

## Formulario de Entrega de TFG (Trabajo Fin de Grado). Odontología-UGR (2 páginas)

### Datos administrativos:

Convocatoria ( <i>Indicar Junio/septiembre y Año</i> ):	JUNIO-2015
---	------------

Código TFG ( <i>el que ha proporcionado el vicedecano</i> ):
<b>Título definitivo (<i>máximo 25 palabras</i>): ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS OSTEÓBLASTOS HUMANOS PROCEDENTES DE MUESTRAS DE HUESO INTRAORAL OBTENIDAS CON DOS TÉCNICAS DISTINTAS</b>

Tipología ( <i>marcar una única cruz</i> )
<input checked="" type="checkbox"/> Investigación
<input type="checkbox"/> Síntesis bibliográfica
<input type="checkbox"/> Caso/s clínico/s (sólo pacientes tratados por el alumno)
<input type="checkbox"/> Creación artística
<input type="checkbox"/> Elaboración de Guía Clínica
<input type="checkbox"/> Informe o proyecto profesional
<input type="checkbox"/> Trabajo derivado de prácticas extramurales en centro de salud
<input type="checkbox"/> Plan de Empresa
<input type="checkbox"/> Simulación de Encargo profesional

**Aclaración: Este material es propiedad intelectual de los Profesores Francisco Javier Manzano Moreno y Candelaria Reyes Botella, y se expone exclusivamente como ejemplo docente para los alumnos de Odontología de la UGR. Cualquier otro uso es ilegal por ir contra la ley de propiedad intelectual.**

	Alumno 1	Alumno 2	Alumno 3	Alumno 4
Fotografía	OCULTO	OCULTO		
Apellidos y nombre	OCULTO	OCULTO		
DNI	OCULTO	OCULTO		
Email	OCULTO	OCULTO		
Tf móvil	OCULTO	OCULTO		
Firma y fecha de entrega:	JUNIO-2015 FIRMA OCULTA	JUNIO-2015 FIRMA OCULTA		

Visto bueno del profesor-tutor ( <i>es opcional, pero deseable</i> )		
	Profesor Tutor 1	Profesor Tutor 2
Apellidos y Nombre	OCULTO	
Email	OCULTO	
Firma y fecha	OCULTO	

### Checklist de comprobación de aspectos formales (para cumplimentar por el alumno)

Aspectos formales de la Memoria	TFG	Extensión según número de alumnos			
		1	2	3	4
Nº alumnos	2	De 1 a 4, salvo caso clínico (de 1 a 2)			
Nº de palabras del Título	20	Máximo 25 palabras			
Nº de palabras del resumen estructurado	243	150-250 palabras en español			
Nº de palabras del resumen en inglés	208	150-250 palabras en inglés			
Nº de palabras clave	5	2-5			
Nº de palabras del Texto <sup>a</sup>	3540	1500-2500	3000-5000	4500-7500	6000-10000
Nº Tablas + Figuras + Fotos + Gráficos	9	1-5	2-10	3-15	4-20
Nº Referencias bibliográficas <sup>b</sup>	33	5-30	10-60	15-90	20-120

a: Palabras en el texto, sin contar resumen, ni bibliografía ni Tablas-Gráficos-Figuras-Fotos.  
b: Todas las referencias deben estar marcadas en el texto. En los trabajos de "Tipología Síntesis Bibliográfica" el número de referencias bibliográficas podrá ser mayor.

Aspectos Formales de cada póster (Sólo de 50 cm. de ancho x 70 cm. de alto).				
	Alumno 1	Alumno 2	Alumno 3	Alumno 4
Apellidos y Nombre	OCULTO	OCULTO		
DNI	OCULTO	OCULTO		
Nº palabras del Título (máximo 25)	20	20		
Nº palabras del Subtítulo (máximo 10) <sup>a</sup>	5	4		
Nº palabras en texto <sup>b</sup> (de 250-500)	255	258		
Nº Tablas+Figuras+Fotos+Gráficos (de 1-3)	2	3		
Nº Referencias bibliográficas (de 2-5)	5	4		

a: En los casos en que el póster individual derive de una memoria realizada en Grupo, cada póster llevará además del Título de la Memoria, un subtítulo para diferenciar un póster de otro.  
b: Sin incluir Título, Tablas-Gráficos-Figuras-Fotos ni Referencias bibliográficas

Aclaraciones (opcional):

## Publicación de los TFG (póster) en formato Libro/revista/web electrónico/a (y eventualmente en papel)

**Normas:**

- Es intención (limitado por disponibilidad presupuestaria) del Responsable del TFG publicar en formato libro/revista/web cada año un compendio de los posters (similar al que puede ver/descargar en la web de TFG-Odontología-UGR correspondiente al año 2015).
- Para que los posters de un TFG (que puede estar formado por entre 1-4 alumnos, y 1-2 tutores) se incluyan en el libro/revista/web es **IMPRESINDIBLE** cumplimentar la **AUTORIZACIÓN** por parte de todos los autores de cada TFG (alumnos + tutores).
- Esto es totalmente **VOLUNTARIO**, y no afecta a la calificación. Los TFGs que no lleven cumplimentada esta hoja no aparecerán en el Libro/revista/web que eventualmente se publique.
- Nótese que esta autorización se refiere a los **POSTERS**, y no a las Memorias, para cuya eventual publicación no sirve esta autorización.

Autorización para publicar el TFG (Trabajo Fin de Grado)-Odontología-UGR en formato libro/revista o web (electrónico y/o papel).			
Autor del TFG (de 1-4 alumnos y de 1-2 tutores)	Dirección postal de envío <sup>a</sup>	Teléfono de contacto <sup>a</sup>	Fecha y Firma de autorización
OCULTO (Alumno 1)	OCULTO	OCULTO	OCULTO
OCULTO (Alumno 2)	OCULTO	OCULTO	OCULTO
OCULTO (Tutor)	OCULTO	OCULTO	OCULTO

a: Estos datos se entregarán eventualmente a la empresa de mensajería encargada de los envíos. En el caso de los Tutores que sean profesores de la Universidad, deben indicar su dirección profesional, no la personal.

# ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS OSTEOSTASTOS HUMANOS PROCEDENTES DE MUESTRAS DE HUESO INTRAORAL OBTENIDAS CON DOS TÉCNICAS DISTINTAS

## Análisis de proliferación y diferenciación

TFG-Odontología-UGR-Junio-2015

Alumno: Apellidos, Nombre (email)  
Tutor/es. Apellidos, Nombre; Apellidos, Nombre

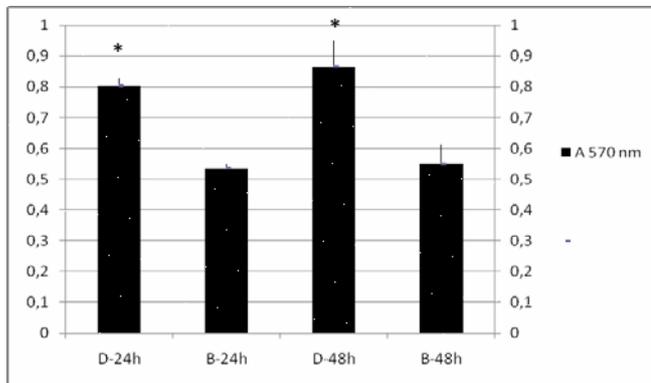
Foto cara alumno/a

Áclaración: Si es un TFG colectivo, solo se pondrá el nombre del alumno propietario de este póster concreto y su/ss tutor/es

**INTRODUCCIÓN:** Una de las alternativas a los injertos de hueso en bloque es el uso de hueso medular particulado obtenido mediante fresado a bajas revoluciones en la preparación del lecho del implante. Hasta ahora no existen publicaciones científicas que evalúen la capacidad biológica de ambos métodos. El objetivo de este trabajo es verificar la presencia de osteoblastos viables en muestras de tejido óseo obtenido por fresado y en muestras de bloque cortico-esponjoso y evaluar en ambos casos el crecimiento y la capacidad de diferenciación de los osteoblastos en cultivo.

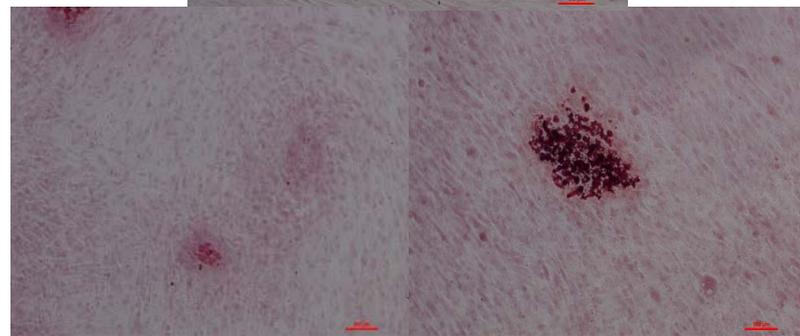
**MÉTODOS:** Las muestras de tejido óseo fueron procesadas independientemente y cultivadas en medio de cultivo DMEM, en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. La capacidad proliferativa de los osteoblastos fue determinada mediante espectrofotometría en un ensayo MTT a las 24 y a las 48 horas de cultivo. El estudio de la diferenciación celular fue realizado usando un medio de mineralización y posterior tinción de los nódulos formados utilizando alizarina a los 7, 15 y 22 días.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** Los osteoblastos procedentes del fresado mostraron una mayor capacidad proliferativa a las 24 y a las 48 horas de cultivo ( $P < 0.001$ ). El número de nódulos mineralizados fue proporcional al tiempo de incubación, sin encontrarse diferencias entre los dos tipos de muestras.



**Figura 1.** Medida de la proliferación de osteoblastos humanos cultivados con ensayo MTT a las 24 y 48 horas de cultivo. Los datos muestran la media de la absorbancia (570 nm)  $\pm$  desviación estandar (SD).  $P < 0.001$ . D; línea de osteoblastos obtenida de fresado. B; línea de osteoblastos obtenida de bloques de hueso.

B



**Figura 2.** Depósitos de calcio con tinción de alizarina en osteoblastos cultivados con medio de mineralización. A) Tinción a los 7 días de cultivo. B) Tinción a los 15 días de cultivo. C) Tinción a los 22 días de cultivo.

**CONCLUSIONES:** Los resultados sugieren que el hueso obtenido mediante fresado a bajas revoluciones es una alternativa eficiente al clásico procedimiento de obtención de tejido óseo.

## REFERENCIAS

- Bouvet-Gerbetz S, Merigo E, Rocca J-P, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 2009;41:291-7.
- Gruber R, Baron M, Busenlechner D, Kandler B, Fuerst G, Watzek G. Proliferation and osteogenic differentiation of cells from cortical bone cylinders, bone particles from mill, and drilling dust. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:238-43.
- Anitua E, Carda C, Andia I. A novel drilling procedure and subsequent bone autograft preparation: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22:138-45.
- Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;303(2):474-482.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987;47(4):936-942.

# ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS OSTEOSTASTOS HUMANOS PROCEDENTES DE MUESTRAS DE HUESO INTRAORAL OBTENIDAS CON DOS TÉCNICAS DISTINTAS

## Análisis del ciclo celular

TFG-Odontología-UGR-Junio-2015

Alumno: Apellidos, Nombre (email)  
Tutor/es. Apellidos, Nombre; Apellidos, Nombre

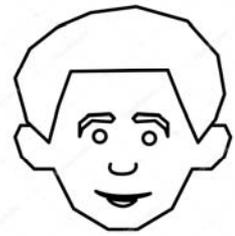


Foto cara alumno/a

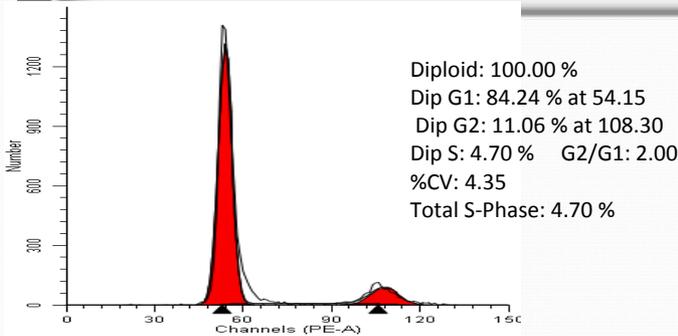
**INTR** **Ä**claración: Si es un TFG colectivo, solo se pondrá el nombre del alumno propietario de este póster concreto y su/ss tutor/es

descripto una nueva técnica de obtención de muestras de hueso, preservando las propiedades biológicas del tejido óseo al no someterlo a altas temperaturas. Esta técnica, al no utilizar irrigación, también conserva las partículas de hueso que quedan atrapadas en las fresas y estas pueden utilizarse para rellenar pequeños defectos de hueso. El objetivo de este estudio es comparar la capacidad de crecimiento y las posibles alteraciones en el ciclo celular de los osteoblastos obtenidos en las muestras de fresado con las células obtenidas mediante el procedimiento clásico de obtención de hueso autólogo en bloque.

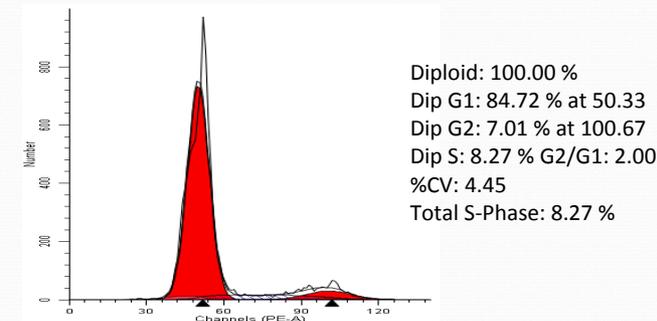
**MÉTODOS.** Las muestras de tejido fueron obtenidas de 10 voluntarios sanos sometidos a cirugía de extracción de terceros molares retenidos. Los explantes de las dos procedencias (injerto en bloque y fresado biológico) fueron procesadas independientemente y cultivadas en medio de cultivo DMEM, en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C.

El estudio de ciclo celular fue realizado siguiendo el protocolo propuesto por Ormerod (2000).

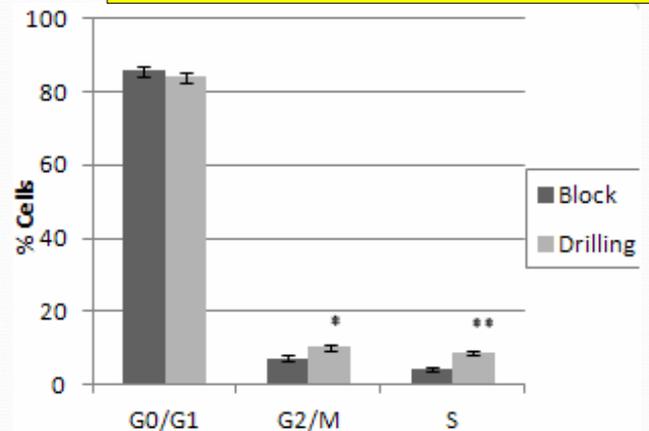
**Aclaración:** Este material es propiedad intelectual de los profesores Francisco Javier Manzano Moreno y Candelaria Resyes Botella, y se expone exclusivamente como ejemplo docente para los alumnos de Odontología de la UGR. Cualquier otro uso es ilegal por ir contra la ley de propiedad intelectual.



**Fig. 1. A. Perfil de fluorescencia del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo procedentes de los bloques de hueso córtico-esponjoso.**



**Fig. 1. B. Perfil de fluorescencia del ciclo celular de los osteoblastos humanos en cultivo procedentes del fresado biológico.**



**Fig. 2. Análisis de ciclo celular en las diferentes líneas celulares mediante citometría de flujo.** Go/G1, G2/M y S representan el porcentaje de células distribuidas entre esas fases. Los datos se dan como media  $\pm$  desviación estándar (SD). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$

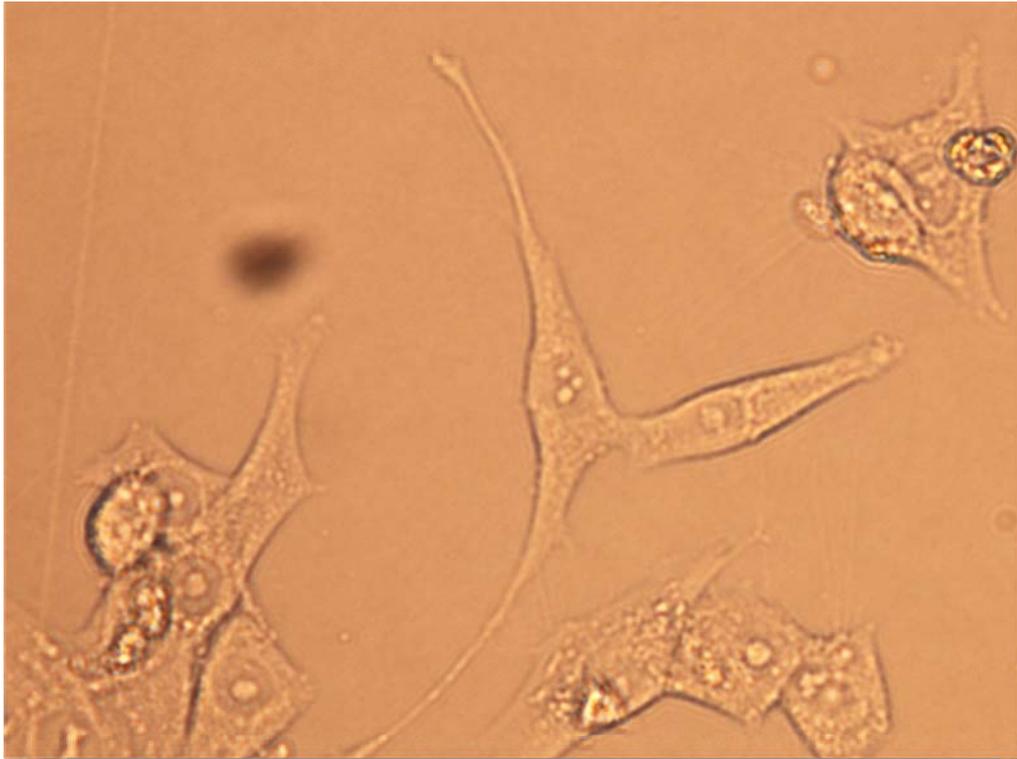
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN.** Los resultados del ciclo celular no muestran diferencias significativas entre las células procedentes de fresado biológico y las células aisladas a partir de bloques cortico-esponjosos en estadios G0/G1 pero sí se observó un incremento significativo en G2/M ( $P = 0.014$ ) y estadio S ( $P < 0.001$ ) en el grupo de osteoblastos procedentes de fresado biológico (fig.2).

These results suggest that bone obtained from low revolution drilling is an efficient alternative to the classic procedure for obtaining bone tissue.

### REFERENCIAS.

- Hunt DR, Jovanovic SA. Autogenous bone harvesting: a chin graft technique for particulate and monocortical bone blocks. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1999;19(2):165-173.
- Anitua E, Carda C, Andia I. A novel drilling procedure and subsequent bone autograft preparation: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22(1):138-145.
- Ducy P, Karsenty G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998;10(5):614-619.
- Ormerod. *Flow cytometry: a practical approach.* Oxford: Oxford University press; 2000.

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LOS OSTEÓBLASTOS HUMANOS  
PROCEDENTES DE MUESTRAS DE HUESO INTRAORAL OBTENIDAS CON DOS TÉCNICAS  
DISTINTAS**



**Aclaración: Este material es propiedad intelectual de los Profesores Francisco Javier Manzano Moreno y Candelaria Reyes Botella, y se expone exclusivamente como ejemplo docente para los alumnos de Odontología de la UGR. Cualquier otro uso es ilegal por ir contra la ley de propiedad intelectual.**

Alumno 1: Nombre y Apellidos

Alumno 2: Nombre y Apellidos

## RESUMEN

**Introducción:** Una de las alternativas a usar injertos de hueso en bloque es el uso de hueso medular particulado obtenido mediante fresado a bajas revoluciones en la preparación del lecho del implante. Hasta ahora no existen publicaciones científicas que evalúen la capacidad biológica de ambos métodos. El objetivo de este trabajo es verificar la presencia de osteoblastos viables en muestras de tejido óseo obtenido por fresado y en muestras de bloque cortico-esponjoso y evaluar en ambos casos la capacidad de crecimiento y de diferenciación de los osteoblastos en cultivo.

**Material y Métodos:** Las muestras de tejido óseo fueron procesadas independientemente y cultivadas en medio de cultivo DMEM, en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. La capacidad proliferativa de los osteoblastos fue determinada mediante espectrofotometría en un ensayo MTT a las 24 y a las 48 horas de cultivo. El estudio de la diferenciación celular fue realizado usando un medio de mineralización y posterior tinción de los nódulos formados utilizando alizarina a los 7, 15 y 22 días.

**Resultados y discusión:** Los osteoblastos procedentes del fresado mostraron una mayor capacidad proliferativa a las 24 y a las 48 horas de cultivo ( $P < 0.001$ ). El número de nódulos mineralizados fue proporcional al tiempo de incubación, sin encontrarse diferencias entre los dos tipos de muestras lo que parece indicar que el hueso particulado obtenido del fresado a bajas revoluciones, pudiera tener un mejor rendimiento al ser utilizado como injerto de hueso respecto a los bloques cortico-esponjosos.

## PALABRAS CLAVE

**Osteoblastos, injertos óseos, proliferación, diferenciación, fresado.**

## ABSTRACT

**Introduction:** One of the alternatives to using block bone grafts is the use of particulate cancellous bone obtained by low revolution drilling during the preparation of the implant bed. At present there are no scientific publications evaluating the biological capacity of both methods. The objective is to verify the presence of viable osteoblasts in samples of bone tissue obtained by drilling or from cortico-cancellous blocks and assess, in both cases, the growth and differentiation capacity of the osteoblasts.

**Material and Methods:** The bone tissue samples were processed independently and cultured in DMEM medium, in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Proliferative capacity of the osteoblasts was determined through a spectrophotometric technique (MTT) at 24 and 48 hours of culture. The study of cell differentiation was performed using a mineralization medium and the subsequent staining of the nodules formed using red alizarin at 7, 15 and 22 days of culture.

**Results and Discussion:** Osteoblasts from drilling showed a greater proliferative capacity both at 24 and 48 hours of culture ( $P < 0.001$ ). The number of mineralized nodules was proportional to the incubation time, with no differences being found between the two kinds of samples, therefore particulate bone obtained from low-speed drilling would have a better performance when is used as autograft.

## KEY WORDS

**Osteoblasts, bone grafts, proliferation, differentiation, drilling**

## **INTRODUCCIÓN**

### **Injertos óseos**

El manejo de pacientes edéntulos con implantes dentales es un hecho común en la actualidad. La predictibilidad de los procedimientos implantológicos y el mantenimiento de la estabilidad a largo plazo de los implantes en función está relacionado directamente con la calidad y cantidad de tejido óseo disponible para la colocación de los mismos<sup>1</sup>.

Cuando el proceso alveolar pierde el volumen son necesarias técnicas quirúrgicas adicionales a la técnica básica de inserción de implantes para reconstruir y aumentar el defecto óseo. Existe una gran variedad de procedimientos de aumento, dependiendo de la localización y tamaño del defecto, que se utilizan para proporcionar el soporte óseo necesario para la colocación de implantes<sup>2</sup>. En los procedimientos descritos clásicamente para obtener hueso autólogo existe una desventaja, que es la necesidad de recurrir a una zona donante, lo que conlleva una mayor morbilidad a los pacientes. Generalmente se obtiene un bloque cortico-esponjoso que debe ser triturado posteriormente para ser utilizado.

Sin embargo hay muchas situaciones en que la cantidad de hueso requerida para rellenar el defecto es pequeña. En estos casos se hace aún más difícil plantear un segundo campo quirúrgico para la obtención de una pequeña cantidad de hueso autólogo.

El huesoparticulado obtenido mediante la técnica descrita por Anitua et al.<sup>3</sup>, es conocido como fresado biológico. Con esta técnica la cortical se fresa a 800 rpm con irrigación, y la preparación del lecho del implante se realiza a bajas revoluciones (20 a 80 rpm) y sin irrigación para preservar las propiedades biológicas del tejido. Con esta técnica es posible recolectar una cantidad de hueso generalmente suficiente para cubrir la necesidad de aumento de reborde o de relleno del alveolo en casos de implantes postextracción, sin necesidad de recurrir a zonas donantes.

### **Osteoblastos**

Son las células que se encargan de la síntesis y secreción de la matriz orgánica que forma el tejido óseo. Se originan en la médula ósea, de las células

pluripotencialesmesenquimales y se localizan en las superficies activas el hueso <sup>4,5</sup>.

La formación del tejido óseo está compuesta por cuatro fases básicas:

- Diferenciación de los osteoblastos a partir de células madre.
- Secreción de la matriz orgánica por parte de los osteoblastos.
- Mineralización de la matriz orgánica.
- Activación de los osteoclastos para iniciar el proceso de reabsorción.

Tanto *in vivo* como *in vitro*, los osteoblastos pasan por tres estadios funcionales: proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea; maduración de la matriz ósea y depósito mineral <sup>6</sup>.

Existen indicadores de los distintos grados de desarrollo y maduración del osteoblasto; en estudios *in vitro*, se ha comprobado que la síntesis de colágeno tipo I disminuye con la maduración, la actividad fosfatasa alcalina decrece con la mineralización, la osteopontina aparece antes que otras proteínas como la sialoproteína y la osteocalcina<sup>7</sup>.

## **OBJETIVOS**

Con nuestro estudio evaluaremos la posible influencia que pueden tener dos técnicas de recogida de hueso sobre diferentes parámetros celulares. Para ello hemos utilizado cultivos primarios de osteoblastos humanos obtenidos de muestras óseas recogidas mediante las dos técnicas anteriormente mencionadas.

Con el objeto de aportar nuevos datos en relación a lo expuesto nos proponemos los siguientes objetivos:

- 1.** Comprobar la presencia de osteoblastos viables en muestras de tejido óseo obtenido mediante fresado biológico y en muestras de bloque de hueso córtico-esponjoso.
- 2.** Comparar la capacidad proliferativa y la viabilidad de las líneas celulares establecidas a partir de ambas muestras mediante el ensayo MTT, a las 24 y a las 48 horas de cultivo.
- 3.** Comparar la capacidad para formar nódulos mineralizados de las 2 líneas celulares establecidas, mediante el cultivo en medio de mineralización, con el objeto de comprobar que la capacidad de diferenciación celular no se ve afectada por estas técnicas de recogida de hueso.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO ÓSEO**

Los explantes de hueso proceden de osteotomías realizadas en extracciones de terceros molares del Máster de Cirugía Bucal e Implantología de la Facultad de Odontología. En el estudio participaron cinco voluntarios sanos, tres hombres y dos mujeres. La edad de los voluntarios estaba comprendida entre los 20 y los 30 años. Se recogieron un total de diez muestras, dos de cada paciente (una muestra de bloque córtico-esponjoso, y otra de fresado biológico).

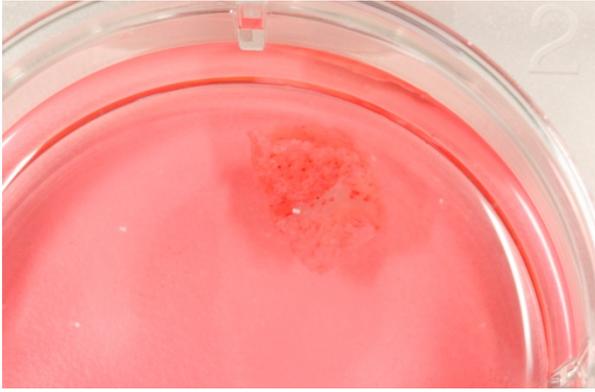
Las muestras fueron obtenidas mediante trefina para la modalidad de injertos en bloque, y se recogió otra muestra de hueso en la cortical adyacente al sitio de la exodoncia mediante la técnica de fresado biológico descrita por Anitua et al., 2007<sup>3</sup>, a bajas revoluciones (20 a 80 rpm) y sin irrigación.

Los pacientes firmaron el consentimiento informado para la participación en este estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética para investigación en humanos de la Universidad de Granada.

Desde la recogida de las muestras hasta su cultivo en el laboratorio, el tiempo transcurrido fue inferior a 4 horas.

### **2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LOS OSTEÓBLASTOS**

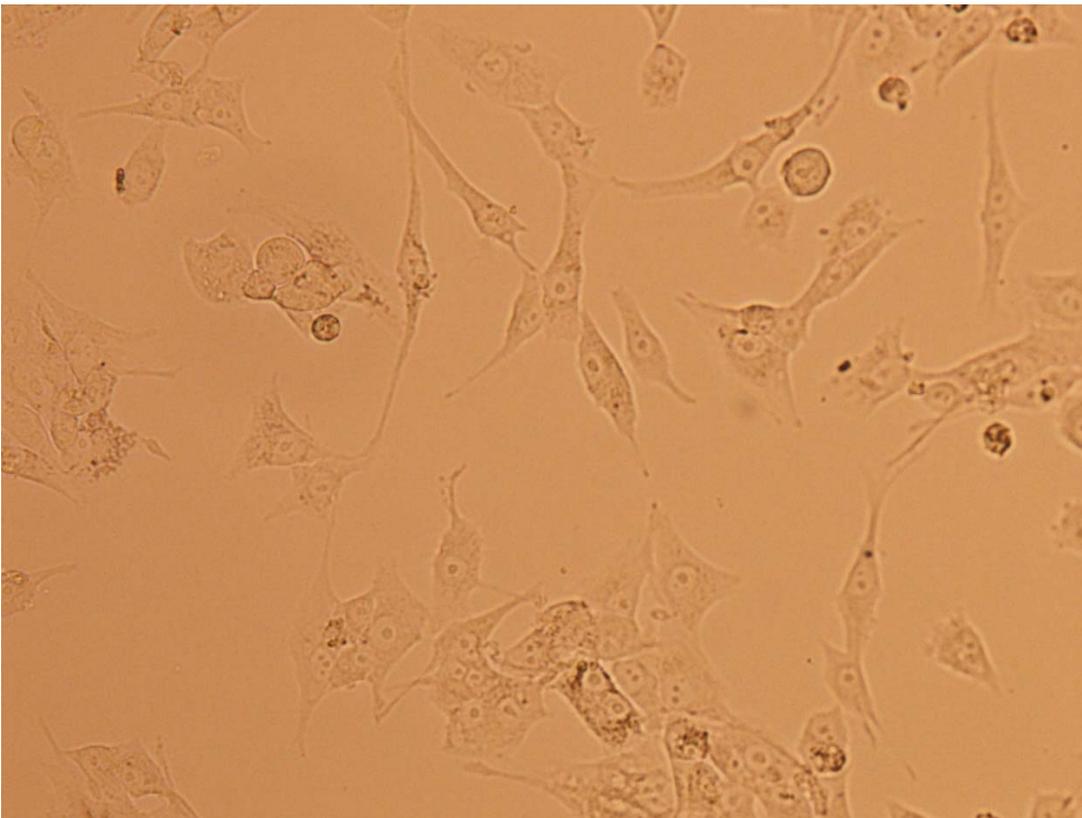
Los explantes de tejido óseo se lavan abundantemente con PBS estéril, para eliminar restos de periostio y tejido blando. Las muestras de tejido óseo se disponen en placas de cultivo de 6 pocillos. El medio para cultivo es el DMEM, suplementado al 20% con suero bovino fetal.



***Fig.1. Bloque de hueso córtico-esponjoso en medio de cultivo.***

Las muestras se mantuvieron a 37°C en una estufa de CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días.

Los primeros osteoblastos se observaron aproximadamente a la semana de realizar el cultivo. La semiconfluencia se alcanzó a los 15-20 días.

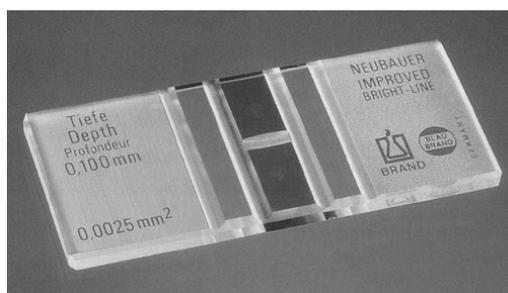


***Fig.2. Osteoblastos humanos en cultivo. Fotografía realizada con microscopio óptico invertido a 20x.***

A continuación se pasan las células a un frasco de cultivo, con superficie de 25 cm<sup>2</sup>, para

que puedan seguir proliferando.

Los osteoblastos cultivados según este procedimiento proliferan adheridos al frasco, y para cualquier manipulación es necesario despegarlos previamente con una solución de *tripsina-EDTA*. El sobrenadante se centrifuga a 1200 rpm y 7°C, 10 minutos. El botón celular obtenido se resuspende en nuevos frascos con medio de cultivo o se procede a trabajar con él. Es necesario ajustar la concentración celular a  $1 \times 10^4$  células por mililitro de suspensión. Para el recuento utilizamos una cámara de Neubauer.



**Fig.3. Cámara de Neubauer.**

### **3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y LA VIABILIDAD DE LOS OSTEOBLASTOS MEDIANTE EL ENSAYO MTT**

El ensayo MTT se basa en la reducción metabólica del *Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol* realizada por el enzima mitocondrial *succinato-deshidrogenasa* en un compuesto coloreado de color azul (*formazán*), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método se utiliza para medir la supervivencia y la proliferación celular<sup>8,9,10,11,12</sup>.

#### **3.1. Preparación del MTT**

Preparamos la solución MTT (Sigma, Basel, Switzerland) con 24 horas de antelación, conservándola a 4°C.

Despegamos las células osteoblásticas con tripsina-EDTA y las ajustamos a una concentración de  $1 \times 10^4$  células por mililitro. Disponemos dos placas de 24 pocillos de 2 ml cada uno, para realizar la lectura a las 24 horas, y a las 48 horas.

En cada una de las placas sembramos cinco pocillos de células de las dos procedencias (fresado biológico y bloques córtico-esponjosos). Ambas placas se colocan en la estufa y se incuban a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>, una de ellas 24 horas, y la otra 48 horas, para dar tiempo a los osteoblastos a que proliferen.

### **3.2. Ensayo MTT a las 24 y 48 horas**

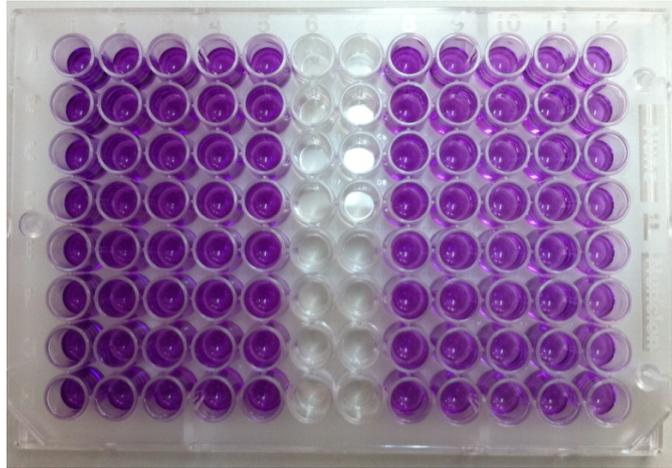
Retiramos el medio de cultivo, y lavamos con medio DMEM sin rojo fenol, para evitar errores al realizar la lectura en el espectrofotómetro. Volvemos a añadir 1ml de DMEM sin rojo fenol a cada uno de los pocillos.

Añadimos 100 microlitros de MTT a cada pocillo e incubamos durante 4 horas a 37°C. Retiramos el sobrenadante y añadimos 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO; Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) en cada pocillo. Agitamos en un agitador eléctrico media hora para que el dimetilsulfóxido pueda solubilizar los cristales de formazán que se habían formado previamente. El líquido contenido en los pocillos pasa del color amarillento inicial a un color morado, más o menos intenso en función de la densidad celular.

Trasparamos el sobrenadante de los pocillos (placa de 24), a otros más pequeños de una placa de 96 pocillos (Falcon, BectonDickinsonLabware, N.J., USA). El contenido de cada uno se dispone en 8 pocillos diferentes, a razón de 100 microlitros por pocillo.



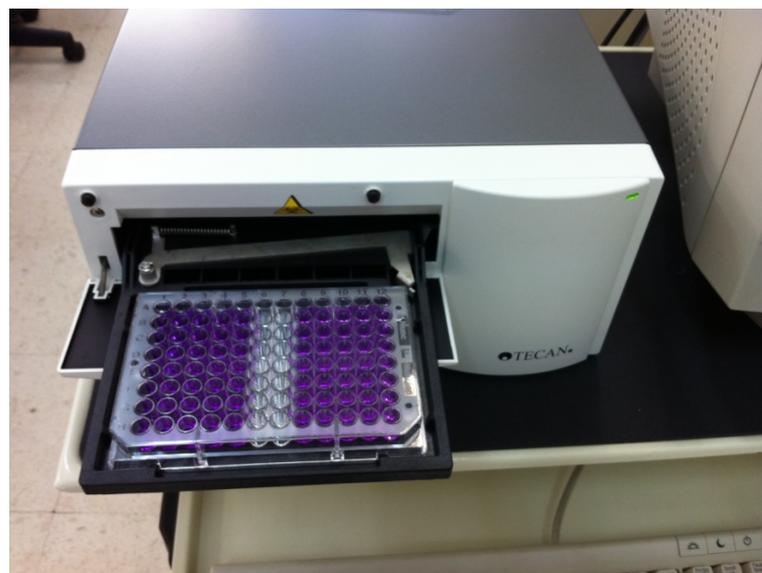
***Fig.4.A. Placa de 24 pocillos con MTT.***



***Fig.4.B. Placa de 96 pocillos con MTT preparada para su lectura en el espectrofotómetro.***

La lectura se realiza en un espectrofotómetro a 570nm (TECAN *Sunrise*<sup>™</sup>), con el programa *XFluor*<sup>™</sup>, basado en *Microsoft Excel*®. La absorbancia de cada pocillo es directamente proporcional al número de células viables.

La misma experiencia se realiza a las 48 horas de incubación con la otra placa de cultivo.



***Fig.5. Espectrofotómetro (TECAN *Sunrise*<sup>™</sup>), para lectura del MTT.***

#### **4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE MINERALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS EN CULTIVO**

La capacidad de diferenciación de los osteoblastos y de mineralización de la matriz extracelular puede evaluarse mediante la formación de nódulos citoplasmáticos al estar expuestas las células durante cierto tiempo a un medio que favorece la mineralización, o medio osteogénico. Estos nódulos pueden teñirse con *alizarina*. El medio de cultivo es el habitual, pero a este fin se le añaden *beta glicerol fosfato* (1,35 g/l), y *ácido ascórbico* (0,011 g/l).

Preparamos dos suspensiones celulares con osteoblastos de las dos procedencias disueltos en el medio de mineralización y se colocan en un agitador eléctrico para conseguir la mayor homogeneidad posible.

Sembramos la dilución en tres placas de seis pocillos cada una. Sólo utilizaremos tres pocillos por cada placa, a razón de 5ml por pocillo (15 ml de la suspensión celular por cada una de las tres placas). Se repite el proceso hasta rellenar tres placas con la suspensión celular procedente del fresado biológico, y otras tres placas con la suspensión procedente del bloque cortico-esponjoso. Las células se incuban a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

##### **4.1. Fijación y tinción de los osteoblastos con *alizarina***

Cada una de las tres placas de las diferentes suspensiones celulares será fijada y teñida (lectura) con *alizarina* un día diferente. La primera el día 7, la segunda el día 15, y la tercera el día 22.

El medio osteogénico deberá ser renovado con periodicidad. El cronograma de la experiencia es el siguiente:

- Día 0: siembra de las suspensiones celulares en cada una de las placas de seis pocillos.
- Día 4: cambio del medio osteogénico a cada uno de los pocillos.
- Día 7: lectura de la primera de las tres placas. Retiramos el medio de mineralización, fijamos y teñimos las células tal y como se describe al final del cronograma. Cambiamos el medio de las otras dos placas restantes.
- Día 11: cambio de medio.

- Día 15: lectura de la segunda de las placas. Cambio del medio a los tres pocillos de la placa restante.
- Día 18: cambio de medio a la placa restante.
- Día 22: lectura de la última placa.

Con cada una de las dos líneas celulares los mismos días.

Los reactivos necesarios para realizar la lectura de las placas (fijación y tinción) son los siguientes:

- Solución salina: NaCl 150 mM 8,9 g/ L.
- Etanol 70%, H<sub>2</sub>O destilada 30%.
- Alizarina al 2% en tampón pH 4 NaOH (Sigma-Aldrich, Toluca, México)
- PBS.
- H<sub>2</sub>O destilada.

Para realizar la lectura seguiremos la siguiente metodología:

- Retiramos el medio de cultivo de cada uno de los tres pocillos de cada placa.
- Lavamos con solución salina.
- Fijamos con 1 ml de etanol al 70% frío durante 5 minutos.
- Enjuagamos los pocillos 3 veces con agua destilada.
- Añadimos 1ml de *alizarina* roja al 2% a cada pocillo y esperamos 10 minutos hasta que se tiñan los nódulos de mineralización existentes.
- Por último, lavamos 5 veces con agua destilada y una vez más con PBS.

Las placas son almacenadas en lugar húmedo hasta proceder a la cuantificación de los nódulos presentes en cada placa.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las experiencias realizadas para cada objetivo de este trabajo se repitieron al menos tres veces.

Los datos recogidos fueron tratados y analizados mediante el programa informático SPSS versión 17.0 (Statistical Program for Social Science) para Windows 7.

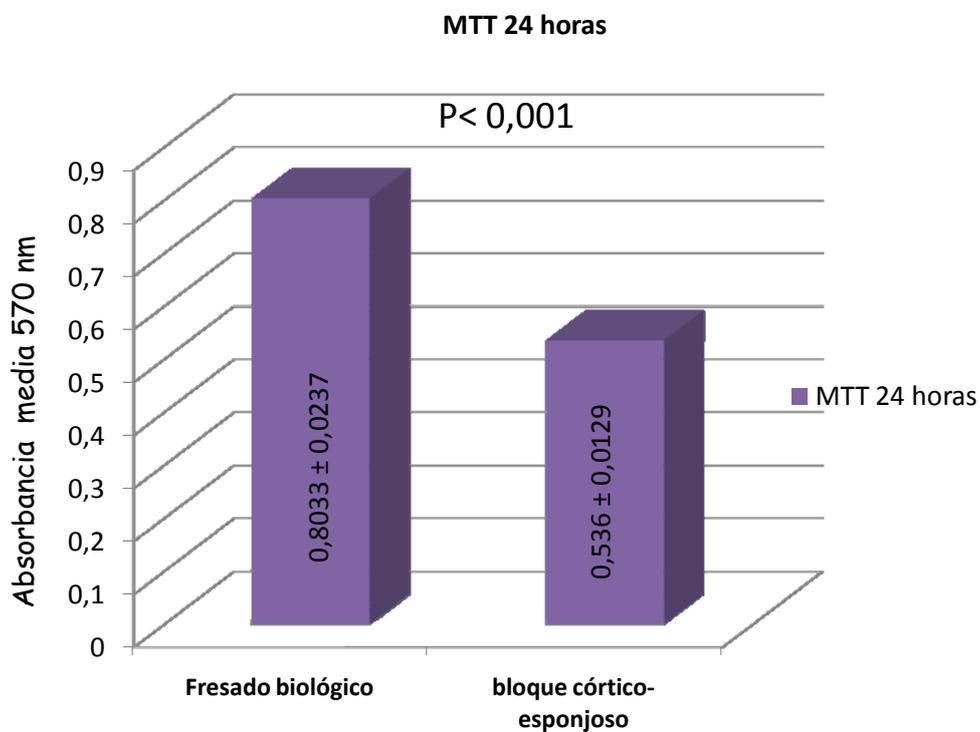
Al ser todas las variables de interés continuas, los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación típica.

Las diferencias estadísticas entre los distintos grupos estudiados se evaluaron con el test T-Student, considerando significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

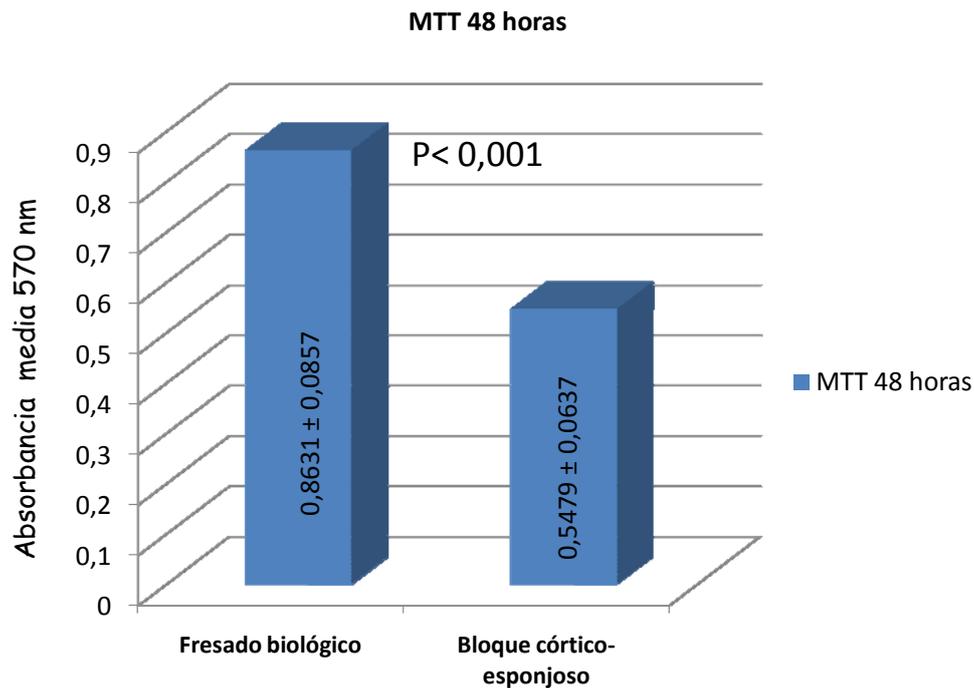
## RESULTADOS

### 1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO MTT.

Los resultados de los ensayos MTT realizados a las 24 horas y a las 48 horas se expresan en las **figuras 4 y 5**:



*Fig.4. Medida de la viabilidad y proliferación celular de los osteoblastos humanos en cultivo procedentes del fresado biológico con respecto a los procedentes de bloques córtico-esponjosos mediante ensayo MTT a las 24 horas. Los resultados se expresan como la absorbancia media  $\pm$  la desviación típica de cada una de las líneas celulares estudiadas a 570 nm.*



*Fig.5. Medida de la viabilidad y proliferación celular de los osteoblastos humanos en cultivo procedentes del fresado biológico con respecto a los procedentes de bloques córtico-esponjosos mediante ensayo MTT a las 48 horas. Los resultados se expresan como la absorbancia media  $\pm$  la desviación típica de cada una de las líneas celulares estudiadas a 570 nm.*

La absorbancia media para los osteoblastos procedentes del fresado biológico es notablemente superior que para la línea celular procedente de los bloques de hueso córtico-esponjosos tanto a las 24 horas de cultivo como a las 48 horas. Por tanto, se observa que la viabilidad y la capacidad de proliferación de los osteoblastos aislados a partir del fresado biológico es mayor que la de los osteoblastos aislados a partir de los bloques de hueso córtico-esponjosos.

El análisis estadístico entre los dos grupos estudiados muestra que las diferencias observadas son significativas con un valor de  $p \leq 0,001$  tanto en los ensayos a las 24 horas como a las 48 horas.

## 2. CAPACIDAD DE MINERALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS HUMANAS EN CULTIVO

En la *tabla 1* se expresan los resultados obtenidos:

	7 días		15 días		22 días	
	Nº nódulos	Tamaño nódulos	Nº nódulos	Tamaño nódulos	Nº nódulos	Tamaño nódulos
<b>OSH</b>	-	-	+	40-80 	++	130-350 
<b>OSF</b>	-	-	+	50-90 	++	133-360 

*Tabla 1. Número y tamaño de los nódulos sintetizados por los osteoblastos de ambas líneas celulares a los 7, 15 y 22 días de cultivo en medio de mineralización.*

*OSH* = osteoblastos procedentes de los bloques de hueso córtico-esponjoso.

*OSF* = osteoblastos procedentes del fresado biológico.

### Número de nódulos:

- $\longrightarrow$  No hay presencia de nódulos en ninguno de los pocillos.
- +  $\longrightarrow$  De 5 a 20 nódulos por pocillo.
- ++  $\longrightarrow$  Más de 20 nódulos por pocillo.

Se procedió a realizar un análisis semicualitativo, por recuento del número de nódulos mediante microscopía óptica a diferentes aumentos.

Como se muestra en la *tabla 1*, a los 7 días de cultivo no se observa la presencia de nódulos de mineralización en ninguno de los pocillos estudiados.

A los 15 días de cultivo observamos la existencia de nódulos en todos los pocillos estudiados, lo que indica que los osteoblastos ya han comenzado a diferenciarse y a mineralizar la matriz de colágeno. La presencia de nódulos aún no es muy notable, y el tamaño de los mismos es variable.

En las placas fijadas a los 22 días de cultivo, la diferenciación osteoblástica es mucho mayor, observándose un gran número de nódulos, y de mayor tamaño.

No se encontraron diferencias apreciables entre las dos líneas celulares cultivadas, ni en el número de nódulos ni en el tamaño de los mismos.

## DISCUSIÓN

El material idóneo o *goldstandard* en los procedimientos reconstructivos es el hueso autógeno, porque contiene proteínas como las BMPs, minerales y células óseas vitales<sup>2</sup>.

Los injertos óseos autógenos en bloque, en comparación con el hueso medular particulado, han sido asociados con una reducción de la actividad osteogénica<sup>14</sup> y con una disminución de la revascularización. Enneking y col.<sup>15,16</sup> señalan que en los injertos de hueso autógeno cortical la mayor parte de su estructura interna nunca se revasculariza, y por tanto no se reemplaza por hueso viable.

El fresado biológico permite recolectar hueso autólogo durante la preparación del lecho del implante, subsanando la necesidad de recoger hueso de un segundo campo quirúrgico<sup>3</sup>.

En el fresado convencional se utiliza irrigación con suero salino para disminuir el trauma y el calentamiento del hueso durante la preparación del lecho implantológico<sup>18</sup>. Sin embargo, la irrigación puede lavar las proteínas de señal y otras sustancias solubles presentes en la matriz extracelular del hueso, como las BMPs, factores de crecimiento, y otras proteínas sintetizadas en respuesta a la agresión producida por el fresado, que pueden tener un papel activo en la regeneración ósea<sup>19</sup>. Muchas de estas proteínas se caracterizan por su bajo peso molecular y por su solubilidad, por lo que la irrigación salina las disuelve fácilmente, separando así al tejido óseo de los recursos naturales que utiliza para curarse a si mismo<sup>20</sup>. La eliminación de estas moléculas puede evitarse mediante el fresado biológico, ya que se lleva a cabo a bajas revoluciones y sin irrigación.

Hemos comparado dos formas de recogida de injertos óseos intraorales, evaluando la viabilidad de ambas, y resaltando las posibles diferencias derivadas de la propia técnica, como los sucesos derivados del trauma al que es sometido el hueso al realizar el fresado del lecho para los implantes (calor, fricción, etc).

El ensayo MTT revela que la viabilidad y proliferación de las células aisladas a partir de fresado biológico es significativamente mayor a las 24 horas de cultivo y a las 48 horas. Para explicar este hecho, hemos de conocer que la recogida de las partículas de hueso mediante fresado biológico implica un proceso en el que se genera energía en forma de calor. Esa energía liberada por las fresas del sistema de implantes es transmitida al hueso del lecho implantario y por tanto, creemos que también puede ser captada por las células óseas presentes en las partículas de hueso recogidas durante el fresado. Este hecho está en concordancia con otros estudios en los que se realiza una estimulación *in vitro* de los

osteoblastos mediante otros tipos de energía de baja intensidad, como diferentes tipos de láser o las ondas de choque, traduciéndose esta estimulación en un aumento de la proliferación y de la viabilidad de las células a las que se les había aplicado esta energía<sup>21,22</sup>.

Se ha descrito un efecto estimulador de la línea de osteoblastos SaOS-2 mediante el uso del láser ND:YAG, traducido en un aumento de la viabilidad y proliferación de los mismos, cuando son irradiados con bajos niveles de energía. Sin embargo, describe un efecto inhibitorio cuando las mismas células reciben altos niveles de energía<sup>23</sup>.

Otros autores han investigado los efectos de la fototerapia con láser sobre el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos humanos *in vitro*<sup>24,25</sup>. Stein et al.<sup>22</sup> indican que ésta tiene un efecto bioestimulante sobre las células osteoblásticas humanas durante las primeras 72 horas tras la irradiación. Estudios histológicos en animales han demostrado que la fototerapia láser puede promover e incrementar la aposición de fibras de colágeno por parte de los osteoblastos, lo que puede acelerar el proceso de reparación ósea<sup>26,27,28</sup>. Otros estudios son controvertidos, y no muestran una influencia significativa del uso de la terapia con láser sobre la proliferación y la viabilidad de los osteoblastos<sup>29</sup>.

La aplicación de energía en forma de ondas de choque sobre el tejido óseo ha demostrado efectos osteogénicos cuando se aplican la energía y las pulsaciones adecuadas. Entre estos efectos señalamos la destrucción selectiva de los osteocitos, estimulación del crecimiento de las células estromales de la médula ósea, diferenciación hacia osteoprogenitores, e incremento en la proliferación y la actividad de los osteoblastos. Esta actividad está asociada con la producción de TGFβ1, que juega un papel importante regulando y estimulando la diferenciación de las células osteoprogenitoras durante la reparación de fracturas<sup>30</sup>.

Respecto al estudio de la capacidad de mineralización de los osteoblastos humanos cultivados de las líneas celulares de las dos procedencias, ambas líneas celulares son capaces de producir depósitos de sales cálcicas en forma de nódulos, al ser cultivadas en medio de mineralización. También podemos decir que los nódulos aumentan en número y tamaño con el paso del tiempo, pero no podemos demostrar que existan diferencias significativas ni en el número, ni en el tamaño de los nódulos cuando comparamos una línea celular con otra, lo que nos permite afirmar que no hay cambios en la diferenciación celular.

Nuestros resultados están en concordancia con artículos en los que se aplica energía de baja intensidad mediante láser a los cultivos de osteoblastos, sin efecto significativo sobre la diferenciación de los mismos<sup>31</sup>. Por tanto, el efecto de las energías de baja intensidad sobre la diferenciación y la capacidad de formar nódulos mineralizados de los cultivos de osteoblastos

es bastante controvertido.

Otros autores demuestran que la irradiación con energía láser de baja intensidad produce un aumento significativo en el número de células y en la formación de nódulos mineralizados tras 21 días de cultivo <sup>32</sup>.

Asimismo, estos estudios sugieren que los efectos de la aplicación de energía de baja intensidad sobre la mineralización de los osteoblastos pueden estar relacionados con un incremento temprano de la proliferación celular, pero no existe efecto directo sobre la diferenciación osteoblástica<sup>33</sup>.

Por último, señalar que los resultados obtenidos en este trabajo deben ser tomados con precaución, puesto que es relativamente difícil extrapolar los datos obtenidos *in vitro*, a lo que ocurre clínicamente cuando realizamos técnicas de injerto óseo a nivel intraoral.

## CONCLUSIONES

1. Tanto de las muestras procedentes de fresado biológico, como de las de bloque cortico-esponjoso se pueden aislar y cultivar osteoblastos humanos.
2. El ensayo MTT muestra mayor proliferación de las líneas celulares establecidas a partir de la muestra de fresado biológico, a las 24 y a las 48 horas. Esta diferencia es estadísticamente significativa, lo que parece indicar que el hueso particulado obtenido del fresado a bajas revoluciones, pudiera tener un mejor rendimiento al ser utilizado como injerto de hueso respecto a los bloques cortico-esponjosos.
3. Los osteoblastos aislados a partir de los distintos tipos de muestras son capaces de producir nódulos de mineralización cuando son cultivados en medio específico para ello. El número y tamaño de los nódulos aumenta a lo largo del tiempo de cultivo, pero no existen diferencias apreciables entre los observados en los cultivos de una línea celular u otra, lo que nos permite afirmar que no existe alteración en la diferenciación celular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22 Suppl:49-70.
2. Hunt DR, Jovanovic SA. Autogenous bone harvesting: a chin graft technique for particulate and monocortical bone blocks. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999;19(2):165-173.
3. Anitua E, Carda C, Andia I. A novel drilling procedure and subsequent bone autograft preparation: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(1):138-145.
4. Ducy P, Karsenty G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1998;10(5):614-619.
5. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev*. 2000;21(2):115-137.
6. Lian JB, Stein GS. The developmental stages of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF beta 1) and hormones (vitamin D and glucocorticoids). *J Oral Implantol*. 1993;19(2):95-105; discussion 136-137.
7. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*. 1995;17(2 Suppl):77S-83S.
8. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys*. 1993;303(2):474-482.
9. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987;47(4):936-942.
10. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 1986;89(2):271-277.
11. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods*. 1990;131(2):165-172.
12. Ferreira CF, Carriel Gomes MC, Filho JS, et al. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(4):456-460.
13. Ormerod. *Flow cytometry: a practical approach*. Oxford: Oxford University press; 2000.

14. Marciani RD, Gonty AA, Synhorst JB 3rd, Page LR. Cancellous bone marrow grafts in irradiated dog and monkey mandibles. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1979;47(1):17-24.
15. Hammack BL, Enneking WF. Comparative vascularization of autogenous and homogenous-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am.* 1960;42-A:811-817.
16. Enneking WF, Eady JL, Burchardt H. Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1980;62(7):1039-1058.
17. Benington IC, Biagioni PA, Briggs J, Sheridan S, Lamey P-J. Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(3):293-297.
18. Uchida S, Sakai A, Kudo H, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone.* 2003;32(5):491-501.
19. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am. J. Surg.* 1993;165(6):728-737.
20. Wang FS, Yang KD, Chen RF, Wang CJ, Sheen-Chen SM. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(3):457-461.
21. Stein E, Koehn J, Sutter W, et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2008;120(3-4):112-117.
22. Arisu HD, Türköz E, Bala O. Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci.* 2006;21(3):175-180.
23. Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006;38(4):332-336.
24. de Paula Eduardo C, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers Med Sci.* 2010;25(6):781-792.
25. Guzzardella GA, Fini M, Torricelli P, Giavaresi G, Giardino R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):216-220.
26. Miloro M, Miller JJ, Stoner JA. Low-level laser effect on mandibular distraction osteogenesis. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007;65(2):168-176.
27. Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(6):487-494.

28. Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, et al. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res*. 2001;4(1):3-14.
29. Martini L, Fini M, Giavaresi G, et al. Primary osteoblasts response to shock wave therapy using different parameters. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2003;31(4):449-466.
30. Evan AP, Willis LR, Lingeman JE, McAteer JA. Renal trauma and the risk of long-term complications in shock wave lithotripsy. *Nephron*. 1998;78(1):1-8.
31. Schiltz C, Marty C, de Vernejoul M-C, Geoffroy V. Inhibition of osteoblastic metalloproteinases in mice prevents bone loss induced by oestrogen deficiency. *J. Cell. Biochem*. 2008;104(5):1803-1817.
32. Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca J-P, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med*. 2009;41(4):291-297.
33. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1998;22(4):347-354.