

## **Estudio de diferenciación con células osteoblásticas**

Se han realizado estudios de diferenciación de los implantes IPCM413 (LOT 150234) en presencia de células osteoblásticas de osteosarcoma humano MG-63. Se ha determinado la mineralización y la actividad de fosfatasa alcalina (FA) de dichas células sobre la superficie del implante

### Mineralización

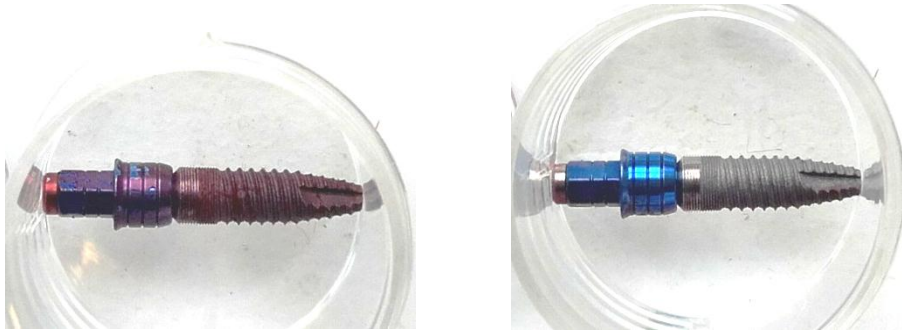
Para determinar la mineralización en el implante se utilizó la tinción de rojo de alizarina, a los 15 días de cultivo. Las células se fijaron con etanol 70% durante 1 hora y, a continuación, se añadió rojo de alizarina 40 mM, pH 4.2, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células con PBS, la tinción se eluyó con cloruro de cetilpiridinio al 10% en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, midiendo la absorbancia a 620 nm.

### Actividad de FA

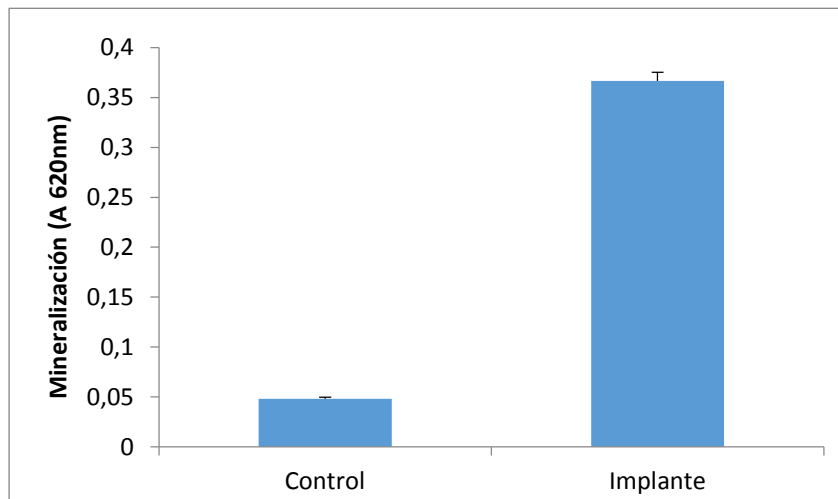
La actividad de FA se analizó en extractos de proteína celular obtenidos con Triton X-100 al 1% utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato, a los 5 días de cultivo. Una unidad de actividad enzimática fue definida como nmoles de p-nitrofenol/min. La actividad de FA se normalizó con el contenido de proteína total determinada con el método de Bradford, utilizando ASB como estándar (Pierce, Rockford, IL).

## **Resultados**

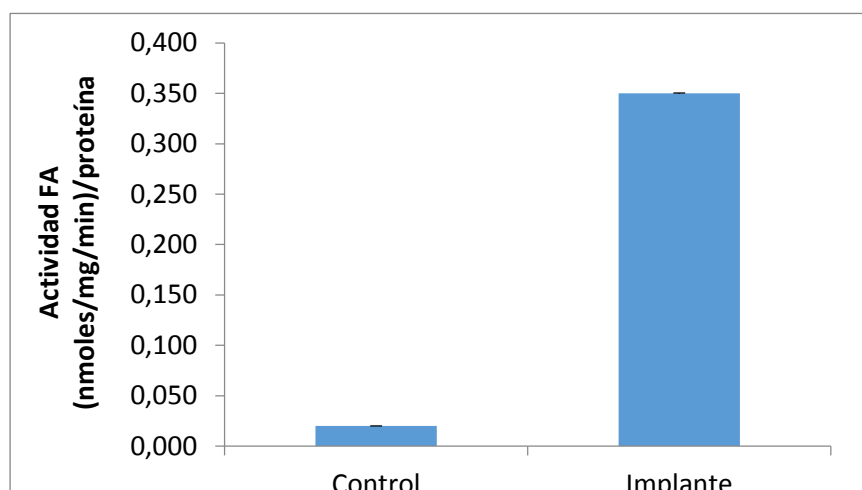
Cómo se puede observar en la imagen de la izquierda, en rojo (tinción rojo de alizarina), puede verse casi toda la superficie del implante colonizada por osteoblastos que han mineralizado. La imagen de la derecha es de la parte inferior del implante, que no ha estado en contacto con células, y que no se ha teñido por lo tanto.



Dicha tinción se eluyó con cloruro de cetilpiridinio al 10% en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, y medimos la absorbancia a 620 nm. Los valores están representados en la siguiente figura (el control es el valor del implante sin células):



También analizamos la actividad de FA en extractos de proteína celular obtenidos del implante. Los valores están representados en la siguiente figura (el control es el valor del implante sin células):



## **Conclusión**

Las células osteoblásticas de osteosarcoma humano MG-63 se diferencian y mineralizan a los 15 días de cultivo sobre los implantes IPCM413 (LOT 150234). De la misma forma, dichas células producen la enzima de fosfatasa alcalina que media una fase de mineralización más lenta, hidrolizando fosfato orgánico y dando lugar a fosfato inorgánico, necesario para la mineralización de la matriz.