

DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DEL HUESO HUMANO A PARTIR DE TAGUA VEGETAL. Ensayos de Biocompatibilidad in vitro

Walter Pardavé, Angélica Plazas y Rosa Delia Torres¹

RESUMEN

El presente trabajo trata sobre el desarrollo a escala real, de un prototipo de una clavícula a partir de tagua vegetal, el cual fue sometido a pruebas mecánicas y ensayos de biocompatibilidad in vitro, en esta parte del trabajo se enfatiza los ensayos de biocompatibilidad realizados.

La biocompatibilidad de un biomaterial depende de diversos factores tales como sus características superficiales, su composición estructural y los recubrimientos utilizados sobre ellos.

El análisis de la biocompatibilidad del biomaterial a partir de tagua vegetal se desarrolló mediante ensayos in vitro utilizando cultivos de la línea celular HOS procedente de osteosarcoma humano, las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal de la tagua. Se sometieron probetas del biomaterial para evaluar la proliferación celular mediante conteo microscópico en cámara de Neubauer a diferentes tiempos; concentraciones diferentes de polvo de hueso permitieron evaluar la citotoxicidad por adición de MTT y lectura en espectrofotómetro; además se incluyó una prueba de adhesión y morfología celular a diferentes tiempos por microscopía de epifluorescencia.

Los resultados indican que la tagua vegetal no favorece la proliferación celular, la citotoxicidad que presenta el biomaterial es de grado 3 y reactividad moderada, solo se presenta adhesión sobre la probeta a 24 horas y en cuanto a la morfología no es posible hacer una valoración cuantitativa, ya que en el número de células presentes solo es posible visualizar el núcleo.

Palabras clave: Clavícula, Tagua Vegetal, Biocompatibilidad, células HOS, citotoxicidad.

SUMMARY

This paper deals with the scale development of a prototype of a clavicle from tagua plant, which was subjected to mechanical testing and in vitro biocompatibility tests in this part of the work emphasizes the biocompatibility tests performed.

The biocompatibility of a biomaterial depends on various factors such as their surface characteristics, its structural composition and the coatings used on them.

The analysis of the biocompatibility of the biomaterial from tagua plant developed by in vitro assays using cultured cell line HOS from human osteosarcoma cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal of tagua. Biomaterial samples were subjected to evaluate cell proliferation by microscopic counting in a Neubauer chamber at different times, different concentrations of bone powder allowed to evaluate the cytotoxicity by the addition of MTT and reading in spectrophotometer; also included a test cell adhesion and morphology at different times by epifluorescence microscopy.

The results indicate that the plant does not favor tagua cell proliferation, cytotoxicity presenting the biomaterial is of grade 3 and moderate reactivity, adhesion occurs only on the specimen to 24 hours and in terms of morphology is not possible to make a quantitative assessment, since the number of cells present is only possible to view the core.

Keywords: Clavicle, Tagua Plant, Biocompatibility, HOS cells, cytotoxicity.

I. INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica para el tratamiento de enfermedades degenerativas y fracturas con pérdida de fragmentos óseos grandes, existe demanda de la producción de materiales substitutivos, para lo cual se han utilizado con éxito materiales autólogos o alogénicos, pero su uso es limitado debido a su baja disponibilidad, la alta unmunogenicidad y la morbilidad de las zonas del cuerpo utilizadas como donantes de tejido.

Se han estudiado gran variedad de materiales construidos en polímeros naturales y sintéticos, encontrándose algunos con buen potencial, los cuales tienen excelentes propiedades de biocompatibilidad y bioactividad, al igual que algunos materiales metálicos, cerámicos y biovidrios. Sin embargo, ninguno de éstos reúne todas las características adecuadas, especialmente en lo pertinente a sus propiedades mecánicas y estructurales que les permitan ser utilizados con éxito en las aplicaciones de la ingeniería de tejido óseo.

En esta parte del proyecto se evaluó el desempeño biológico in vitro del biomaterial obtenido a nivel de laboratorio, a partir de tagua vegetal; mediante ensayos de proliferación celular, citotoxicidad y, adhesión y morfología celular.

II. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Elaboración de especímenes (probetas)

Tal como lo muestra en la figura 1, la primera fase trata sobre la preparación de las probetas, para las cuales se tuvo en cuenta la norma ISO 10993-5:1999 que contempla los requisitos para la evaluación biológica de productos sanitarios en lo que hace referencia a ensayos in vitro.

Fue necesario elaborar previamente moldes en madera, que sirven como copias para la elaboración de los negativos en yeso tipo II; posteriormente se mezcla el polvo de tagua vegetal con el aglutinante denominado *all ceram*, ésta mezcla es colocada en el negativo de yeso y se lleva al horno odontológico en el cual alcanza una temperatura aproximada de 865°C durante 2 horas, hasta la fusión. Las probetas logradas son esterilizadas en autoclave, con peróxido de hidrogeno durante 2 horas para eliminar posibles agentes contaminantes que pueden interferir en los resultados de los ensayos al estar en contacto con cultivos celulares.

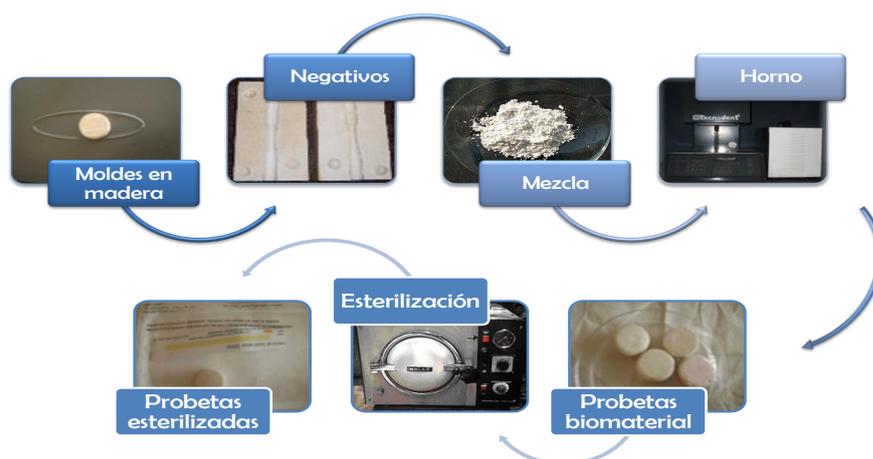


Figura 1. Esquema general para la elaboración de las probetas

2.2 Cultivo celular

Para realizar el presente estudio se utilizaron osteoblastos humanos de la línea celular HOS (ATCC CRL-1543) procedentes de osteosarcoma celular humano. Las células fueron colocadas en placas de cultivo con 15 ml de medio de cultivo RPMI-1640, añadiendo un 10% de suero fetal de tagua vegetal inactivado (SBFi), un 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se mantuvieron a 37°C en un

incubador bajo una atmósfera con 5% CO₂ y 95% de aire. El medio de cultivo se cambió cada tres días.

2.3 Ensayo de proliferación celular

En una placa de cultivo de 12 pozos se colocaron probetas de tagua vegetal pulverizado una en cada uno de ellos que permitieron realizar conteo celular durante 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente; como controles se utilizaron placas de vidrio en las cuales esta comprobado el crecimiento celular óptimo. A cada pozo se añadió 0.123 mL de solución de células HOS.

En cada uno de los tiempos en los que se evaluó la proliferación celular se procedió a: retirar las probetas del pozo de cultivo y el medio excedente, utilizando 500 µL de tripsina EDTA se disocian las células y se incuba la placa por 10 minutos.

El conteo microscópico se realizó en la cámara de Neubauer, para las probetas control se utilizó dilución en eosina amarilla 0.25% de buffer salino-fosfato (PBS) y para las probetas de tagua vegetal pulverizada no se hizo la dilución.

2.4 Toxicidad celular

Células HOS en fase exponencial de crecimiento, fueron colocadas en una placa de cultivo de 96 pozos, 2.5 x 10⁴ células por pozo; se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia.

La distribución de las muestras en la placa se observa en la figura 2.

Se añadió 111µL de la dilución 1:2 de tagua vegetal pulverizada por pozo iniciando con una concentración de 1000µg/mL; se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir que la sustancia actúe en todas las células en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo.

Pasado este tiempo se descarta el medio RPMI suplementado y se añade medio RPMI sin suplementar con suero, posteriormente se añadió 50µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en solución tampón libre de calcio y magnesio.

Nuevamente se incubó la placa por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán. Una vez formados éstos, se elimina el sobrenadante y se añade dimetilsulfoxido (DMSO); se deja los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazan están solubilizados. La figura 2 muestra el esquema general de este ensayo.

La densidad óptica (OD) de cada pozo fue medida utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas con una longitud de onda de 580 nm. El porcentaje de muerte celular fue calculado usando la ecuación:

$$(\%) = 1 - \frac{OD \text{ células tratadas}}{OD \text{ células control}} \times 100 \quad (1)$$

La actividad citotóxica de los iones fue calculada utilizando análisis de regresión sigmoideal y fue expresada como dosis letal CC, que es la dosis capaz de matar el 50% (CC₅₀) o el 90% (CC₉₀).

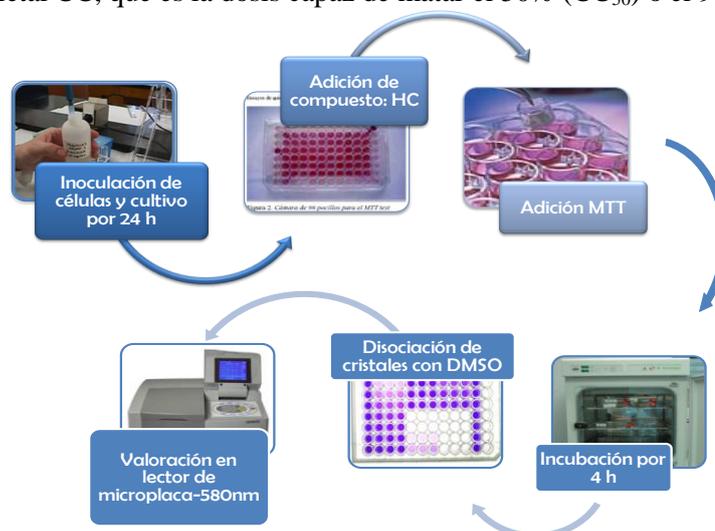


Figura 2. Procedimiento del Ensayo de citotoxicidad



Figura 3. Procedimiento del ensayo de morfología celular

2.5 Adhesión y morfología celular

La evaluación de la adhesión y morfología celular se llevó a cabo mediante microscopía de epifluorescencia.

Se colocaron 3×10^4 células (cantidad específica, obtenida por el tamaño de las probetas y la cantidad de células en fase de crecimiento) sobre cada una de las superficies de las probetas de tagua vegetal pulverizado y laminillas de vidrio como control. Las células fueron incubadas durante 24 y 96 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire. Las células fueron desprendidas y contadas microscópicamente. Para cada tiempo se utilizó una única probeta.

El procedimiento para cada tiempo consistió en retirar el medio de cultivo, realizar dos lavados con PBS $\text{pH}=7.2$ y adicionar $15 \mu\text{M}$ de protoporfirina IX por 1 hora para marcar el citoplasma y posteriormente $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de Hoechs 33342 por 5 minutos para marcar el núcleo.

Las probetas fueron fijadas utilizando formol al 3.7% y examinadas en microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E400) utilizando filtro UV2A ($\text{Ex}=330\text{-}380$, $\text{DM}=400$, $\text{BA}=420$). La figura 3 muestra el esquema general del ensayo de morfología celular.

2.6 Programa procesamiento de imágenes

Los resultados obtenidos de la prueba de adhesión y morfología celular, fueron evidenciados en imágenes de los controles del ensayo, donde hay evidencia de células adheridas a las probetas; los cuales fueron procesados mediante el programa Matlab 6.5 que permite conocer algunas características relevantes de la morfología celular de los osteoblastos (ver figura 4).



Figura 4. Vista de una ventana del programa de procesamiento de imágenes

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Proliferación celular

En la prueba en la que se midió la proliferación celular de las células HOS sobre probetas de tagua vegetal pulverizada y laminillas de vidrio como control, se obtuvo como resultados que en los conteos realizados durante 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente, como lo indican la figura 5, solo se registro el conteo de 1 célula en cámara de Neubauer a las 72 horas que es representativa de la presencia de 2500 células; en los demás tiempos no se encontró célula alguna (ver figura 5).

Por el contrario, en las laminillas de control como lo indica la figura 4 tienen una curva de crecimiento considerable y se registran conteos ascendentes para cada uno de los tiempos.

3.2 Toxicidad celular

La concentración de tagua vegetal pulverizada a la cual no es tóxico para las células es de 3,90625 µg/mL, ya que en ésta se presentan datos poco significativos de porcentaje de muerte celular. Las dosis o concentraciones letales con las cuales se presenta la muerte de 50 y 90% de células HOS para el caso de la tagua vegetal pulverizada son $CC_{50} = 152.75 \mu\text{g/mL}$ y $CC_{90} = 840.99 \mu\text{g/mL}$. En el caso del compuesto control, el vanadio es un ion con alto nivel de toxicidad en el cual las dosis letales para 50 y 90% de muerte celular son $CC_{50} = 3.46 \mu\text{M}$ y $CC_{90} = 22.48 \mu\text{M}$. En la lectura por espectrofotometría se observa la presencia de precipitado de tagua vegetal pulverizada en el fondo del pozo, esto incide en la lectura de las densidades ópticas, de ahí la importancia de hacer el cálculo de la densidad óptica de la tagua vegetal pulverizada sin disolución para hacer la respectiva correlación en la lectura de la placas de cultivo con presencia de tagua vegetal en precipitado.

La prueba de reducción colorimétrica de MTT se fundamenta en la transformación de esta sal de tetrazolio, de color amarillo, en cristales de formazán de color azul por parte de enzimas mitocondriales de las células activas; mide, por lo tanto, el número total de células vivas. Así, en la figura 16 se visualiza los contrastes a las diferentes concentraciones tanto de tagua vegetal pulverizada como de iones vanadio.

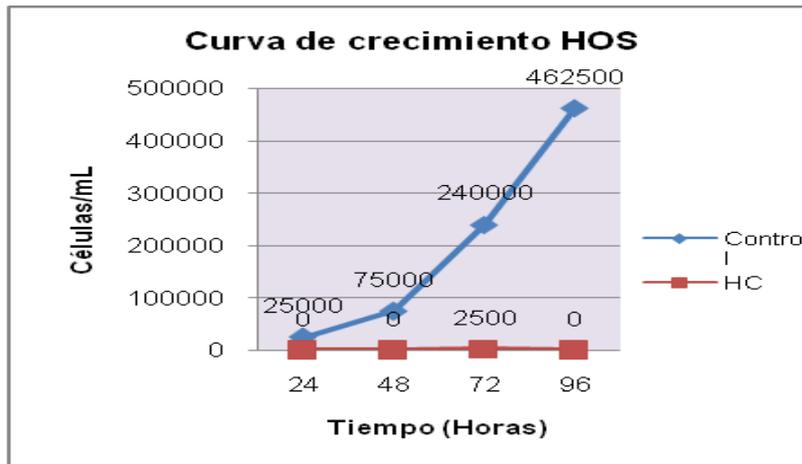


Figura 5. Curva de crecimiento celulas HOS sobre probetas de tagua vegetal pulverizada y controles.

3.3 Adhesión y morfología celular

En la evaluación por microscopia de epifluorescencia se observaron células adheridas a la probeta de tagua vegetal pulverizada a las 24 horas pero no a las 96 horas, en cuanto a la morfología, las células observadas solo es posible identificar los núcleos celulares por tinción de Hoechs 33342. En las células control se observó la adhesión y morfología característica tanto a las 24 como a las 96 horas (Ver figura 6a y 6b), además es posible identificar replicación celular en fase final de la mitosis, con lo cual se demuestra que las características del cultivo son optimas tanto para adhesión como para crecimiento celular.

Una de las dificultades que se presenta en la evaluación por microscopia de epifluorescencia para las probetas de hueso bovino calcinado es que éstas ofrecen cierto grado de fluorescencia, con lo que no es posible identificar la presencia de células en algunos campos.

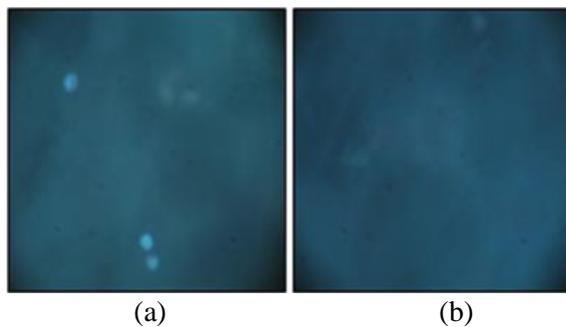


Figura 6. Fotografía representativa de las células HOS adheridas a probetas de tagua vegetal pulverizada a 24 y 96 horas.

IV. CONCLUSIONES

Es posible desarrollar un prototipo a escala real de una clavícula (Ver Figura 7), a partir de tagua vegetal pulverizada (Tamaños de partícula 80% menor a 150 micras), el cual tentativamente cumple con especificaciones físicas y mecánicas de huesos humanos.





Figura 7. Fotografía mostrando abajo el prototipo a escala real la clavícula a partir de tagua vegetal pulverizada y arriba, el hueso de clavícula humano.

El biomaterial a partir de tagua vegetal pulverizada permite una proliferación celular escasa, evidenciado en la presencia de solo 2500 células a 72 horas de contacto con el medio celular, además debido a las características de las probetas y el tipo de aglutinante empleado, se observa una leve precipitación del tagua vegetal pulverizada dentro del pozo de cultivo que ocasiona la muerte celular. Las laminillas control muestran un crecimiento significativo para cada uno de los tiempos.

El ensayo de citotoxicidad indica que el biomaterial presenta un grado de citotoxicidad 3 y reactividad moderada, en la cual la concentración a la cual el tagua vegetal pulverizada deja de ser tóxico para los osteoblastos de la línea celular HOS es $3,90625 \mu\text{g/mL}$. Las concentraciones letales del biomaterial que indican muerte celular del 50 y 90% fueron $CC_{50} = 152.75 \mu\text{g/mL}$ y $CC_{90} = 840.99 \mu\text{g/mL}$. haciendo una correlación con los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación celular, se corrobora que la inhibición del crecimiento de los osteoblastos es causado por la precipitación de partículas de tagua vegetal pulverizada en el cultivo celular que son tóxicas en concentraciones superiores a $7,86 \mu\text{g/mL}$.

El ensayo de adhesión y morfología celular en el cual se evaluó en tiempos de 24 y 96 horas, indica que las probetas cuentan con características ideales para permitir la adhesión de las células, pero el tipo de aglutinante utilizado puede ocasionar que no se presente a periodos mayores a 24 horas.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abraham, G. Biomateriales, Cyted, Primera Edición (2004), Editorial Faenza Ibérica. España.
2. Dekker, M. Manual de Bioingeniería y Biomateriales, Parte 6, Biomateriales para la Reconstrucción de defectos óseos. (2000), Primera Edición, New York.
3. Gómez, J. y Clemente, R. "Técnicas de precipitación como alternativa a la tecnología de recubrimientos con HAP mediante plasma spray", Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales. Vol. 20. N° 1. (2004), p. 30-38.
4. Rhee, S. H. "Synthesis of hidroxyapatite via mechanochemical treatment", Biomaterials. Vol. 23 (2002).
5. Sinha, M.K et al. "Porous Hydroxiapatite ceramic and clinical applications", Interceram. Vol. 49, N° 2. (2000), Alemania. pp. 102-105.
6. Viladot, V, Antonio. "Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor", Editorial: Springer, (2001).