

# Capítulo 4

## Estudio de la citotoxicidad de los vidrios de fosfato

### 4.1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se ha presentado las propiedades físico-químicas y mecánicas de los diferentes vidrios desarrollados en el sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ - $TiO_2$ , así como también del comportamiento de los mismos durante su degradación *in vitro*. Debido a que estos vidrios han sido desarrollados con la finalidad de ser usados en aplicaciones biomédicas, es indispensable el estudio de la respuesta biológica que suscitan.

Los estudios *in vitro* son el primer paso que se suele utilizar para la comprensión de la interacción substrato-célula y la biocompatibilidad de los materiales. Los cultivos celulares son sistemas ideales para el estudio y observación de un determinado tipo de células bajo condiciones específicas, dado que estos sistemas no presentan con la complejidad que un sistema *in vivo* conlleva, debido al gran número de variables que interaccionan.

Ya vimos en los capítulos previos que la incorporación de  $TiO_2$  dentro del sistema vitreo, reduce considerablemente la velocidad de degradación del vidrio al mismo tiempo que aumenta su dureza y su módulo elástico. Sin embargo, a partir de un 5% molar de  $TiO_2$ , tanto las propiedades mecánicas como la estabilidad química no mejoran significativamente.

Con el fin de estudiar el efecto de la velocidad de degradación de los vidrios en la citotoxicidad celular, se seleccionaron los vidrios G0 y G5 ya que el G0 presentó la mayor velocidad de degradación y el G5, junto con el G8, presentó la menor velocidad de degradación. Se eligió el G5 y no el vidrio G8 ya que tiene un menor contenido de  $\text{TiO}_2$ .

En este capítulo, se utiliza un modelo representado por células fibroblásticas de piel humana para el estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de estos vidrios de fosfato de calcio. Los fibroblastos son células pertenecientes al tejido conectivo y son ampliamente utilizadas en los estudios biológicos.

La respuesta celular será estudiada mediante ensayos de citotoxicidad, adhesión y proliferación. El ensayo de citotoxicidad permite estudiar el efecto tóxico de un biomaterial sobre un tipo determinado de células. La adhesión y la proliferación son comportamientos celulares indicadores de la funcionalidad celular. La adhesión celular es el proceso mediante el cual la célula se ancla a un sustrato y condiciona en gran parte eventos posteriores como la proliferación y la diferenciación. Por lo tanto, los resultados de citotoxicidad, adhesión y proliferación dan una buena idea sobre el tipo de respuesta que se podría esperar al utilizar el biomaterial *in vivo*.

Teniendo en cuenta que los vidrios de fosfato son solubles y se disuelven en un período de tiempo limitado, los diferentes ensayos se llevan a cabo no sólo en contacto directo con los vidrios, sino también con sus extractos, con el fin de simular la situación *in vivo*, donde el proceso degradativo conlleva la liberación iónica de las especies que constituyen el vidrio.

## **Objetivo**

El objetivo principal de este capítulo es evaluar la respuesta biológica de los vidrios G0 y G5 a tiempos cortos mediante ensayos de citotoxicidad y proliferación para así observar el efecto de la incorporación de  $\text{TiO}_2$  en el comportamiento celular, así como también relacionar la respuesta celular con el grado de solubilidad de los vidrios.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Materiales**

#### **4.2.1.1. Biovidrios**

Para los estudios *in vitro* se utilizaron los vidrios G0 y G5, es decir, el vidrio sin titanio y el vidrio con un 5% molar de  $\text{TiO}_2$  los cuales han sido descritos en detalle en las

secciones anteriores. Su composición química se recoge en la Tabla 4.1. Para la preparación de los mismos se siguió el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1.1.4.

**Tabla 4.1**

**Composición química de los vidrios G0 y G5 en porcentajes molares**

<b>Material</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (%)</b>	<b>CaO (%)</b>	<b>Na<sub>2</sub>O (%)</b>	<b>TiO<sub>2</sub> (%)</b>
<b>G0</b>	44.5	44.5	11	
<b>G5</b>	44.5	44.5	6	5

Tanto para el ensayo de citotoxicidad como para los de adhesión y proliferación se utilizaron dos modalidades, el cultivo en contacto directo y el cultivo con extractos. En la primera, se cultivaron las células directamente sobre el vidrio, y en la segunda se cultivaron en presencia de extractos procedentes de la disolución de los vidrios.

Para el cultivo en contacto directo con los vidrios, se utilizaron muestras de vidrio en forma de discos de 6 mm de diámetro y 1.5 mm de espesor aproximadamente. Para la obtención de los discos, se perforaron las placas de vidrio con una broca hueca de 6 mm de diámetro interno. Los discos fueron pulidos por ambas caras con alúmina hasta 0,05  $\mu\text{m}$  y posteriormente fueron lavados en ultrasonidos con etanol. Una vez limpios, fueron esterilizados con calor seco a 160-180°C durante 2 horas para evitar la presencia de endotoxinas. Las endotoxinas son moléculas complejas de polisacáridos que se encuentran en la membrana externa de las bacterias gram-negativas, y se encuentran dispersas en el aire. Este tipo de toxinas produce reacciones antigénicas e inflamatorias.

En el caso de los vidrios utilizados para la elaboración de extractos, se usaron bloques de vidrio de 15x15x5 mm pulidos por todas sus caras. Las muestras fueron lavadas y esterilizadas igual que en el caso anterior.

## **4.2.2. Métodos**

### **4.2.2.1. Preparación de los extractos de vidrio**

Para la preparación de los extractos de vidrio, pequeños bloques de G0 y G5 además de cubreobjetos de vidrio convencionales previamente esterilizados fueron introducidos en un envase con 45 ml del medio de cultivo modificado siguiendo una relación superficie/volumen de 5 ml/cm<sup>2</sup> (1). Los diferentes vidrios fueron sumergidos en el medio a 37°C y agitados ocasionalmente. Después de 24 h de incubación el fluido fue filtrado a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  impidiendo así el paso de posibles precipitados debidos a la disolución del vidrio. Los extractos se dividieron en alícuotas de 10ml en envases estériles y se guardaron a -20°C hasta su utilización. Para los ensayos se utilizaron tanto los extractos puros como diluciones 1:20 de éstos. En todos los casos se incorporó HEPES (Sigma) como tampón de la solución. El HEPES es un buffer orgánico

utilizado para mantener los niveles de pH del medio basal en el cultivo celular que mantiene el medio con un pH entre 7,2 y 7,6, el rango de pH fisiológico.

#### **4.2.2.2. Cultivo celular**

Para la realización de los diferentes ensayos se utilizaron fibroblastos de piel humana obtenidos a partir de cultivos primarios. Para el cultivo, inicialmente se colocaron las células en placas de cultivo junto con 10 ml de medio de cultivo modificado, DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*, Gibco) el cual fue suplementado previamente para mejorar las condiciones de las células y evitar cualquier tipo de contaminación. Se añadieron 4,5 gr de glucosa, 10% de suero bovino fetal (Gibco), 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina (todos los reactivos de Sigma). Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera con 5%CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días.

Para la realización del sub-cultivo, es decir, el traspaso de las células a los pocillos con los materiales a ensayar y sus extractos, 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 5 min 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 células del tejido y las libera en suspensión, separándolas entre ellas y de la cápsula 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.

#### **4.2.2.3. Ensayos de citotoxicidad**

Se realizaron 2 tipos de ensayo como ya se dijo, uno con discos de vidrio y otro con los extractos de vidrio.

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)-2H-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 los ensayos en contacto directo con el material, se colocaron los discos de los vidrios estudiados dentro de los pocillos de una placa multipozos de 48 pocillos. Además se colocaron cubreobjetos de vidrio como control. Sobre cada disco se depositaron  $8 \cdot 10^3$  células junto con 20  $\mu$ l de DMEM por cada pocillo. Se permitió que los fibroblastos se adhirieran a los substratos durante 3h y luego se añadieron 280 $\mu$ l de medio de cultivo a cada pocillo.

En el segundo caso, es decir, los ensayos con los extractos de vidrio, se colocó la misma concentración de células que en el caso anterior junto con 20 $\mu$ l de DMEM directamente en los pocillos de la placa multipozos. Después de 4h de incubación se cambió el medio por los extractos puros y sus diluciones (1:20). Se incluyeron un control positivo y otro negativo para monitorizar el medio de cultivo. Como control positivo se añadió al medio 0,02%v/v de SDS (dodecil sulfato de sodio) que es una sustancia tóxica y representa el 100% de mortalidad de las células. Para el control negativo se usó el medio con 0,01N de NaCl que es una solución inocua para las células.

En ambos casos se mantuvieron los cultivos 20 y 44 horas sin cambiar el medio y una vez transcurrido dicho período de tiempo, se añadieron a cada pocillo 30  $\mu$ l de WST con el fin de medir la actividad mitocondrial de las células. Se determinó la absorbancia después de 4h de contacto con la WST a 450 nm utilizando un espectrofotómetro LX800 (Bio-Tech Instruments). Finalmente, los resultados se expresaron como el promedio de los valores de absorbancia, obtenidos a partir de 6 réplicas.

#### **4.2.2.4. Ensayo de adhesión y proliferación**

La adhesión de las células fue estudiada sólo sobre los discos de vidrio. El ensayo se llevó a cabo según Gillies *et al.*(2). Para el estudio de la proliferación se utilizó tanto el método de contacto directo como los extractos de vidrio y sus diluciones.

En ambos casos se utilizó una concentración de  $8 \cdot 10^3$  células/pocillo. Se realizó el cultivo de las células siguiendo las mismas condiciones que para el ensayo de citotoxicidad. Después de 4 h en el caso del estudio de adhesión y después de 24, 48, 72 y 96 horas para el estudio de proliferación, se lavaron los fibroblastos con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min. Después de fijadas, las células fueron teñidas usando la técnica de *Cristal Violet Dye Elution* (CVDE) y lavadas con agua destilada para eliminar los excesos de tinción. El cristal violeta, también conocido como violeta de genciana (*gentian violet*), es un colorante utilizado como una tinción biológica general. Una vez teñidas, se procedió a la observación de las células por medio de microscopía óptica. Posteriormente se añadió una solución 0,1M de HCl a las células teñidas para disolver el color y pasados 3-4 min., se determinó la absorbancia a 630 nm utilizando un lector de ELISA. Se llevaron a cabo 2 experimentos independientes, cada uno por triplicado.

#### 4.2.2.5. Análisis estadístico de los datos

La significación estadística de las diferencias de los valores medios de las absorbancias de los diferentes materiales (G0 y G5) fue evaluada mediante el método *One-way-ANOVA* con el software Origin 6.1. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Citotoxicidad

##### a) Ensayos en contacto directo con los materiales

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos con el WST después de 24 y 48 horas de cultivo mostraron que la influencia de la composición química de los vidrios sobre la viabilidad de las células fue mucho más marcada en el caso de las células que fueron cultivadas directamente con los discos de vidrio que en aquellas que fueron cultivadas con los extractos. Asimismo, los cultivos en contacto directo con los discos de vidrio sugirieron un mejor comportamiento en el caso del vidrio G5 que en el caso del vidrio G0 como se observa en la Figura 4.1.

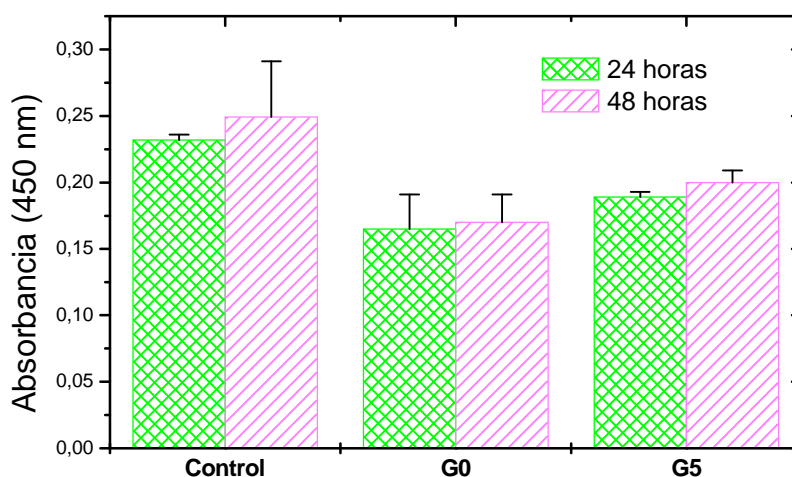
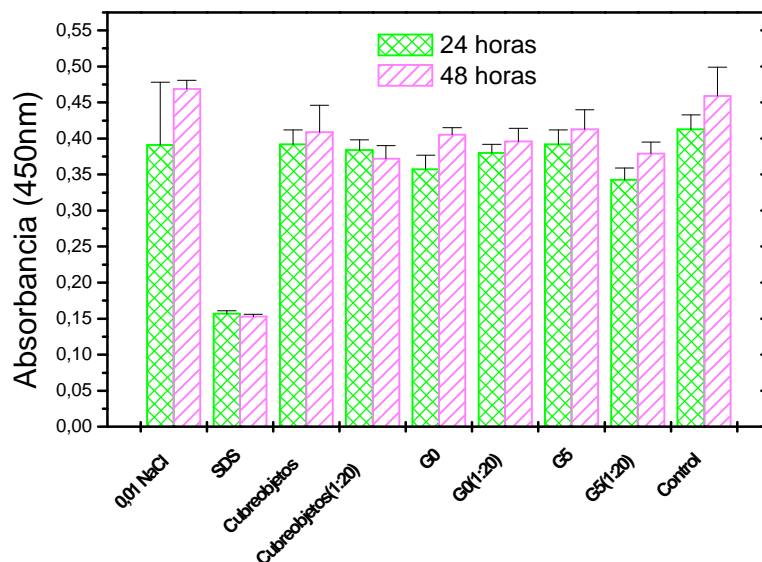


Figura 4. 1. Resultados del ensayo WST en contacto directo con los discos de vidrio después de 24 y 48 horas (n=6).

##### b) Ensayos con los extractos de los materiales

En el caso de los extractos de los vidrios (Figura 4.2), no se detectó ningún efecto citotóxico. Los valores de absorbancia correspondientes a las diluciones 1:20 y a los extractos sin diluir de las diferentes composiciones de vidrio no presentaron grandes

diferencias respecto a los valores de absorbancia obtenidos con los extractos elaborados a partir del vidrio control, es decir, del cubreobjeto, tanto puro como diluido y a su vez con la muestra control representada en este caso por las células sembradas en la placa de cultivo de poliestireno.

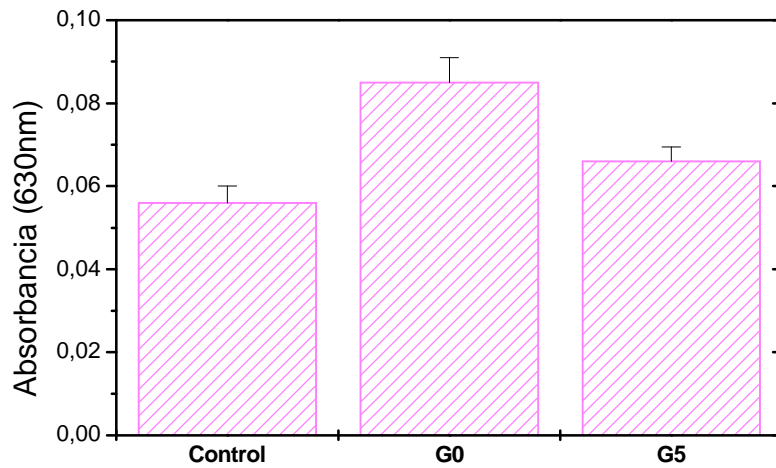


**Figura 4. 2.** Resultados del ensayo WST con los extractos de los vidrios después de 24 y 48 horas (n=6).

#### **4.3.2. Adhesión y Proliferación**

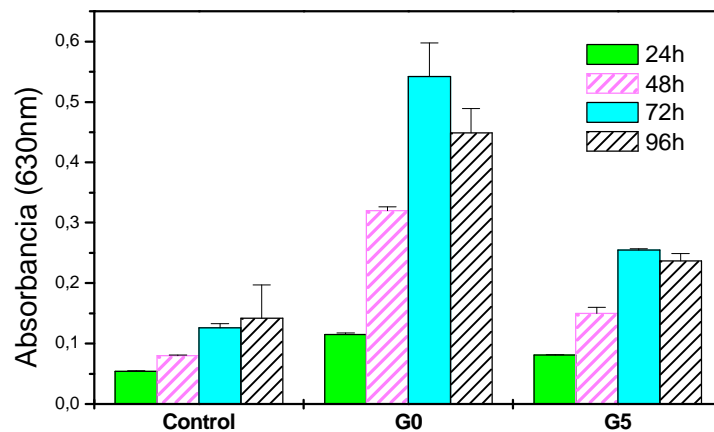
##### **a) Ensayos en contacto directo con los materiales**

La Figura 4.3 muestra los resultados obtenidos a partir de los ensayos de adhesión con las células fibroblásticas después de 4 horas en contacto con los discos de vidrio. Según las observaciones hechas con microscopia óptica y las mediciones de los niveles de absorbancia, después de la coloración con cristal violeta, se observó que las células tuvieron una mejor adhesión sobre el vidrio G0 que sobre el vidrio con TiO<sub>2</sub> (G5). Tanto G0 como G5 mostraron un mayor nivel de adhesión que la muestra control. Los resultados de los ensayos de proliferación para las células en contacto directo con los vidrios (ver Figura 4.4) mostraron que el vidrio sin Ti (G0), incrementó significativamente la proliferación de los fibroblastos según los valores de absorbancia reportados.



**Figura 4. 3.** Resultados de adhesión de las células fibroblásticas sobre los diferentes vidrios después de 4 h. (n=6).

No obstante, observación por microscopia óptica después de 72 y 96 horas de cultivo, mostró el levantamiento de algunas de las células inicialmente adheridas a los discos de G0 así como también se observó el recubrimiento de la superficie de los discos de vidrio por una matriz intensamente coloreada.

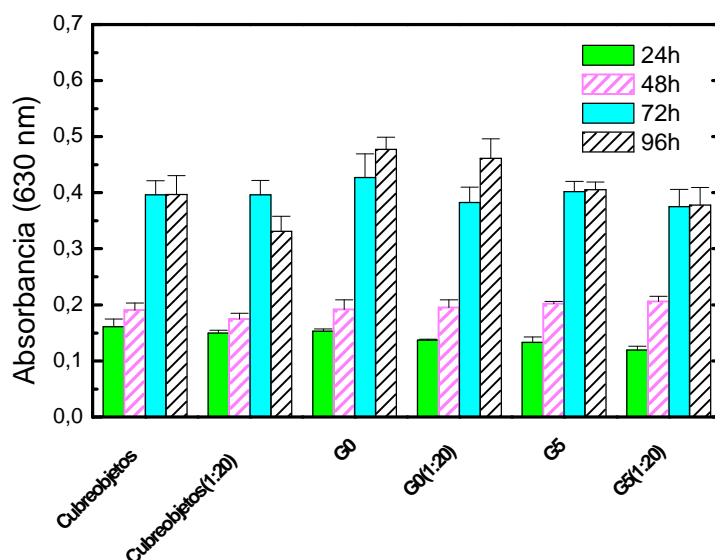


**Figura 4.4.** Proliferación de los fibroblastos en contacto directo con los vidrios después de diferentes tiempos de incubación (n=6).



### **b) Ensayos con los extractos de los materiales**

Con respecto a las diluciones 1:20 y a los extractos puros de los diferentes vidrios (Figura 4.5), no se distinguieron grandes diferencias entre las dos diferentes formulaciones de vidrio hasta 72 h de cultivo. Sin embargo, después de 96 horas de contacto, los extractos de G0 indujeron una proliferación de fibroblastos mayor que el vidrio G5 y los cubreobjetos.



**Figura 4.5.** Proliferación de las células fibroblásticas en contacto con los diferentes extractos a distintos tiempos de incubación (n=6).

### **4.3.3. Análisis por ICP-MS**

Los resultados obtenidos a partir del análisis por ICP se muestran en la Tabla 4.2. En esta tabla, la concentración iónica de los extractos puros (24h de incubación de los vidrios en DMEM suplementado con 10%FCS), puede ser comparada con la concentración iónica del medio suplementado con 10% de suero bovino fetal. Como era de esperarse, debido a su alta solubilidad, el vidrio G0 liberó una mayor cantidad de iones en el medio que el vidrio G5. Por lo tanto, la concentración iónica de los extractos fue ligeramente mayor para G0 que para G5. El ión Ti no fue detectado en ninguno de los casos.

**Tabla 4.2****Concentración iónica de los diferentes medios (medio de cultivo y extractos). (Media  $\pm$  Desviación Estándar, n=3)**

Muestra	Ca (ppm)	P (ppm)	Na (ppm)	Ti (ppm)
<b>DMEM 10%</b>	54.67 $\pm$ 0.02	28.5 $\pm$ 0.02	3187.81 $\pm$ 0.3	-
<b>FCS</b>				
<b>Ext G0 (24 h)</b>	62.34 $\pm$ 0.16	33.94 $\pm$ 0.01	3505.34 $\pm$ 0.5	-
<b>Ext G5 (24 h)</b>	60.16 $\pm$ 0.06	32.34 $\pm$ 0.003	3350.75 $\pm$ 0.6	-
<b>Ext G0 (48 h)</b>	44.11 $\pm$ 0.04	56.40 $\pm$ 0.01	2690.63 $\pm$ 0.4	-
<b>Ext G5 (48 h)</b>	50.40 $\pm$ 0.02	29.34 $\pm$ 0.02	2389.82 $\pm$ 0.7	-

#### 4.4. DISCUSIÓN

Ya sabemos que tanto el G0 como el G5 son vidrios solubles, que la velocidad de degradación de los mismos depende de su composición química y que a su vez el vidrio G5 ha resultado ser 8 y 10 veces menos soluble que el G0 en agua y en SBF respectivamente, gracias a la incorporación de TiO<sub>2</sub> dentro de la red vítrea. Debido a esta diferencia en la solubilidad de ambos vidrios, es interesante estudiar la interacción célula-material con dichos materiales para así poder establecer la existencia de algún tipo de relación entre el grado de solubilidad del material y la respuesta biológica en nuestro caso particular.

El propósito de este trabajo es evaluar el comportamiento *in vitro* de los vidrios G0 y G5 utilizando un modelo de fibroblastos humanos mediante ensayos de citotoxicidad, adhesión y proliferación. Como ya se dijo tanto el WST como el cristal violeta fueron los reactivos utilizados para medir la citotoxicidad y la adhesión y proliferación de los cultivos celulares. El WST es un ensayo muy efectivo para determinar la viabilidad de las células en sus primeros estadios. No obstante, se debe tener en cuenta la existencia de algunas diferencias entre los resultados obtenidos mediante el ensayo WST y el ensayo de proliferación con cristal violeta. Estas diferencias se deben principalmente a que las dos técnicas utilizadas se basan en fundamentos distintos para el recuento de las células. En el caso del ensayo de citotoxicidad se utilizaron sales de formazán que actúan en el sistema mitocondrial de las células, permitiéndonos medir de forma directa la viabilidad celular y también la proliferación, pero de manera indirecta. En el caso del ensayo de proliferación, se utilizó cristal violeta, esta técnica permite valorar la masa celular total de un cultivo celular y por lo tanto es un método directo para la medición de la proliferación celular. Como consecuencia, es factible que para el mismo número de células, el recuento celular por ambos métodos arroje resultados diferentes.

Los resultados del WST en el caso del estudio en contacto directo con la superficie de los vidrios, mostraron una ligera disminución de la absorbancia en ambas formulaciones que a su vez, fue más pronunciada para el vidrio G0. Por lo tanto, se podría decir que la respuesta celular mejoró con la incorporación de Ti en el sistema vítreo. Este hecho puede ser atribuido a la reducción de la solubilidad del vidrio y a una liberación de iones más controlada, lo cual conlleva probablemente a un pH local más estable.

Según los resultados del WST, ni los extractos provenientes del G0 ni los del G5 conllevan a una respuesta negativa (ver Figura 4.2). Estos resultados indicaron que los niveles de las concentraciones de calcio, fósforo y sodio en los extractos, mostrados en la Tabla 4.2, no afectaron la actividad celular para ninguno de los vidrios estudiados durante el tiempo de duración del análisis ya que no se observaron diferencias significativas entre ellos.

Con respecto a los valores de liberación de iones mostrados en la Tabla 4.2, se observó que los valores de concentración de Ca y de Na tanto en el extracto del vidrio G0, como en el vidrio G5 después de 48 horas, resultaron ser significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que los niveles de dichos iones en el DMEM con 10% FCS y en los extractos de 24 horas. Esta disminución de la concentración de Ca y Na en los extractos de 48 horas puede ser atribuida a la formación y precipitación de algún compuesto en el medio de cultivo.

En general, los resultados obtenidos sugieren que la presencia de iones Ti en el vidrio, no tuvo ningún efecto adverso en ninguno de los dos casos, extractos o contacto directo. El contenido de Ti en los extractos no pudo ser detectado por el análisis de ICP, lo cual indica que la concentración de este ión fue menor a 0,2 ppm que es el límite de detección de esta técnica.

Es un hecho conocido que la liberación de elevadas concentraciones de titanio conlleva a la acumulación de este metal en el tejido óseo circundante al implante (3;4) y en órganos parenquimales como los pulmones, el hígado o el bazo (5-9), en algunos casos también se ha constatado su eliminación por medio de la orina (10). Sin embargo, esto ocurre en el caso de implantes metálicos, principalmente por problemas de corrosión o desgaste del material y generalmente el titanio se encuentra en forma de micropartículas. El efecto del titanio en forma iónica en el metabolismo celular ha sido objeto de varios estudios con diferentes tipos de células. Algunos estudios realizados con neutrófilos humanos, que son unos de los leucocitos más representativos junto con los macrófagos a la hora de responder ante la presencia de un cuerpo extraño, indicaron que este tipo de células experimenta una cierta estimulación a nivel de la membrana celular al estar en contacto con concentraciones entre 2 y 10 ppm de titanio (11). Mientras que Liao *et al.* (12) encontraron que concentraciones de titanio alrededor de los 10 ppm inhibían la proliferación celular. Estudios realizados con células

osteoblásticas (13;14) determinaron la concentración iónica de Ti a la cual se observó el 50% de citotoxicidad en este tipo de células. El llamado TC50 (*toxic concentration 50%*) resultó ser 50 ppm, a partir de esta concentración se observaron ciertos efectos citotóxicos en las células.

Por otra parte, la respuesta celular ante un determinado ión varía según el tipo de célula utilizada ya que cada tipo de célula tiene una sensibilidad diferente. Por ejemplo, en el caso del Ti, ya hemos visto que los neutrófilos mostraron ser más sensibles al titanio que los osteoblastos. A su vez, las líneas de células osteoblásticas han mostrado ser más sensibles que las células fibroblásticas (15).

Según los análisis de ICP la concentración de titanio presente en los extractos resultó ser mucho menor que el valor de TC50 para los osteoblastos. Dado que los extractos son soluciones que intentan emular la liberación de iones *in vivo*, los resultados obtenidos sugieren que las cantidades de Ti liberadas a partir de ambos vidrios, bajo las condiciones de estudio utilizadas, parecen ser no citotóxicos para las células fibroblásticas usadas.

Los resultados presentados en la sección anterior de este capítulo indican que la información obtenida a partir de los extractos y del cultivo en contacto directo con los discos de vidrio, no puede considerarse como equivalente. Las interacciones célula-material están influenciadas no sólo por la composición química, sino también por otras propiedades del sustrato como son la rugosidad superficial, y la energía superficial, entre otras variables (16-18). Todos estos, factores no están presentes en el caso de los extractos. Por otro lado, las condiciones locales, como el nivel de pH y la acumulación de iones pueden ser muy diferentes en ambos métodos y altamente dependiente del procedimiento usado en el ensayo utilizado. De hecho, se ha visto por ejemplo que tanto la composición como el contenido del suero en el medio de cultivo puede afectar la disponibilidad y el transporte de iones hacia la célula y dentro de ésta ya que concentraciones elevadas de suero pueden proveer más transferrina y otras moléculas capaces de transportar los iones a las células (19). Esto debe tomarse en cuenta sobretodo cuando se están desarrollando materiales para ser usados como andamios tridimensionales para aplicaciones de ingeniería de tejidos, los cuales deben ser colonizados por las células para la regeneración del nuevo tejido.

Por otro lado, también es conocida la dificultad de extrapolar los resultados *in vitro* al comportamiento *in vivo* del material, especialmente en el caso de materiales altamente reactivos o solubles. De hecho, en un estudio previo, el comportamiento *in vivo* del vidrio G0 fue evaluada en conejos, en el tejido subcutáneo dorsal (20). En ese estudio *in vivo*, el vidrio G0 mostró una buena biocompatibilidad y no presentó ninguna reacción adversa, a pesar de su alta solubilidad, mientras que en este estudio pareciera que el vidrio G0 aparece como ligeramente citotóxico ya que en el ensayo WST presenta una absorbancia menor que la del control después de 24 y 48 horas de cultivo como indica

la Figura 4.3. Esta aparente contradicción puede ser explicada por el hecho de que *in vivo*, los cambios químicos locales están tamponados por el medio fisiológico y por la continua circulación de los fluidos fisiológicos, lo cual “suaviza” las condiciones locales. Además, algunos mecanismos de degradación celular, que son activados *in vivo* y no *in vitro*, pueden modificar el comportamiento biológico del material.

Asimismo, los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión y proliferación parecen ser un poco contradictorios en comparación con los ensayos de citotoxicidad. De hecho, tanto los valores de absorbancia como la observación por microscopía óptica mostraron una mejor adhesión en el caso del vidrio sin titanio que en el vidrio con 5% molar de  $\text{TiO}_2$  y que el control, a pesar de los resultados de citotoxicidad mostrados en la Figura 4.1. La misma tendencia fue vista en los ensayos de proliferación en contacto directo con la superficie de los vidrios (Figura 4.4).

Hay que mencionar que en el método de contacto directo, a pesar de que los valores de absorbancia para la proliferación fueron mayores para G0 que para G5 y para el control, la observación por microscopía después de 72 y 96 horas de cultivo, mostró que algunas de las células se despegaron de la superficie del vidrio G0. En cambio en los discos de vidrio G5, se observó una monocapa confluyente sin desadhesión de células.

Además, se observó la formación de una capa de tipo proteico en la superficie de los discos de G0 que provocó la coloración intensa de la superficie del vidrio, lo cual podría ser la explicación a los altos valores de absorbancia obtenidos. Para confirmar que la capa de proteína formada en la superficie de G0 no era simplemente el resultado de la adsorción de las proteínas provenientes del medio de cultivo, los vidrios fueron incubados en DMEM con 10% de FCS sin células durante períodos comprendidos entre 24 y 96 horas. Se detectó una tenue coloración en ambas formulaciones de vidrio. Los valores de absorbancia obtenidos después de diferentes períodos de incubación están recogidos en la Tabla 4.3. Se puede ver que estos valores son pequeños cuando son comparados con aquellos medidos en presencia de células y por lo tanto no justifican los altos valores de absorbancia que se obtienen para G0 en comparación con G5 en los estudios de proliferación (Figura 4.4).

Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de los extractos de los vidrios estudiados (Figura 4.5), mostraron que a partir de 72 horas de cultivo, los extractos de G0 resultaron tener valores de absorbancia ligeramente mayores que los del G5, induciendo una mayor proliferación de los fibroblastos. A pesar de que los resultados del ensayo de proliferación (48, 72 y 96 horas) con extractos siguieron una tendencia similar a los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión y proliferación en contacto directo, las diferencias entre las dos formulaciones fueron mucho menores.

Los resultados obtenidos a partir de los diferentes estudios sugieren que G0 parece inducir la síntesis y secreción de algún tipo de proteína en la matriz extracelular, como podría ser la fibronectina u otras proteínas extracelulares. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Salih *et al* (21), que encontraron que líneas celulares de osteoblastos humanos en presencia de extractos provenientes de vidrios de fosfato con una composición química similar a la del vidrio G0, experimentaron un aumento en la proliferación y una sobrerregulación de la expresión de sialoproteína, osteonectina y fibronectina. Las razones que pueden explicar estos efectos producidos por el vidrio G0 en los fibroblastos y la sobresecreción de proteínas extracelulares no están claras, pero ya que sólo aparecen en el caso de G0 y no en el G5, puede que estén relacionadas con la diferencia en la composición química y en la velocidad de disolución, lo cual corroboraría que la solubilidad es un punto de gran importancia en las interacciones célula-material.

**Tabla 4.3**

**Valores de absorbancia obtenidos a partir de la coloración de los vidrios G0 y G5 con cristal violeta después de diferentes tiempos de incubación con DMEM suplementado con 10% FCS. (Media  $\pm$  Desviación Estándar, n=5)**

<b>Tiempo de contacto (h)</b>	<b>G0 (Absorbancia, 630nm)</b>	<b>G5 (Absorbancia, 630nm)</b>
<b>24</b>	0.084 $\pm$ 0.006	0.04 $\pm$ 0.004
<b>48</b>	0.041 $\pm$ 0.006	0.042 $\pm$ 0.004
<b>72</b>	0.073 $\pm$ 0.021	0.045 $\pm$ 0.011
<b>96</b>	0.125 $\pm$ 0.036	0.071 $\pm$ 0.025

El aumento en la síntesis y secreción de proteínas puede estar relacionado con varios factores como las variaciones en los niveles de pH o en las concentraciones iónicas del medio. Por ejemplo, en líneas celulares osteoblásticas y osteoclasticas se ha visto que un descenso en el pH del medio inhibe la actividad de los canales de calcio que se encuentran en las membranas plasmáticas (22;23).

En el caso de que esta sobrerregulación esté ligada a las variaciones en las concentraciones iónicas, aunque no está muy claro cual de los iones es el responsable de los efectos observados, algunos autores sugieren que el calcio puede jugar un papel fundamental en la secreción de proteínas ya que algunos cationes divalentes como el Ca<sup>2+</sup>, juegan un papel fundamental en la activación y regulación de ciertos mecanismos y eventos intracelulares (24;25).

De nuevo, los resultados han sido “suavizados” cuando los extractos fueron usados. Esto puede ser explicado por el hecho de que en el método de contacto directo, los fibroblastos están expuestos a un ambiente químico el cual puede sufrir fuertes variaciones locales, cerca de la superficie del vidrio soluble, de donde pueden difundir las especies iónicas hacia el fluido. En contraste, en el caso de los extractos, las células

están inmersas en un medio mucho mas homogéneo donde las concentraciones iónicas están “promediadas” en el volumen total del extracto.

En resumen, el estudio presentado en este capítulo indica que la solubilidad de los materiales a implantar es un factor que influye en el comportamiento celular. Los resultados obtenidos mostraron que el G5 es el vidrio con una mejor respuesta celular. Por lo tanto, este será el vidrio seleccionado para la elaboración de los materiales compuestos estudiados en los próximos capítulos.

#### 4.5. REFERENCIAS

- (1) Shand EB. Experimental study of fracture of glass: I. The fracture process. *Journal of the American Ceramic Society* 1954; 37:52-60.
- (2) Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of Cell Number in Monolayer-Cultures. *Analytical Biochemistry* 1986; 159(1):109-113.
- (3) Smethurst E, Waterhouse RB. Physical-Examination of Orthopedic Implants and Adjacent Tissue. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 1978; 49(1):8-18.
- (4) Schliephake H, Reiss G, Urban R, Newkam F, Guckel S. Metal Release From Titanium Fixtures During Placement in the Mandible: An Experimental Study. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 1993; 8:502-511.
- (5) Ferguson AB, Akahoshi Y, Laing PG, Hodge ES. Trace Metal Ion Concentration in the Liver, Kidney, Spleen, and Lung of Normal Rabbits. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1962; 44(2):317-322.
- (6) Meachim G, Williams D. Changes in nonosseous tissue adjacent to titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 1973; 7:555-572.
- (7) Woodman JL, Jacobs JJ, Galante JO, Urban RM. Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacement of long bones in baboons. A long-term study. *Journal of Orthopaedic Research* 1984; 1:421-430.
- (8) Lugowski SJ, Smith DC, Mchugh AD, Vanloon JC. Release of Metal-Ions from Dental Implant Materials In vivo - Determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V, and Ti in Organ Tissue. *Journal of Biomedical Materials Research* 1991; 25(12):1443-1458.
- (9) Rodriguez D, Gil FJ, Planell JA, Jorge E, Alvarez L, Garcia R et al. Titanium levels in rats implanted with Ti6Al4V treated samples in the absence of wear. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1999; 10(12):847-851.
- (10) Jorgensen TJ, Munno F, Mitchell TG, Hungerford D. Urinary Cobalt Levels in Patients with Porous Austin-Moore Prostheses. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1983;(176):124-126.
- (11) Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. *Biomaterials* 2002; 23(17):3757-3764.
- (12) Liao HH, Wurtz T, Li JG. Influence of titanium ion on mineral formation and properties of osteoid nodules in rat calvaria cultures. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 47(2):220-227.
- (13) Thompson GJ, Puleo DA. Effects of Sublethal Metal-Ion Concentrations on Osteogenic Cells Derived from Bone-Marrow Stromal Cells. *Journal of Applied Biomaterials* 1995; 6(4):249-258.
- (14) Puleo DA, Huh WW. Acute Toxicity of Metal-Ions in Cultures of Osteogenic Cells Derived from Bone-Marrow Stromal Cells. *Journal of Applied Biomaterials* 1995; 6(2):109-116.
- (15) Wataha JC, Hanks CT. Effect of cell line on in vivo metal ion cytotoxicity. *Dental Materials* 1994; 10:156-161.



- (16) Lopes MA, Monteiro FJ, Santos JD, Serro AP, Saramago B. Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 45(4):370-375.
- (17) Vogler EA. Interfacial chemistry in biomaterials science. In: Berg JC, editor. *Wettability, surfactant science series*. 1993: 183-250.
- (18) Lampin M, WarocquierClerout R, Legris C, Degrange M, SigotLuizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997; 36(1):99-108.
- (19) Glusker JP. Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv Protein Chemistry* 1991; 42:1-76.
- (20) Clement J. Desarrollo y Caracterización de un Material Compuesto Totalmente Biodegradable para Aplicaciones Quirúrgicas. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España, 2001.
- (21) Salih V, Franks K, James M, Hastings GW, Knowles JC, Olsen I. Development of soluble glasses for biomedical use Part II: The biological response of human osteoblast cell lines to phosphate-based soluble glasses. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2000; 11(10):615-620.
- (22) Yamaguchi DT, Green J, Kleeman CR, Muallem S. Properties of the Depolarization-Activated Calcium and Barium Entry in Osteoblast-Like Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264(1):197-204.
- (23) Moody W. Effects of Intracellular H<sup>+</sup> on the Electrical-Properties of Excitable Cells. *Annual Review of Neuroscience* 1984; 7:257-278.
- (24) Silver IA, Deas J, Erecinska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 2001; 22:175-185.
- (25) Haberland A, Knaus T, Zaitsev SV, Stahn R, Mistry AR, Coutelle C et al. Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* 1999; 1445(1):21-30.