

ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD CON CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS

Se han realizado estudios de biocompatibilidad de implantes dentales MPI en presencia de células osteoblásticas de osteosarcoma humano MG-63.

Se ha determinado tanto la viabilidad celular como estudios de extensión y colonización celular mediante la observación por microscopía electrónica de barrido (SEM) ^[1] y microscopía de confocal ^[2].

Los ensayos han sido realizados por la Universidad Complutense de Madrid.
Fecha de realización de los ensayos: año 2016.

ENSAYOS REALIZADOS

1. Estudios de viabilidad celular

- Muestras ensayadas:

Implante MPI, Referencia: IPHE413 – Lote: 150194.

- Descripción del ensayo:

El crecimiento celular sobre el implante se estudió mediante la adición de solución de Alamar Blue ^[3] (AbD Serotec, Oxford, UK) al 10% (v/v) a 3, 6 y 10 días, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La intensidad de absorbancia ^[4] resultante se midió a 570/600 nm en un espectrofotómetro de UV-visible Unicam UV-500.

2. Estudios por SEM

- Muestras ensayadas:

Implante MPI, Referencia: IPHE413 – Lote: 150191.

- Descripción del ensayo:

Los estudios por SEM se realizaron tras un periodo de incubación del implante con células osteoblásticas de 15 días, previa fijación con glutaraldehído al 2.5% y deshidratación gradual con disoluciones crecientes de etanol/PBS (30, 60, 80, 90 y 95%) y posterior secado en estufa de vacío durante 4 días.

La observación por SEM se realizó en microscopio de barrido de emisión de campo JEOL-JSM-6335F operando a 10 kV (Tokyo, Japan).

3. Estudios por microscopía de confocal

- Muestras ensayadas:

Implante MPI, Referencia: IPHE413 – Lote: 150191.

- Descripción del ensayo:

Para los estudios por microscopía de confocal, los implantes se han incubado con las células osteoblásticas durante 15 días.

Previo al estudio, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con DAPI y Atto 565-faloidina, con el fin de teñir los núcleos de las células y el citoesqueleto celular, respectivamente.

La observación por microscopía de confocal se realizó en un microscopio Olympus FV1200.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran una buena biocompatibilidad del implante en presencia de células osteoblásticas.

Los resultados de viabilidad celular analizados demuestran que las células se adhieren y proliferan a lo largo de todo el implante, y que este crecimiento celular aumenta con el paso del tiempo, hasta los 10 días (ver **Figura 1**).

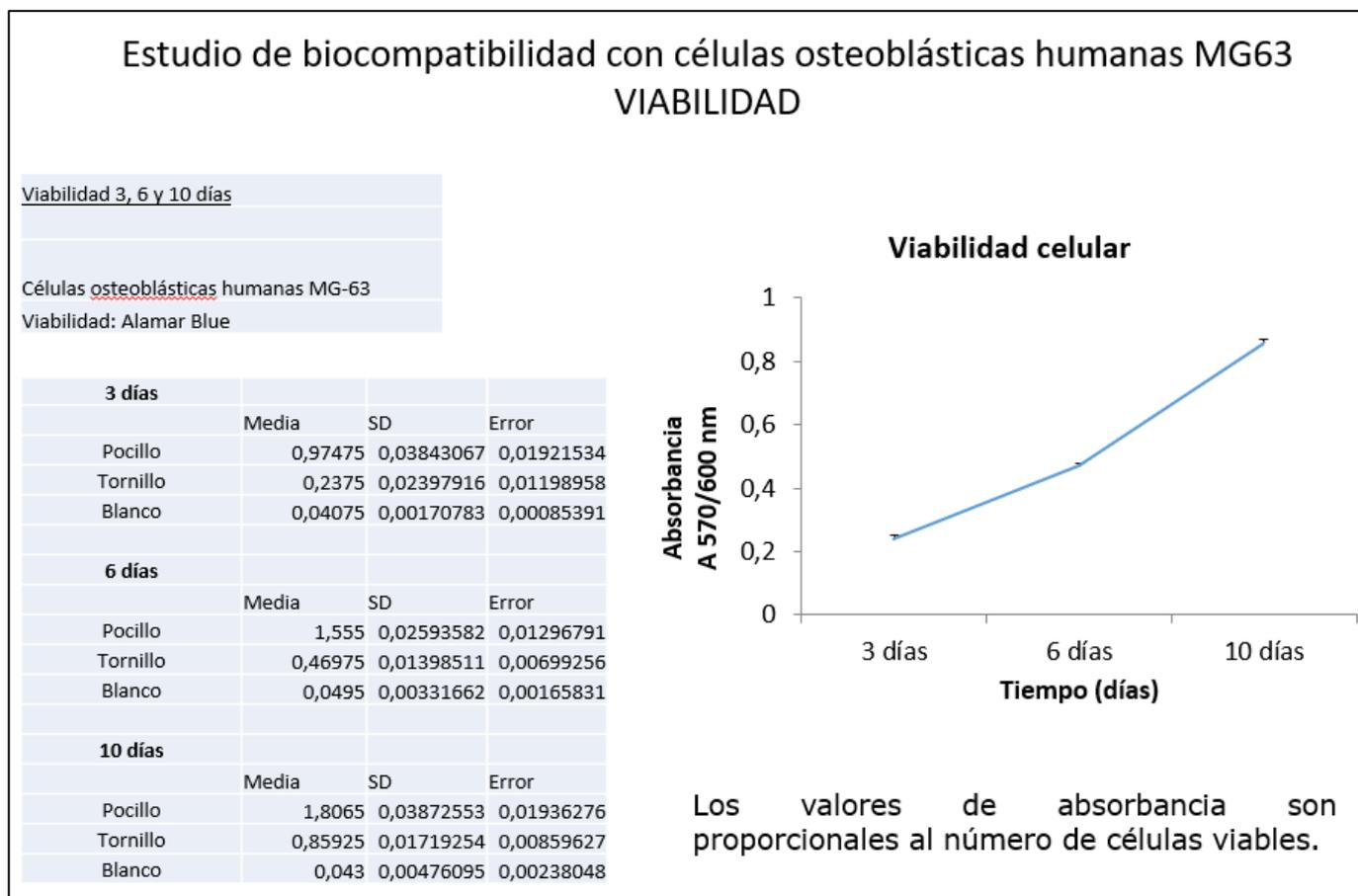


Figura 1: Estudios de viabilidad celular a 3, 6 y 10 días de las células osteoblásticas sobre la superficie del implante.

Los estudios de extensión celular y colonización del implante por SEM se realizaron en la zona rugosa del implante, mostrando una colonización total de las células en toda la superficie del implante con una adecuada extensión celular mediante la proyección de filopodios como elementos de anclaje celular (**Figura 2**).

Los estudios por microscopía de confocal confirman estos resultados, mostrando en la imagen una agrupación de células bien desarrolladas con la actina del citoesqueleto organizada en forma de haces paralelos concluyendo que las células están totalmente extendidas (**Figura 2**).

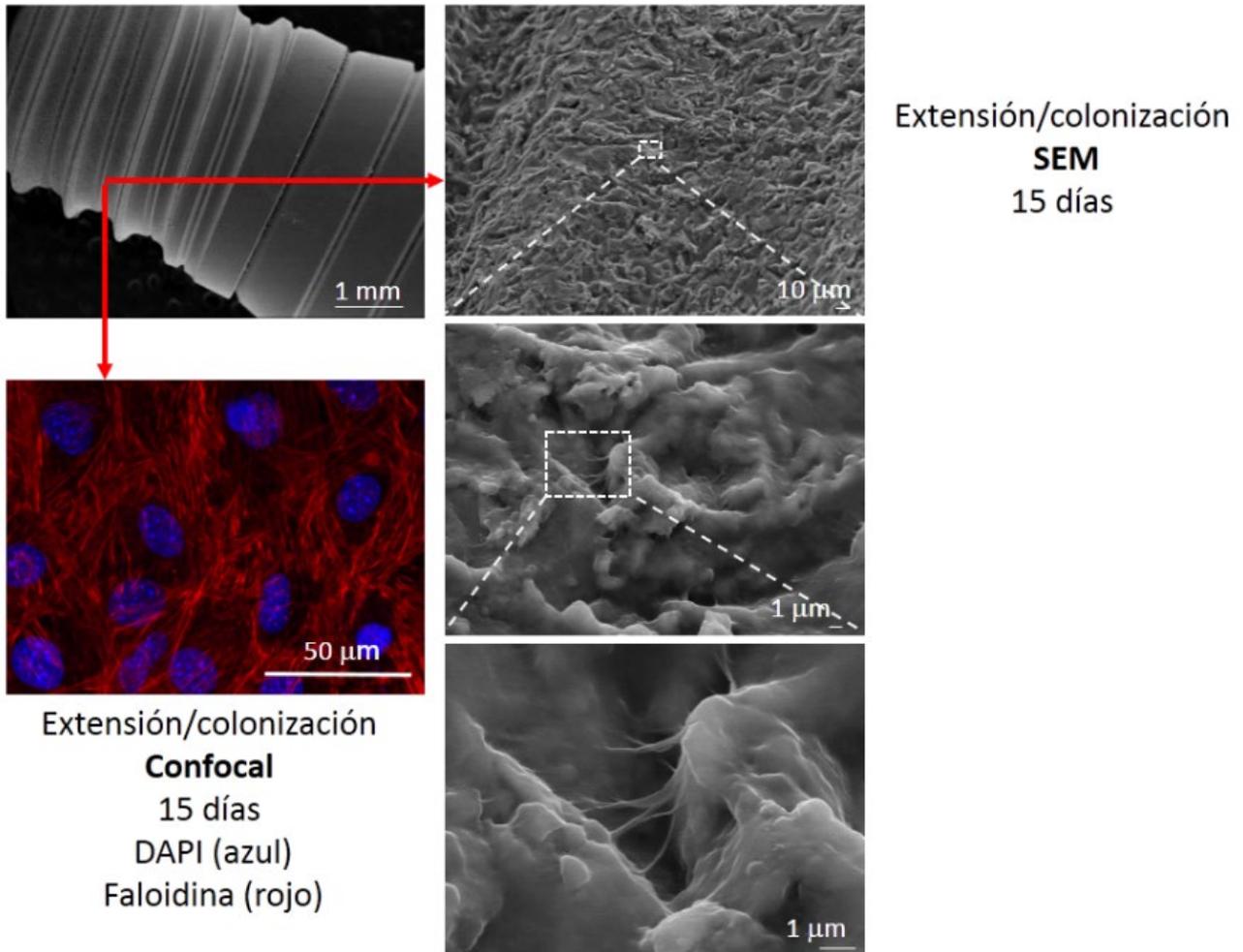


Figura 2: Estudios de extensión y colonización celular sobre la superficie del implante tras 15 días de incubación por SEM y microscopía confocal.

DEFINICIONES

[1]

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento capaz de ofrecer un variado rango de informaciones procedentes de la superficie de la muestra. Su funcionamiento se basa en barrer un haz de electrones sobre un área del tamaño que deseemos (aumentos) mientras en un monitor se visualiza la información que hayamos seleccionado.

[2]

La microscopía de confocal permite que solo observemos el plano que está situado en el punto de foco del sistema óptico eliminando, de forma óptica a través de un diafragma o "pinhole", la luz proveniente de los planos que están fuera de foco.

[3]

El Alamar Blue es un indicador redox que produce un cambio colorimétrico y una señal fluorescente en respuesta a la actividad metabólica.

Es un colorante de seguridad comprobado y no tóxico, utilizado para el análisis cuantitativo de la viabilidad celular.

[4]

La absorbancia se define como el logaritmo negativo de la transmitancia, y se observa que la absorbancia y la transmitancia tienen una relación inversa, como se muestra a continuación:

$$\text{Absorbancia} = -\log (T) = -\log (P / P_0)$$

La relación entre la absorbancia y la concentración y la absorbancia y la longitud de la trayectoria) constituyen la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon * l * c, \text{ donde:}$$

- A es un número adimensional.
- l la constante de proporcionalidad, se denomina coeficiente de extinción molar o absortividad molar, tiene unidades de litro/mol*cm.
- c tienen las unidades habituales de longitud (cm) y concentración (mol/litro).

El coeficiente de extinción (ϵ) es una constante para una sustancia dada, siempre que la temperatura y la longitud de onda son constantes. En la práctica, el coeficiente de extinción medido también depende de las características del instrumento utilizado.