

# Evaluación de la citotoxicidad del implante dental AVINENT

## OBJETIVO

Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de implantes dentales AVINENT.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de citotoxicidad se engloban dentro de los estudios de biocompatibilidad de un material. Los ensayos a realizar para la evaluación de la citotoxicidad están muy regulados, por lo que han sido unificados por la FDA en los Estados Unidos y en Europa siguiendo la norma ISO 10993.

El método utilizado para determinar la citotoxicidad de la superficie de los nuevos implantes dentales AVINENT fue el ensayo de citotoxicidad *in vitro* por contacto directo descrito en la norma ISO 10993-5:1999.

### Cultivo celular

Para realizar los ensayos se utilizaron células provenientes de la línea celular MG63, que está formada por células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico, las cuales son ampliamente utilizadas en los estudios biológicos. Para el cultivo, inicialmente se colocaron las células en placas de cultivo junto con 15 ml de medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Medium, Gibco) sin rojo fenol, el cual fue suplementado previamente con un 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), un 1% de penicilina/estreptomicina, un 1% de piruvato y un 1% de  $\alpha$ -L-glutamina, todos Sigma. Las células se mantuvieron a 37° C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días.

Para el traspase de las células del frasco de cultivo a la superficie de los materiales se llevó a cabo el procedimiento descrito a continuación.

Para la realización del subcultivo, es decir, el traspaso de las células a los pocillos con los materiales a ensayar, se procedió a lavar las monocapas celulares con una solución salina tamponada PBS (Phosphate Buffered Saline) y luego fueron tripsinizadas con tripsina-EDTA (Ethylene-dinitrilo tetraacetic acid) durante cinco minutos a 37° C para separarlas de la placa. La tripsina es una enzima proteolítica que actúa degradando las proteínas que sirven de unión entre las cé-

Documento elaborado por el **comité científico de AVINENT Implant System S.L.** <sup>(1)</sup> con la colaboración del **CREB** (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) <sup>(2)</sup> y el **CTM** (Centre Tecnològic) <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> **Comité científico de AVINENT Implant System S.L.:** A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

<sup>(2)</sup> **CREB:** A. Mestre

<sup>(3)</sup> **CTM:** J. Caro, M<sup>a</sup> D. Riera, J. M. Prado



**Figura 1.** Muestras en medio de cultivo.

lulas de cultivo. Una vez tripsinizadas, se procedió a añadir medio completo para neutralizar la reacción de tripsinización. Luego se concentraron las células mediante centrifugación para eliminar así la tripsina y añadir nuevo medio. Las células fueron resuspendidas y contabilizadas por medio de un hematocitómetro. Partiendo del número de células totales, se realizaron las diluciones necesarias para obtener la cantidad de células por pozo deseada.

Los estudios de citotoxicidad se realizaron en la sala de cultivos del Parc Científic de Barcelona. En este lugar de trabajo es de gran importancia que el ambiente se mantenga estéril.

Los estudios se realizaron con muestras de Ti grado médico, cilíndricas de 5.5 mm de diámetro y 2 mm de espesor con superficie AVINENT, seleccionando distintas condiciones de tratamiento superficial. También se introdujeron en el análisis muestras de Ti grado médico liso sin tratar y muestras control. Estas muestras fueron esterilizadas previamente para eliminar todo tipo de microorganismos y así conseguir un medio adecuado para el cultivo de células.

### Ensayo de citotoxicidad

Se realizó el ensayo de citotoxicidad por contacto directo.

Para la evaluación de la citotoxicidad de los materiales se utilizó la prueba WST (Roche). La WST es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) la cual es transformada en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán producida durante el ensayo, que se evalúa mediante medidas de absorbancia en un espectrofotómetro, está relacionada con el número de células viables, es decir, el número de células metabólicamente activas dentro del cultivo.

En el caso de este proyecto se partió de células de osteoblastos congeladas de la serie MG63.3. Se decidió utilizar este tipo de células porque, aunque la norma ISO 10993 estipula que se utilice otro tipo de células, los implantes van a estar en contacto directo con el hueso de la mandíbula y serán recubiertos por el mismo. Por eso se creyó más conveniente la utilización de células osteoblásticas humanas.

# Evaluación de la citotoxicidad del implante dental AVINENT

## Análisis de citotoxicidad

Cuando ya se han obtenido los extractos del material en contacto con el medio de cultivo a 24, 48 y 72 horas se puede proceder al estudio de su citotoxicidad. El primer paso consiste en el tratamiento de las células que se encuentran en la incubadora.

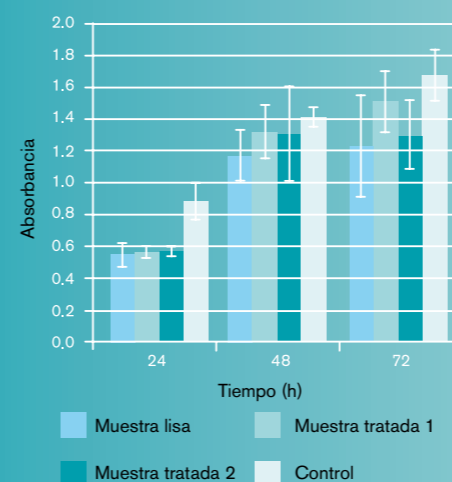
Antes de iniciar el estudio de citotoxicidad, los discos metálicos fueron esterilizados, se colocaron los discos en una placa de 40 pocillos con 100 ml de medio de cultivo por pocillo y se incubó durante 12 horas.

La técnica utilizada para el estudio de citotoxicidad se basa en el siguiente proceso: Después de 24, 48 y 72 h de cultivo se introducen 30  $\mu$ l de WST, que es una sal de tetrazolio, en los pozos que contienen 300  $\mu$ l de medio de cultivo con las células. Debido a la actividad de las deshidrogenasas del mitocondrio celular se produce la rotura de un enlace en esta molécula para dar formazán. Para conseguir un buen nivel de reacción se deja incubar el conjunto durante una hora. Después de ese tiempo se ha producido un cambio de color que se puede medir utilizando un espectrofotómetro modelo PowerWaveX de Bio-Tek Instruments de una longitud de onda de de 450 nm.

Se introducen los parámetros de trabajo utilizando el programa KCJunior. Un número mayor de células provoca una mayor actividad de deshidrogenasas y por lo tanto una concentración mayor de formazán. Este producto provoca un aumento de absorbancia de la muestra en la longitud de onda de trabajo (450 nm), por lo que se verá una disminución clara de ésta con el tiempo si el recubrimiento es citotóxico. La muerte de las células implica una menor actividad y una menor absorbancia de la muestra.

## RESULTADOS

Una vez se han realizado las diluciones para obtener una recta patrón y se han incubado las células durante una hora con el reactivo WST-1, se puede proceder a realizar la lectura de la absorbancia. Los resultados de las absorbancias para los ensayos de WST en contacto directo con las muestras y para los controles se muestran en la figura 2. Los análisis se realizan por triplicado para po-



**Figura 2.** Resultados del ensayo WST en contacto directo con los cilindros después de 24, 48 y 72 horas (n=3).

der evaluar si se debe despreciar algún valor en caso de que se produzca disparidad de resultados.

## CONCLUSIONES

El recubrimiento del material no es citotóxico, ya que no se produce la muerte celular como en el caso del control positivo de citotoxicidad. Esto se ve en los valores de absorbancia encontrados. Este razonamiento es válido para los extractos de 24, 48 y 72 horas.

Se ha producido proliferación celular en los dos casos, ya que las células en contacto con los extractos han aumentado con el tiempo de incubación.

Si se comparan los resultados de actividad celular de las células en contacto con los extractos y los del control negativo de citotoxicidad se puede ver que la proliferación no llega al mismo nivel. Esto se muestra de forma más clara en el caso de la incubación a las 72 horas en la figura 2.

Al comparar los resultados de absorbancia entre las muestras lisas y tratadas se puede ver una mejora en la proliferación celular en las muestras tratadas con la superficie AVINENT. No se puede concluir que haya diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular entre las muestras tratadas 1 y 2.

En resumen, a partir de los ensayos realizados se puede llegar a la conclusión que la superficie del implante dental AVINENT no es citotóxica y mejora la proliferación celular osteoblástica.

## REFERENCIAS

[1] Norma española UNE-EN ISO 10993-5. Evaluación biológica de productos sanitarios Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

[2] *Cell counting and dye exclusion viability assays using a hemacytometer*. Tech Note. Nalge Nunc International Corp. Vol. 3 (25), 2000.