antes de su aplicación.

En cuanto a las técnicas aplicadas para la identificación han consistido en: la observación de su aspecto morfológico en cultivos a baja densidad y confluentes utilizando la microscopía de contraste de fase, microscopía electrónica de transmisión y barrido y el estudio de la actividad de fosfatasa alcalina por técnicas colorimétricas, demostrando la caracterización fenotípica osteoblástica durante todo el período de cultivo. Los resultados de las observaciones morfológicas tanto a baja densidad como en confluencia coinciden con los autores consultados (13, 15, 24, 27, 32-35), no encontrando diferencias sustanciales entre ambos tipos de células OC y OH.

Considerarnos este método de gran interés para el amplio campo de la investigación en ortopedia, pues el disponer de células óseas en cultivo, y en concreto osteoblastos, en unas condiciones precisas físico-químicas y nutricionales, constituye un método útil permitiéndonos el estudio de las funciones y los factores que regulan su crecimiento, el efecto de determinados fármacos, el estudio de la fisiopatología de las enfermedades óseas, así como el comportamiento de las mismas frente a diferentes biomateriales, línea de trabajo que seguimos actualmente en nuestro centro.

Bibliografía

1. Peck WA, Birge, SI, Fedak SA. Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science* 1964; 146: 1476-7.
2. Brcesford J, Gallagher J, Gowen M et al. Human bone cells in culture: a novel system for the investigation of bone cell metabolism. *Clin Sci* 1983; 64: 33-42.
3. Binderman I, Duxsin D, Harell A, Katzir E, Sachs L. Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. *J Cell Biol* 1974;61:427-39.
4. Bombi JA, Ribas-Mujal D, Truetta J. An electron microscopic study of the origin of osteoblasts in implants of demineralized bone matrix. *Clin Orthop* 1978; 130: 273-84.
5. Wong GL, Cohn DV. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different: enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 72: 3167-71.

6. **Aubin JE, Heersche JNM, Merrilees MJ, Sodek J.** Isolation of bone cell clones with differences in growth, hormone responses, and extracellular matrix production. *J Cell Biol* 1982; 92: 456-61.
7. **Kodama H, Amagai Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S.** Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn J Oral Biol* 1981; 23: 899-901.
8. **Luben RA, Wong GL, Cohn DV.** Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells: provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology* 1976; 99: 526-34.
9. **Gallagher JA, Beresford JN, Sharrard M, Gowen M, Foser J, MacDonald BR et al.** Human bone cells in culture. A novel system for the investigation of osteoblast function. *Calcif Tissue Int* 1983; 35 (Suppl), A24.
10. **Williams DC, Boder GB, Toomey RE, Paul DC, Hillman CC, King KL et al.** Mineralization and metabolic response in serially passaged adult, rat bone cells. *Calcif Tissue Int* 1980; 30: 233-46.
11. **Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G.** Osteoblast isolated from mouse muscaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 1983; 96: 639-43.
12. **Ecarot-Charrier B, Shepard N, Charette G, Grynepas M, Glorieux FH.** Mineralization in osteoblast cultures: a light and electron microscopic study. *Bone* 1988; 9: 147-54.
13. **Masquelier D, Herbert B, Hauser N, Mermillod P, Schonke E, Remacle C.** Morphological characterization of osteoblast-like cell cultures isolated from newborn rat calvaria. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 92-104.
14. **Nijweide PJ, Van der Plas A, Scherft JP.** Biochemical and Histological studies on various bone cell preparations. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 529-40.
15. **Sodek J, Berkman FA.** Bone cell cultures. *Methods in Enzymol* 1987; 145: 303-24.
16. **Anderson RE, Kemp JW, Jee WS, Woodbury DM.** Ion-transporting ATPase and matrix mineralization in cultured osteoblast-like cells. *In vitro* 1984; 20: 837-46.
17. **Cotuh Y, Hiraiwa K, Nagayama M.** In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone Mineral* 1990;8:239-50.
18. **Robey PG, Termine JD.** Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 453-60.
19. **Wergedal JE, Baylink D.** Characterization of cells isolated and cultured from human bone. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 176: 60-9.
20. **Eyre DS.** Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science* 1980; 207: 15-22.
21. **Miller EJ.** Collagen chemistry. In Piez, KAS (Ed), *Extracellular matrix biochemistry*. Amsterdam: Elsevier 1984; pg.: 41-89.
22. **Ashton BA, Abdullah F, Cave J, Williamson M, Sykes BC, Couch M et al.** Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: preliminary assesment of their osteogenicity. *Bone* 1985; 6: 313-9.
23. **Majeska RJ, Rodan GA.** The effects of 1,25(OH)2D3 on alkaline phosphatase in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1982; 257: 3362-5.
24. **Piche JE, Carnes DL, Graves DT.** Initial characterisation of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989; 68: 761-7.
25. **Auf'mkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER.** Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 228-35.
26. **Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J.** Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 46-56.
27. **Kadis B, Goodson JM, Offenbacher S, Burns JW, Seibert S.** Characterization of osteoblast-like cells from fetal rat calvaria. *J Dent Res* 1980; 59: 2006-13.
28. **Whitson SW, Harrison W, Dunlap MK, Bowers DE, Fisher LW, Gheron RP et al.** Fetal bovine cells synthesize bone-specific matrix proteins. *J Cell Biol Med* 1984; 99: 318-23.
29. **Hall AK, Dickson IR.** The effects of parathyroid hormone on osteoblast-like cells from embryonic chick calvaria. *Acta Endocrinol* 1985; 108: 217-23.
30. **Majeska RJ, Rodan GA.** Culture and activity of osteoblast and osteoblast-like cells. In Butler WT (Ed) *The chemistry and biology of mineralized tissues*. Birmingham Ebsco Media, Inc 1985; pg.: 279-85.
31. **Nijweide PJ, Van Iperen-van Gent AS, Kawilarang-de Haas EWM, Van der Plas A, Wassenaar AM.** Bone formation and calcification by isolated osteoblastlike cells. *J Cell Biol* 1982; 93: 318-23.
32. **Marie PJ, Lomri A, Sabbagh A, Basle M.** Culture and behaviour of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces. *In vitro Cellular and Devel Biol* 1989; 25: 373-80.
33. **Jones SJ, Boyde A.** The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Res* 1977; 184: 179-93.
34. **Puleo DA, Molieran LA, Doremus RH, Bizios R.** Osteoblast responses to orthopaedic implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 711-23.
35. **Yang J, Nandi S.** Growth of cultured cells using collagen as substrate. *Int Rev Cytol* 1983; 81: 249-86.