

Influencia del tratamiento con plasma de argón en el crecimiento celular sobre discos de titanio.

Universidad de Sevilla, España



Autores:

Daniel Torres Lagares

Objetivo:

Evaluar la toxicidad y el crecimiento celular en discos de titanio control (TIPO I) versus discos de titanio con tratamiento de argón (TIPO II). El objetivo de este ensayo fue el estudio del crecimiento de osteoblastos humanos sobre dos tipos de discos de titanio utilizando la línea celular MG-63. Para ello, se determinó la adhesión y proliferación celular mediante la medida metabólica con el test WST-1, el balance energético mitocondrial analizado por citometría y microscopía de fluorescencia a través del marcaje mitocondrial con JC-1 y el análisis de la morfología de las células adheridas con la tinción de F-. En los pocillos control (CONTROL), la siembra se realizó directamente sobre el plástico del pocillo de la placa M-96. Como control positivo de daño celular, se empleó el tratamiento con xantina-oxidasa (XO).

Resumen protocolo:

- Tipificación de la superficie. Se procederá a analizar la superficie (incluso de material no conductor) con un nivel de alta calidad de la imagen, aparte de estudiar la composición a través de la detección de iones secundarios. Se realizarán reconstrucciones tridimensionales de 10x4x5 micras que permitirán estudiar la superficie, composición y estructura del espécimen estudiado.

Esto permitirá completar los datos que actualmente se dispone de la superficie del implante Oxtein. Por otro lado, también se debe y puede estudiar la superficie que será comparada a la superficie del implante Oxtein.

- Estudio y análisis in vitro. Mediante el cultivo de fibroblastos y osteoblastos sobre discos de titanio se pueden identificar distintas variables que nos indican la mejora obtenida por los distintos tratamientos:

- Estudio energético celular mediante cuantificación del potencial de membrana mitocondrial;
- Estudio de apoptosis mediante tinción de núcleos con DAPI.
- Estudio de la movilidad y adhesión celular a través del estudio del citoesqueleto con rodamina-faloídina; Este aspecto se hará sobre los dos grupos de estudio.

Resultados:

Ensayo 1: Determinación de la adhesión celular y la proliferación de las células MG-63 sobre los discos de

Investigaciones finalizadas

titanio Tipo I y II mediante el test de viabilidad celular WST-1 a 6, 24 y 48 horas.

- Adhesión celular: Los discos de titanio Tipo I presentan una tendencia de adhesión menor al control tras 6 horas de cultivo in vitro no siendo así para los discos de Titanio Tipo II.

- Proliferación celular: Los discos de titanio Tipo I disminuyeron la proliferación de las células MG-63 tras las 24 horas de cultivo con respecto al control. A 48 horas de cultivo, estos discos siguieron mostrando la misma tendencia pese a no ser significativa. En el caso de los discos de titanio Tipo II, la proliferación celular fue similar respecto al control a 24 y 48 horas.

Ensayo 2: Determinación del balance energético mitocondrial con marcaje JC-1 de las células MG-63 adheridas a los discos de titanio Tipo I y II:

- Visualización de los cultivos marcados con JC-1: Se obtiene baja fluorescencia en verde para las células adheridas al control y a los discos de titanio Tipo I y II tanto a 24 como a 48 horas comparados con el control positivo de daño celular utilizado.

- Cuantificación por citometría de flujo del marcaje con JC-1 como medida del potencial mitocondrial: no se ha observado daño mitocondrial mediante la cuantificación de fluorescencia con la sonda JC-1 a 24 o 48 horas tras el sembrado de las células MG-63 sobre los discos de titanio Tipo I y II.

Ensayo 3: Determinación de la morfología de las células MG-63 adheridas a los discos de titanio Tipo I y II. Las microfotografías realizadas tras la inmunocitoquímica de filamentos de actina y núcleos celulares tras 24 horas de siembra han determinado que:

- Visualización de los cultivos con marca para F-actina y los núcleos: De visu, se aprecia un tamaño menor de las células MG-63 crecidas en los discos de titanio Tipo I y II con respecto al control, así como una reducción en la complejidad y orden de las prolongaciones citoesqueléticas o filopodios.

- Cuantificación de la medida del tamaño de las células con ImageJ: Las células MG-63 crecidas sobre los discos de titanio Tipo I y II presentan un área celular menor que en el caso de los controles no estando afectada la circularidad de las células.

- Cuantificación de la medida de los núcleos de las células con ImageJ: Los núcleos de las células sembradas en los discos Tipo I son más pequeños con respecto al control no siendo así en el caso de los discos Tipo II.

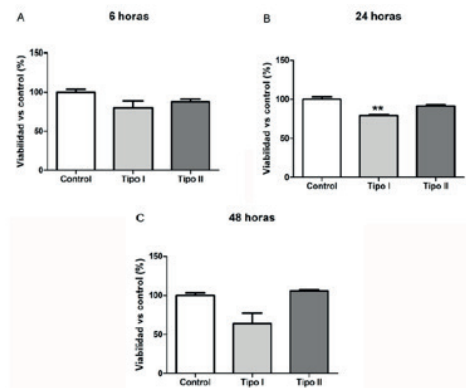


Figura 2. Medida de la adhesión a 6 horas (A) y de la proliferación celular a 24 y 48 horas (B y C) por WST-1 de los discos de titanio Tipo I y II en células MG-63. Se muestra el promedio en porcentaje \pm SEM de la viabilidad celular de cada disco dos horas después de la adición del reactivo WST-1. Tras realizar un bioensayo por triplicado en una M96 y comprobar la normalidad de los datos, se aplicó el estudio estadístico de la t-student de 2 colas y tipo 3. Se consideró significativo si $p < 0.05$. ** $p < 0.01$, respecto al grupo control.

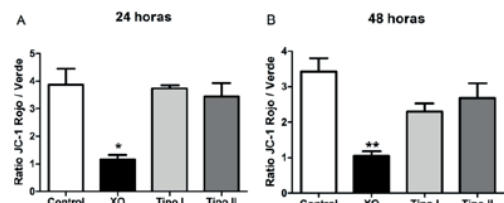
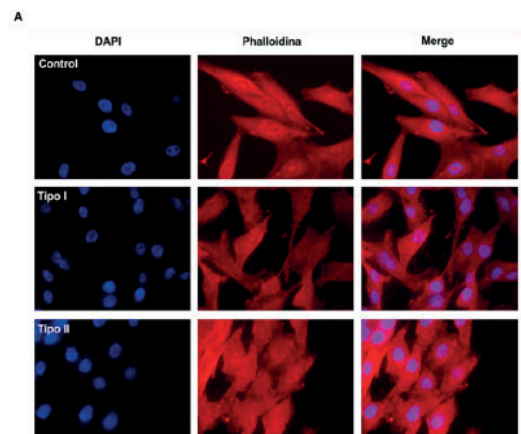


Figura 4: Representación de los ratios de fluorescencia obtenidos en la **Tabla 4 (A y B)** tras la realización de citometría de flujo con JC-1 en control, XO, y discos de titanio Tipo I y II a 24 (A) y 48 horas (B). Tal y como se observa en las gráficas no existe daño mitocondrial en ningún tipo de disco. Se realizó un bioensayo por triplicado y tras comprobar la normalidad de los datos se aplicó el estudio estadístico de la t-student de 2 colas y tipo 3. Se consideró significativo si $p < 0.05$. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, respecto al grupo control.



Conclusión:

Con los datos anteriormente mencionados, podemos decir que el disco en el que las células MG-63 muestran unas características más parecidas a los controles en cuanto a proliferación, adhesión y viabilidad mitocondrial es el Tipo II. Respecto de la morfología de las células MG-63, ninguno de los dos discos mostró semejanza con respecto al control.

Publicación prevista:

Verano 2018 Revista Internacional.

Fecha inicio:

Enero 2017.

Fecha fin:

Septiembre 2017.

B

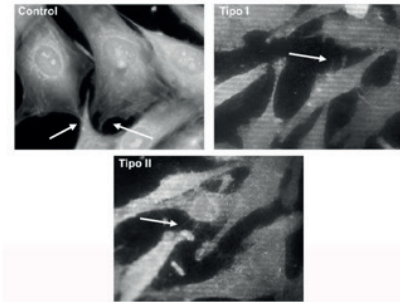


Figura 5: A. Microfotografías de las células MG-63 sobre los discos de titanio Tipo I y II y sobre las placas de cultivo (Control) con el objetivo de 40x mostrando la tinción con phalloidina-TRITC (rojo) y DAPI (azul). B. Microfotografías de las células MG-63 sobre los discos y sobre las placas de cultivo con el objetivo de 40x realizando un zoom centrado en mostrar las prolongaciones (filopodios).

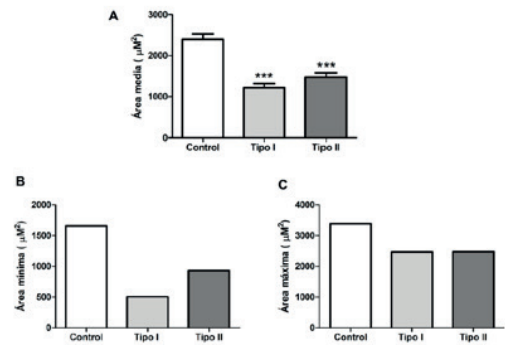


Figura 6: A. Área media de las células MG-63 en controles y discos de titanio Tipo I y II. Tras comprobar la normalidad de los datos se realizó el estudio estadístico de la t-test de 2 colas y tipo 3. Se consideró significativo si $p < 0.05$. *** $p < 0.001$ respecto al grupo control. B. Representación gráfica de las áreas celulares máximas y mínimas de las células MG-63 en controles y discos de titanio Tipo I y II. Se observa que los discos Tipo I presentan un área celular mínima menor con respecto al control y a los discos Tipo II.