

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

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

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

⁽²⁾ **CREB:** A. Mestre

⁽³⁾ **CTM:** J. Caro, M^a D. Riera, J. M. Prado

OBJETIVO

Determinar la respuesta celular *in vitro* de los implantes AVINENT de Ti grado médico, la morfología celular y la evaluación de la proliferación y diferenciación celular.

La superficie AVINENT es el resultado de una serie de investigaciones científicas sobre características superficiales en implantes dentales con el propósito de obtener la mejor respuesta biológica posible. En concreto, la superficie AVINENT se obtiene gracias a la combinación de un proceso de *shot-blasting* seguido de un proceso de tratamiento electroquímico. El proceso de *shot-blasting* (impacto de partícula) dota a la superficie del implante de una rugosidad estructural óptima. Posteriormente, el proceso electroquímico (anodizado) modifica la microtopografía superficial provocando una porosidad en el óxido de titanio y permite, al mismo tiempo, incorporar elementos químicos (calcio y fósforo) que confieren a la superficie final unas propiedades totalmente biomiméticas.

INTRODUCCIÓN

La morfología de la superficie de un implante, incluyendo la microtopografía y la rugosidad, está íntimamente relacionada con el éxito del proceso de fijación ósea. También el proceso de fabricación utilizado para proporcionar una determinada textura superficial al implante puede introducir cambios químicos en la superficie que también tendrán su influencia en el buen comportamiento clínico. Actualmente, los implantes de titanio y sus aleaciones para uso clínico presentan variaciones respecto a la rugosidad superficial y la composición química, siempre partiendo de la premisa de que el hueso se forma más rápidamente en superficies rugosas que en superficies lisas o pulidas, que son más susceptibles a la formación de tejido conectivo fibroso [1].

Estudios realizados *in vitro* han permitido evaluar el comportamiento de determinadas líneas celulares ante las variaciones de algunas propiedades superficiales, demostrando que la rugosidad superficial afecta a la respuesta celular. En particular, las células osteoblásticas tienden a adherirse más rápido en superficies rugosas [4, 5 y 6].

La diferenciación celular también es mayor en superficies rugosas cuando se evalúan parámetros como la morfología celular, la producción de matriz extracelular, la actividad específica de fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina [1].

La fosfatasa alcalina es un enzima, que se encuentra generalmente adherido a la superficie extracelular de la membrana celular mediante un anclaje a través del terminal carboxilo del fosfatidilinositol-glicano. Existen en forma general dos tipos de fosfatasa alcalina codificadas por cuatro genes diferentes. El primer tipo está constituido por la fosfatasa tejido-dependiente, expresada en el intestino y placenta madura. El segundo tipo de fosfatasa no dependiente del tejido (*tissue non-specific*) se expresa en numerosos tejidos, incluyendo principalmente hueso, hígado y riñones. La fosfatasa alcalina es un indicador precoz de la diferenciación osteoblástica y juega un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular. La función de la fosfatasa alcalina es hidrolizar el fósforo orgánico y liberar fósforo inorgánico para la formación de la hidroxiapatita del hueso. Este enzima es indispensable para la formación del hueso, y su secreción o actividad indica la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación [2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

En el presente estudio se han empleado dos tipos de muestras: lisas y tratadas con superficie AVINENT. Ambas obtenidas a partir de discos de Ti grado médico de 10 mm de diámetro y 2 mm de espesor.

Los discos lisos se prepararon puliéndolos inicialmente con papeles de carburo de silicio y posteriormente con óxido de aluminio, con un tamaño de partícula de 1 µm y 0.05 µm. Una vez pulidos los discos fueron lavados con acetona en ultrasonidos.

Seguidamente los discos tratados con superficie AVINENT también fueron lavados en ultrasonidos.

Todas las muestras utilizadas en este estudio fueron esterilizadas mediante radiación gamma a una intensidad de 25 kGy, y fueron colocadas en placas de poliestireno de 24 pozos.

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

Cultivo celular

Para realizar el presente estudio se utilizaron osteoblastos humanos de la línea celular MG63. Las células fueron colocadas en placas de cultivo, con 15 ml de medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Medium, Gibco) añadiendo un 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), un 1% de penicilina/estreptomina, un 1% de piruvato y un 1% de L-glutamina (todos Gibco). Las células se mantuvieron a 37° C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cada tres días. Al realizar la cuarta renovación las células fueron lavadas con tampón fosfato (PBS) y trypsinizadas con Trypsin-EDTA (0.25%) en un incubador durante cinco minutos a 37° C.

Morfología celular

Para determinar la variación en la morfología celular en función de la topografía, los cultivos se examinaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (Strata DB 235, FEI Company).

Después de 24 horas de incubación el medio de cultivo se retiró, las muestras se lavaron tres veces con solución tampón fosfato (PBS) y las células se fijaron mediante OsO₄ (1%) en PBS (0.1 M) durante 15-30 minutos. Las muestras fueron deshidratadas mediante la inmersión sucesiva en distintas soluciones de alcohol ter-butílico (50, 75, 90 y 100%). El alcohol se retiró durante la etapa de punto crítico.

Proliferación

La proliferación celular fue cuantificada mediante el ensayo WST (Roche, Alemania). Se cultivaron 10.000 células con 300 µl de DMEM en cada uno de los pozos de cultivo donde se habían colocado las muestras y discos de poliestireno como control positivo. Después de 1,3 y 7 días las células fueron lavadas con PBS y 200 µl de solución de 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 me-

tabólicamente activas dentro del cultivo. Para conseguir un buen nivel de reacción se dejó incubar el conjunto durante una hora. Después de ese tiempo se produjo un cambio de color que se pudo medir utilizando un espectrofotómetro modelo PowerWaveX de Bio-Tek Instruments con una longitud de onda de 450 nm.

Diferenciación

Para realizar los ensayos de diferenciación celular se añadieron 100.000 células en cada uno de los pozos. El medio de cultivo fue suplementado con 50mM de ácido ascórbico (Sigma) y 10⁻⁸ mM de dexametasona (Sigma); 3 µl de cada uno de los suplementos fueron añadidos en cada pozo durante 48 horas. El líquido sobrenadante de cada uno de los pozos fue recogido y congelado a -80° C. Los discos fueron lavados dos veces con PBS (Phosphate Buffered Solution) y se empleó M-PER® (Pierce, USA) para lisar las células. El lisado celular fue congelado a -80° C.

El lisado celular obtenido de las distintas muestras fue descongelado para cuantificar la proteína total y la actividad de la fosfatasa alcalina presente en las células. Para la cuantificación de la proteína total se empleó el ensayo BCA (Pierce, USA) según el protocolo especificado por el fabricante. Para realizar el ensayo, se añadieron 25 µl de muestra a 200 µl de reactivo de trabajo en una placa de 96 pozos. La placa fue incubada a 37° C durante 30 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Finalmente se obtuvieron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Para la obtención de la curva de calibrado, se prepararon varias diluciones de BSA (Bovine Serum Albumin) de 0 a 2000 µg/ml.

Para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, se añadió en cada pozo 100 µl de cada muestra, 50 µl de solución tampón AMP (0.5M 2-aminoetil-1-propanol, 2 mM MgCl₂) y 50 µl de solución sustrato (10 mM p-nitrofenilfosfato). Para la determinación de la curva de calibrado se prepararon varias diluciones de p-nitrofenol con un rango de concentración de 2·10⁻⁵-2,4·10⁻⁴. La placa de 96 pozos se incubó a 37° C durante 30 minutos. La reacción se paró con la adición de 100 µl de NaOH 3M. Finalmente se realizaron las medidas espectrofotométricas a 405 nm.

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

RESULTADOS

Morfología celular

Los osteoblastos cultivados en los discos lisos de Ti grado médico presentaron una conformación extendida con íntimo contacto con el material después de 24 horas de cultivo. Se observó una débil actividad dorsal, con cortas extensiones citoplasmáticas (filopodios) indicando una baja actividad de desarrollo fenotípico (fig. 2, 3 y 4).

Los osteoblastos cultivados en los discos con superficie AVINENT presentaban una morfología significativamente distinta a la obtenida sobre el sustrato pulido. Los osteoblastos sobre la superficie tratada AVINENT eran células compactas y extendidas, que mostraban abundantes filopodios íntimamente adheridos a la superficie tratada. Esta alta actividad dorsal indica un elevado desarrollo fenotípico. También se observó una tendencia en el posicionamiento de las células en los valles de la superficie adaptando el citoesqueleto a las irregularidades topográficas (fig. 5, 6 y 7). La rugosidad de la superficie condiciona la morfología celular y la posición de las mismas.

Ensayo de proliferación celular

Los resultados indicaron el buen comportamiento *in vitro* de la superficie tratada AVINENT, ya que ofrecía niveles de proliferación semejantes al control positivo y a las muestras lisas en los cuatro tiempos estudiados, poniendo de manifiesto su citocompatibilidad.

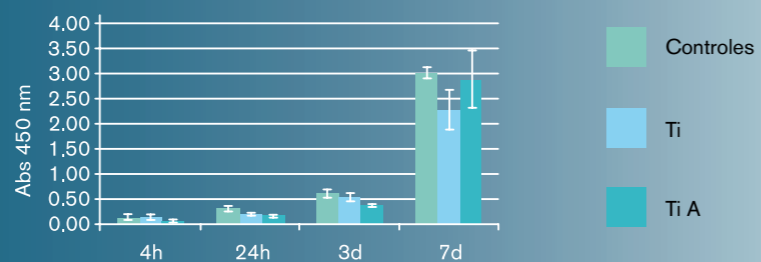


Figura 1. Resultados de proliferación celular. Ti: discos pulidos, y Ti A: discos tratados.



Figura 2. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre titanio liso después de 24 horas de incubación. Se observa la morfología plana de los osteoblastos.



Figura 5. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre la superficie AVINENT después de 24 horas de incubación.



Figura 3. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre titanio liso después de 24 horas de incubación. Se observa una morfología plana de los osteoblastos.



Figura 6. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre la superficie AVINENT después de 24 horas de incubación. Se observa la presencia de extensiones citoplasmáticas (filopodios) en el dorso celular.



Figura 4. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre titanio liso después de 24 horas de incubación. Se observa la presencia de pequeñas extensiones citoplasmáticas (filopodios) en el dorso celular.



Figura 7. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre la superficie AVINENT después de 24 horas de incubación. Se observa la presencia de extensiones citoplasmáticas (filopodios) en el dorso celular.

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

Ensayos de diferenciación

Los resultados referentes a la diferenciación de los osteoblastos sobre las dos superficies estudiadas (pulidas y tratadas) se exponen en la figura 8. En ella se puede observar que hay una mayor producción de fosfatasa alcalina en los discos tratados con superficie AVINENT que en los pulidos.

La adición de vitamina 1, 25-(OH)₂D₃ provocó un incremento sinérgico en la producción de fosfatasa alcalina en las muestras tratadas.

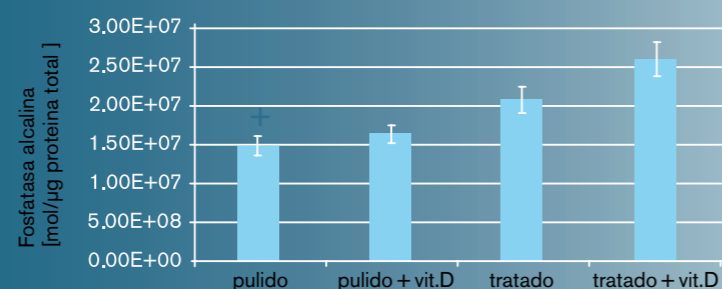


Figura 8. Resultados de producción de fosfatasa alcalina.

DISCUSIÓN

El estudio morfológico mostró variaciones entre las muestras lisas y tratadas en la morfología de los osteoblastos después de 24 horas de incubación. En las superficies lisas las células presentaban una morfología fibroblástica plana con una débil actividad dorsal. Esta configuración extendida reduce la probabilidad de que la célula exprese fenotipos osteoblásticos, ya que estas células se caracterizan por tener una morfología columnar en su fase de secreción *in vivo*. En cambio, en las muestras tratadas los osteoblastos se anclaban a la superficie por medio de contactos focales entre las extensiones citoplasmáticas y los múltiples picos de la topografía. Esto fuerza a la célula a presentar una morfología más osteoblástica con una mayor actividad dorsal.

Las observaciones realizadas en el estudio morfológico fueron corroboradas por los resultados de diferenciación celular. Se observaron mayores concentraciones de fosfatasa alcalina por microgramo de proteína total en los discos tra-

tados, indicando una mayor expresión fenotípica de los osteoblastos en la superficie AVINENT.

Los resultados de proliferación celular pusieron de manifiesto el buen comportamiento *in vitro* de la superficie tratada indicando la adecuada citocompatibilidad del material.

REFERENCIAS

- [1] Lincks, J.; B. D. Boyan; C. R. Blanchard; C. H. Lohmann; Y. Liu; D. L. Cochran; D. D. Dean; Z. Schwartz. *Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent to surface roughness and composition*. *Biomaterials* 19 (1998), 2219-2232.
- [2] Boyan, Barbara D.; Christoph, H. Lohmann; David D. Dean; Victor L. Sylvia; David L. Cochran; Zvi Schwartz. *Mechanisms Involved in Osteoblast Response to Implant Surface Morphology*. *Annu. Rev. Mater. Res.* (2001), p. 357-371.
- [3] Lian, J. B.; G. S. Stein. *Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation*. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 3 (1992), 269-305.
- [4] Bowers, K. T.; J. C. Keller; B. A. Randolph; D. G. Wick; C. M. Michaels. *Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro*. *Int. J. Oral Maxillofac Implants* 7 (1992), 302-310.
- [5] Martin, J. Y.; Z. Schwartz; T. W. Hummert; D. M. Schraub; J. Simpson; J. Lankford; D. D. Dean; D. L. Cochran; B. D. Boyan. *Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)*. *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995), 389-401.
- [6] Deligianni, D. D.; N. Katsala; S. Iadas; D. Sotiripoulou; J. Amedee; Y. F. Missirilis. *Effect of surface roughness of titanium alloy Ti-6Al-4V on human marrow cell response and on protein absorption*. *Biomaterials* 22 (2001), 1241-1251.