



Informes de bioensayos de Citotoxicidad y Genotoxicidad realizados a esponjas de colágeno utilizadas en medicina odontológica reparadora

Introducción

Los biomateriales Membracel "E" (Esponja de Colágeno) partida N° 1907;1902 y Membracel "EH" (Esponja de Colágeno con MO), partida N° 1907;1905, fueron provistos por la Empresa LABORATORIO CELINA S.A. Los mismos son utilizados en medicina odontológica reparadora.

Los biomateriales pueden liberar por procesos deletéreos, moléculas que producen sobre las células o en derredor de su entorno reacciones tóxicas o mutagénicas. Muchas de ellas pueden difundir a los tejidos duros y blandos generando síntomas clínicos tales como dolor, lisis y necrosis celular [1-4].

Los bioensayos, validados por las Normas ISO 10993-3/5 se orientan a evaluar los efectos Citotóxicos y Genotóxicos producidos por los materiales sobre las células cultivadas *in vitro*, como así también la capacidad de integrarse al tejido receptor [2-3].

Para dichos ensayos se utilizó la línea celular de origen óseo (UMR-106, obtenida de American Type Culture Collection (ATCC .CRL 1661). La cual posee características fenotípicas osteoblásticas [4].

Materiales y método

A. Cultivos celulares

En los bioensayos se utilizó la línea celular establecida (UMR-106, obtenida de American Type Culture Collection (ATCC .CRL 1661). Esta línea es derivada de un osteosarcoma de rata y posteriormente clonada. El tumor parental fue inducido en ratas de tipo Sprague-Douley por inyección intraperitoneal de fósforo 32 radioactivo. Estas células retienen varias de las características de las células óseas, como sensibilidad a la hormona paratoidea, receptores citosólicos de hueso que se unen a hormonas esteroideas y responden a prostaglandinas. Tanto el sarcoma como las líneas celulares clonadas fueron desarrollados por T.J Martin de la Universidad de Sheffield, Inglaterra.

La línea celular fue propagada en medio de cultivo D-MEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con el 10% de suero bovino fetal (Internegocios), 100 U/ml de Penicilina y 100µml de Estreptomina (Gibco) en estufa con atmósfera humidificada 95% y anhídrido carbónico al 5%. Las células eran subcultivadas utilizando tripsina al 0.25% en PBS sin calcio ni magnesio.



B. Acondicionamiento de Medios de Cultivos.

Los medios acondicionados (extractos) se obtuvieron por inmersión de las muestras en medios de cultivos manteniendo una relación 1 mililitro por cada 2 cm² de superficie geométrica según normas ISO 10993-3/5. Los mismos fueron incubados durante 72 horas a 37 °C. Como control negativo se utilizó medio de cultivo sin muestra en las mismas condiciones. Para los controles positivos fueron utilizados los especificados para cada uno de los ensayos.

C Estudios de Biocompatibilidad

C1. Ensayo de Contacto directo

Este ensayo permite la evaluación de la citotoxicidad y citocompatibilidad.

Las muestras (implantes y discos) son fijadas en la superficie de placas de Petri de 35 mm x 10mm, con grasa de silicona, donde luego es inoculada una suspensión celular (3 mL con 3x10⁵ células).

Luego son incubadas en atmósfera saturada de humedad, con el 5% de dióxido de carbono, a 37°C, durante 120 hs.

D. Ensayos de Citotoxicidad.

D1. Ensayo Calorimétrico de tetrazolium (MTT)

El método utilizado de Mosmann modificado por Twentymen y Luscombe mide la reducción de las sales de tetrazolium (amarillo) a formazan (violeta) por medio de las enzimas deshidrogenadas presentes en las mitocondrias de las células vivas.

Para este análisis se sembraron 1x10⁴ células por pozo en placas 96 multipozos. Se cultivaron durante 24 hs. Luego se reemplazó el medio de cultivo por el medio acondicionado, con sus correspondientes controles (negativos, medio sin acondicionar y positivos, medio con etanol al 5%) y se cultivaron otras 24hs. Posteriormente se pusieron dichas células en contacto con el reactivo de tetrazolium disuelto en medio de cultivo durante 3 hs., para posteriormente ser leída la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA multiwell. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de las mitocondrias.



IMBICE
INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR

D2. Ensayo Calorimétrico de rojo neutro (RN).

La técnica fue desarrollada de acuerdo a la descrita por Borenfreund y Puerner (1984). La misma se basa en la incorporación por endocitosis del colorante supravital RN por los lisosomas de las células vivas.

Para este análisis se sembraron 1×10^4 células por pozo en placas 96 multipozos. Se cultivaron durante 24 hs. Luego se reemplazo el medio de cultivo por el medio acondicionado, con sus correspondientes controles (negativos, medio sin acondicionar y positivos, medio con etanol al 5%) y se cultivaron otras 24hs. Posteriormente se pusieron dichas células en contacto con el reactivo de rojo neutro disuelto en medio de cultivo durante 3 hs. y por último fue leída la absorbancia a 540 nm. en un lector de ELISA multipozos. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de los lisosomas.

D3. Técnica de difusión en agar noble

Se siembra en cajas de petri de 3,5 mm. de diámetro 3 ml. de una suspensión (50000 células por ml.) de UMR106 y se incuba durante 48 hs. a 37°C en estufa con 5% de CO₂. Posteriormente se reemplaza el medio de cultivos por 3 ml. de medio fresco compuesto por una mezcla de agar (4%) y medio (2X) con doble concentración de suero. Se añade 10 ml. de solución de rojo neutro y se mantiene a 37°C en oscuridad durante 30 minutos para luego retirar el exceso del mismo. Finalmente, se colocan discos de los materiales a ensayar, agregando además, un control positivo y un control negativo y se incuba luego durante 24 hs. a 37 °C y 5 % de CO₂.

Se valora la zona de descolorización alrededor de la muestra colocada y de los controles para determinar el índice de zona (IZ) y el índice de lisis (IL) para cada muestra ensayada. Con estos datos se calcula el índice de respuesta (IR).

IZ	Indice de Zona
0	Nada
1	Zona de prueba
2	No mayor a 5 mm
3	No mayor a 10 mm
4	Mayor a 10 mm
5	todo



IMBICE
INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR

IL	Indice de Lisis
0	Nada
1	Menor a 20 %
2	Entre 21-40%
3	Entre 41-60%
4	Entre 61-80%
5	Mayor a 81%

$$IR = \frac{IZ}{IL}$$

IR	Respuesta Celular	Interpretación
0	0/0	No tóxico
1	1/1	Ligeramente tóxico
2	De 2/2 a 3/3	Moderadamente tóxico
3	De 4/4 a 5/5	Severamente tóxico

E. Ensayos de Genotoxicidad.

El método fue descrito por Singh y colaboradores para evaluar el daño en el ADN de células individuales causado por agentes genotóxicos¹. La técnica consiste en levantar las células tratadas y los controles con tripsina, las células suspendidas en PBS se mezclan con agar de bajo punto de fusión al 0.5 % a 37 °C y son esparcidas sobre un portaobjeto previamente tratado con una capa de agar común que actúa como base. Luego de la gelificación del agar, las células se lisan con buffer de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente, se prepara la electroforesis a pH: 13,0 (300mM NaOH, 1 mM EDTA). Se deja 20 min para que se produzca el desenrollamiento del ADN y se corre 30 min. a 25 Volt / 300 mA. Una vez realizada la corrida se neutraliza con 0,4 M Tris-HCl pH 7,5 y se colorea con plata o bromuro de etidio para visualizar el ADN, se toman fotografías y se evalúa la presencia, tamaño y cantidad de cometas. Es necesario evaluar al menos 50 células por condición experimental.

Resultados

1) Ensayo de Contacto directo.

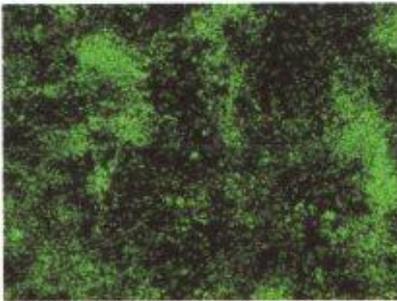


Fig. N°1 Células UMR106 coloreadas con naranja de acridina, demostrando alta viabilidad.

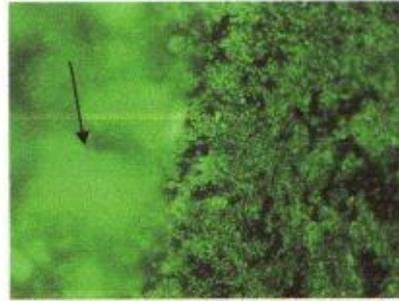


Fig N° 2 Células UMR106 viables en contacto directo con la muestra "E". La flecha indica el material probado.

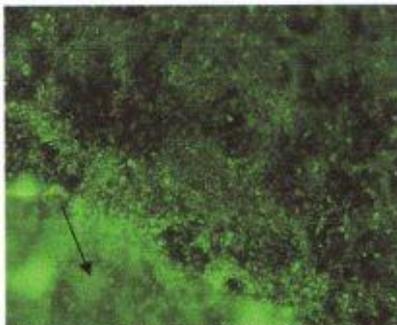
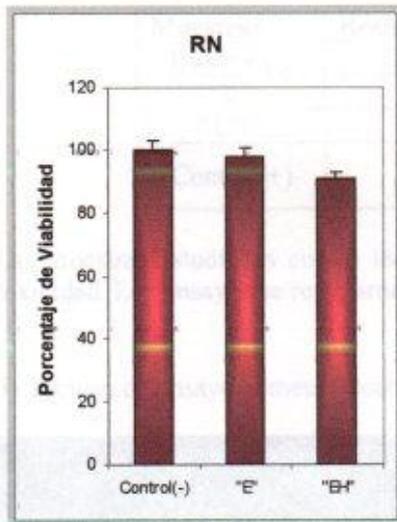


Fig. N°3 Células UMR106 viables en contacto directo con la muestra "EH". La flecha indica el material probado.

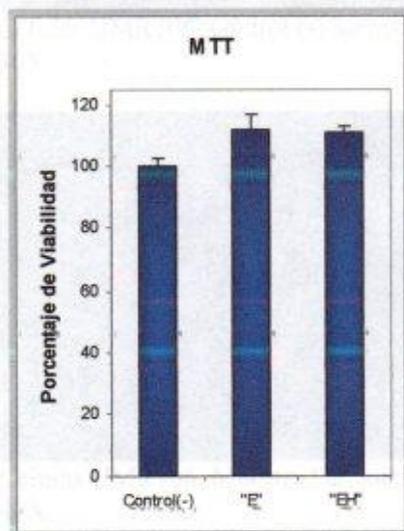
Las células UMR106 viables se ven de color verde (fluorescencia) en presencia de naranja de acridina. Se puede ver en las fotos que las células son viables en contacto directo con las muestras ensayadas. Magnificación de 10 X.

2) *Ensayo de Rojo Neutro*



La figura indica que no hay diferencia significativa de las muestras con respecto al control negativo. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se uso un test estadístico "T" de student.

3) *Ensayo de MTT*



La figura indica que no hay diferencia significativa de las muestras con respecto al control negativo. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se uso un test estadístico "T" de student.



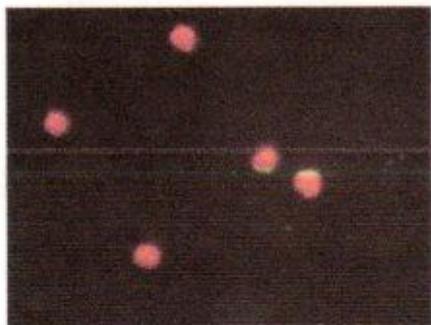
IMBICE
INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA CELULAR

4) *Técnica de difusión en agar noble*

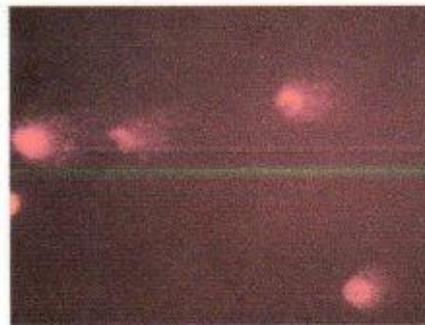
Muestras	Respuesta	Clasificación
Control (-)	0/0	No tóxico
"E"	0/0	No tóxico
"EH"	0/0	No tóxico
Control(+)	3/1	Ligeramente tóxico

Las muestras estudiadas con la técnica de difusión en agar indican que no presentan toxicidad. Los ensayos se realizaron por triplicado.

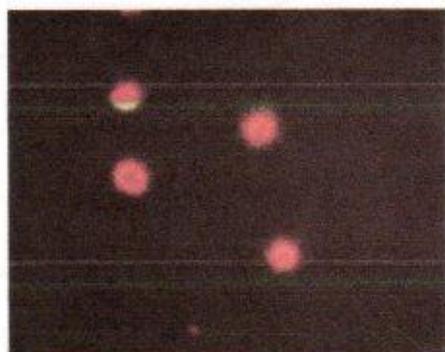
5) *Técnica de ensayo cometa (alcalino)*



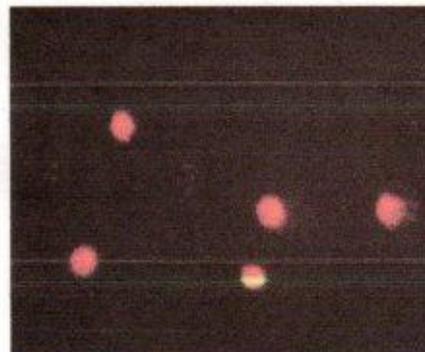
Células UMR106, control (-) aumento 40X.



Células UMR106, control (+) aumento 40 X.



Células UMR106. Muestra "E" aumento 40X.



Células UMR106. Muestra "EH" aumento 40 X.

No se observa la formación de cometas en las muestras "E" y "EH" indicando ausencia de genotoxicidad.



Conclusiones

Los estudios de citotoxicidad y genotoxicidad realizados por triplicado en las muestras Membracel "E" (Esponja de Colágeno) partida N° 1907; 1902 y Membracel "EH" (Esponja de Colágeno con MO), partida N° 1907; 1905, provistos por la Empresa LABORATORIO CELINA S.A. no demostraron citotoxicidad ni genotoxicidad. Dichos materiales utilizados permitieron *in vitro* la proliferación y las actividades bioquímicas celulares.

Referencias

- 1- Grillo, C. Reigosa, M. Fernandez Lorenzo de Mele, M. does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells? *Contraception* 456-467-2010.
- 2- Reigosa, M. Labarta, V. Molinari, G. and Bernal, D. Cytocompatibility, Cytotoxicity and Genotoxicity analysis of dental implants. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 19: 43-48. 2008
- 3- Reigosa, M. Labarta, V. Gómez de Saravia, S. Fernández Lorenzo, M. Comparación del efecto citotóxico del cobre sobre líneas celulares de ovario y osteoblastos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (UCE)*. 33: 78-83. 2008
- 4- Grillo, C. Reigosa, M. Fernández Lorenzo, M. 7 Effects of copper ions released from copper on CHO-K1 cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 672. 45-50 2008

Dr. Miguel A. Reigosa
Responsable Sector Cultivos
IMBICE – CONICET/CICPBA
