

Estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de formulaciones acrílicas autocurables portadoras de bisfosfonatos de nueva síntesis

J. PARRA¹, M. FERNÁNDEZ², L. RODRÍGUEZ-LORENZO³,
B. VÁZQUEZ³, A. LÓPEZ-BRAVO¹, J. SAN ROMÁN³

¹Unidad Asociada CSIC-HP. Hospital Provincial, Complejo Hospitalario de Ávila. SACYL.

²Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

³Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC.

Resumen

En este trabajo se presenta el estudio de la biocompatibilidad *in vitro*, empleando cultivos celulares de fibroblastos embrionarios humanos, de tres sistemas acrílicos de liberación controlada de bisfosfonatos (BFs). Estos sistemas, basados en metacrilato de metilo (MMA), metacrilato de vitamina E (MVE) y trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA), han sido diseñados para su aplicación en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una elevada resorción osteoclástica. En su preparación se ha empleado un BP comercializado (alendronato; ALN) y dos de nueva síntesis, pertenecientes a la segunda y tercera generaciones, el ácido 1-hidroxi-2-[4-aminofenil]etano-1,1-difosfónico (APBP) y el ácido 1-hidroxi-2-[3-indolil]etano-1,1-difosfónico (IBP), respectivamente. La citotoxicidad de MVE ha sido notablemente inferior a la medida para TEGDMA. La citotoxicidad de APBP e IBP se ha comparado con la de ALN, obteniéndose unos valores para la concentración IC_{50} de 15,56, 9,86 y 6,25 mmol/l para APBP, ALN e IBP, respectivamente. Los niveles de citotoxicidad liberada han sido superiores para la formulación portadora de ALN, situándose a continuación los cementos cargados con IBP y APBP. Cuando los cultivos se han establecido sobre la superficie de las formulaciones, se han detectado unos niveles de proliferación celular y adhesión superiores para los sistemas de liberación de IBP y APBP, siendo además inferior en estos casos la mortalidad celular.

Palabras clave: Sistemas acrílicos inyectables, bisfosfonatos, biocompatibilidad, cultivos celulares.

Abstract

This paper reports the *in vitro* biocompatibility study, using human embryonic fibroblast cultures, of three acrylic systems for controlled release of bisphosphonates (BFs). These systems, that are based on methyl methacrylate (MMA), vitamin E methacrylate (MVE) and triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA), have been designed for its application in the treatment of pathologies characterized by a high osteoclastic resorption. A commercial BP (alendronate; ALN) and two novel BPs, belonging to the second and third generations, 1-hydroxy-2-[4-aminophenyl]ethane-1,1-diphosphonic acid (APBP) and 1-hydroxy-2-[3-indolyl]ethane-1,1-diphosphonic acid (IBP), respectively, have been used in their preparation. The cytotoxicity of MVE has been notably lower than that measured for TEGDMA. Cytotoxicity of APBP and IBP was evaluated along with that of ALN, and the following values of the IC_{50} concentration were obtained for APBP, ALN and IBP respectively: 15.56, 9.86 and 6.25 mmol/l. The cytotoxicity levels obtained from the extracts of the cured systems were higher for the formulation containing ALN, followed by the cements loaded with IBP and APBP. When the cultures were seeded directly on the formulations surface, higher levels of cellular proliferation and adhesion were obtained for the systems containing IBP and APBP, the cellular mortality being also inferior in these cases.

Key Words: Acrylic injectable systems, bisphosphonates, biocompatibility, cell cultures.

Introducción

A pesar de que los cementos óseos acrílicos autocurables basados en poli(metacrilato de metilo) (PMMA) se emplean con éxito en cirugía ortopédica desde hace varias décadas [1], estos biomateriales presentan características susceptibles de ser optimizadas mediante la incorporación de modificaciones en su formulación, que repercutan positivamente sobre su interacción con el organismo receptor. Entre los factores negativos que conlleva el uso de este tipo de formulaciones se encuentra la liberación de radicales libres tras el fraguado del cemento, hecho que supone un incremento en los niveles de citotoxicidad y se deriva de la gran reactividad que presentan los radicales libres hacia células y tejidos. En trabajos anteriores se ha completado la obtención del monómero metacrilato de á-tocoferilo (MVE) a partir de vitamina E [2], con el objetivo de incorporar su actividad antioxidante sobre formulaciones autocurables basadas en PMMA [3, 4]. La vitamina E impide la acumulación de peróxidos, protege a las células de los efectos dañinos producidos por los radicales libres, proporciona estabilidad e integridad a las membranas biológicas y protege el cartílago contra la peroxidación lipídica celular, favoreciendo la remodelación y crecimiento de hueso normal. Se ha demostrado así mismo que esta vitamina posee actividad osteoprotectiva [5], antiinflamatoria [6] y anticancerígena [7]. Con el objetivo de incorporar este conjunto de propiedades sobre un sistema acrílico, se ha desarrollado una formulación a partir de PMMA, tras la sustitución de un 20% p/p del monómero MMA, con respecto a la fase líquida polimerizable, por MVE, y un 10% con respecto a esta misma fase por trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA) [4]. Este sistema acrílico sin carga (SASC) se ha ensayado como un sistema de liberación de bisfosfonatos.

Los bisfosfonatos (BFs) son análogos estables de los pirofosfatos endógenos y contienen dos grupos fosfonato unidos a un átomo de carbono, formando una estructura «P-C-P» (Figura 1a y 1b).

Correspondencia:

Juan Parra Cáceres

Unidad de Biopatología Experimental Asociada CSIC-HP. Hospital Provincial, Complejo Hospitalario de Ávila. SACYL.

C/ Jesús del Gran Poder, 42. 05003-Ávila, España.

E-mail: juanparracaceres@ono.com

jp_cac@hotmail.com

Telf. 920 35 72 09. Fax. 920 35 72 03

La utilización clínica de los BPs ha crecido intensamente durante la pasada década, habiéndose aplicado en el tratamiento de patologías en las que se presentan fenómenos de resorción osteoclástica [8-10] como son la osteoporosis, la enfermedad de Paget o los procesos de hipercalcemia asociados a destrucción ósea por invasión tumoral. La estructura tridimensional de los BFs favorece la formación de enlaces bidentados con metales divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}). La afinidad por el Ca^{2+} puede incrementarse si la cadena R_1 es un grupo hidroxilo (OH) o amino primario (NH_2), debido a que la conformación resultante va a permitir una captación de Ca^{2+} más eficiente. Los grupos que ocupen el segundo átomo de carbono libre van a determinar la potencia anti-resortiva del bifosfonato, pudiéndose obtener compuestos de primera generación, con sustituyentes simples unidos al carbono central y una actividad anti-resortiva relativamente débil, de segunda generación, marcadamente más potentes y caracterizados por la presencia de una cadena alifática con un único átomo de nitrógeno (N-BFs), y compuestos de tercera generación, caracterizados por la presencia de un sustituyente heterocíclico que contiene un átomo de nitrógeno en un anillo pirimidil (risedronato) o dos átomos de nitrógeno en un anillo imidazol (ácido zoledrónico) [10,11]. Estos últimos compuestos, son los BFs que exhiben una mayor actividad anti-resortiva e inhibidora, que puede llegar a ser 10.000 veces superior a la exhibida por los compuestos de primera generación.

Con el fin de lograr la incorporación exitosa de BPs en cementos acrílicos, se han sintetizado dos nuevos aminobisfosfonatos, pertenecientes a la segunda y tercera generación, a partir de ácido 4-(aminometil) benzoico y ácido 3-indolil acético, para obtener ácido 1-hidroxi-2-[4-aminofenil]etano-1,1-difosfónico (APBP) y ácido 1-hidroxi-2-[3-indolil]etano-1,1-difosfónico (IBP), respectivamente (Figuras 1c y 1d). En estudios previos se ha completado la preparación y caracterización físico-química de sistemas acrílicos autocurables cargados con un 1,5% p/p de IBP, APBP y un BF comercializado, el alendronato (ALN) [12], obteniéndose unos resultados prometedores (Tabla 1).

En este trabajo se va a abordar el estudio de la interacción de este conjunto de materiales con sistemas biológicos *in vitro* empleando cultivos de fibroblastos embrionarios humanos, con los objetivos que se enumeran a continuación. Se va a cuantificar la citotoxicidad de los monómeros y fármacos de nueva síntesis que participan en la composición de estos sistemas, mediante la

utilización de los reactivos MTT [13] y *Alamar Blue*TM (AB), así como la toxicidad derivada de la liberación de componentes citotóxicos por parte de los sistemas sintetizados al medio circundante, y la viabilidad celular resultante gracias al empleo del reactivo MTT [14,15] y la aplicación de técnicas de microscopía óptica. Se va a analizar la proliferación y adhesión celular directamente sobre la superficie de las formulaciones, mediante el empleo de los reactivos AB [16-18] y Hoechst 33258 [19,20] y la aplicación de técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB). Por último, se va a estimar la mortalidad celular en cultivos establecidos sobre la superficie de las formulaciones, merced a la cuantificación de los niveles de enzima lactato deshidrogenada (LDH) liberada por las células lisadas al medio de cultivo [21,22]. La aplicación de este conjunto de técnicas ha de permitir determinar el grado de biocompatibilidad *in vitro* de las formulaciones estudiadas, así como la influencia que tiene su superficie sobre la proliferación y adhesión celular.

Materiales y Métodos

Materiales

Se han empleado fibroblastos embrionarios humanos, cultivados sobre frascos y placas de cultivo (Sarstedt), a 37 °C en una atmósfera húmeda

con un 5% de CO₂. En su mantenimiento se ha empleado medio mínimo esencial de Eagle modificado con HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico] (MEM; Sigma), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Gibco), un 2% de glutamina 200 mM (Sigma) y un 1% de una solución de penicilina-estreptomicina (10000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomicina; Sigma). El medio de cultivo se ha cambiado a intervalos de tiempo adecuados, empleando tampón fosfato salino (PBP; Sigma) como medio de lavado. Las muestras se han subcultivado antes de alcanzar la confluencia empleando tripsina (Sigma).

Se han empleado muestras líquidas de los monómeros, pulverulentas de los bisfosfonatos y discos (10 mm de diámetro y 1 mm de espesor) de los distintos sistemas curados. En todos los casos las muestras se han esterilizado con óxido de etileno. Como control negativo se ha empleado Thermanox® (TMX), suministrado por Labclinics S. L., y como control positivo una solución acuosa de Triton x-100 (Aldrich). Los reactivos MTT [bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], Hoechst 33258 (bisbenzimidida), el kit de detección de enzima LDH [Cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio] y la sal sódica de ácido desoxirribonucleico de timo de ternera han sido suministrados por Sigma, mientras que el reactivo AB fue suministrado por Serotec y

	PMMA	SASC	ALN	IBP	APBP
Tiempo de estado pastoso (min) [D.S.]	6,5 [0,2]	9,7 [0,3]	8,0 [0,1]	4,5 [0,2]	5,0 [0,1]
Tiempo de trabajo (min) [D.S.]	10,1 [0,5]	16,3 [1,1]	16,1 [0,9]	8,0 [1,2]	14,5 [1,1]
Tiempo de fraguado (min) [D.S.]	16,6 [0,8]	26,0 [1,1]	24,1 [1,1]	12,5 [1,0]	19,5 [0,9]
Temperatura máxima (°C) [D.S.]	64,5 [0,7]	44,0 [0,1]	44,8 [1,5]	50,5 [1,3]	50,6 [1,5]
Resistencia a compresión (MPa) [D.S.]	104 [3]	99 [6]	99 [10]	96 [5]	90* [6]
Módulo en compresión (GPa) [D.S.]	1,4 [0,1]	1,3 [0,1]	1,2 [0,2]	1,3 [0,1]	1,2 [0,2]
* La media presenta diferencias significativas con respecto a SASC (p<0,05).					

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de un cemento de PMMA, el sistema acrílico derivado de vitamina E sin carga (SASC) y los sistemas portadores de bisfosfonatos. D. S. es la desviación estándar

el MEM libre de rojo fenol fue suministrado por Gibco. El tampón sodio cacodilato 0,1M ha sido suministrado por Sigma y el glutaraldehído por Fluka.

Los análisis de datos se han realizado utilizando la aplicación informática *Statistica*TM.

Citotoxicidad de los monómeros y bisfosfonatos

Se ha preparado una serie de disoluciones (desde el 3% hasta el 0,0001% p/p), de los monómeros MVE y TEGDMA y de los BFs en MEM desprovisto de suero bovino fetal [13,23]. El MVE, de naturaleza hidrofóbica, se ha mezclado con el surfactante TWEEN 80 en una proporción aditivo:surfactante de 3:1 [13]. Paralelamente, se ha realizado la siembra de fibroblastos a una concentración de 11×10^4 células/ml en MEM, sobre placas de cultivo de 96 pocillos. Tras adicionar 100 μ l de concentrado de células en cada pocillo y cultivar estas placas durante 24 h, se ha intercambiado el medio por las disoluciones (n=8), incubándose las placas posteriormente durante otras 24 horas en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, se retiró el contenido de los pocillos, añadiendo en su lugar el reactivo que va a desencadenar la reacción colorimétrica. En el

caso de los monómeros, se ha empleado reactivo MTT diluido en PBS (0,05 g de MTT en 10 ml de PBS) y filtrado para obtener la disolución madre de MTT, que a su vez fue diluida al 10% en MEM. El reactivo MTT se mantuvo, de nuevo a 37 °C, durante 4 h, tras las que se extrajo el contenido de los pocillos para añadir en su lugar 100 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), que disolverá los cristales de formazan formados. Tras una agitación intensa de 20 s, se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm, en un lector Biotek ELX808IU. En el caso de los BFs el desarrollo del experimento ha sido similar, con la salvedad de que el reactivo empleado ha sido una solución de AB (10% de reactivo AB en MEM libre de rojo fenol), debido a la aparición de una interacción química entre el reactivo MTT y los bisfosfonatos IBP y APBP. A los valores de absorbancia obtenidos se les restó los medidos para el blanco, relativizándose el resultado con respecto al control negativo, que en este caso es el medio de cultivo libre de suero sin el aditivo, y con TWEEN 80 en los casos en los que este surfactante se haya incluido en el diseño, para obtener la viabilidad celular relativa. Por último, se ha construido una curva dosis-respuesta para la viabilidad celular

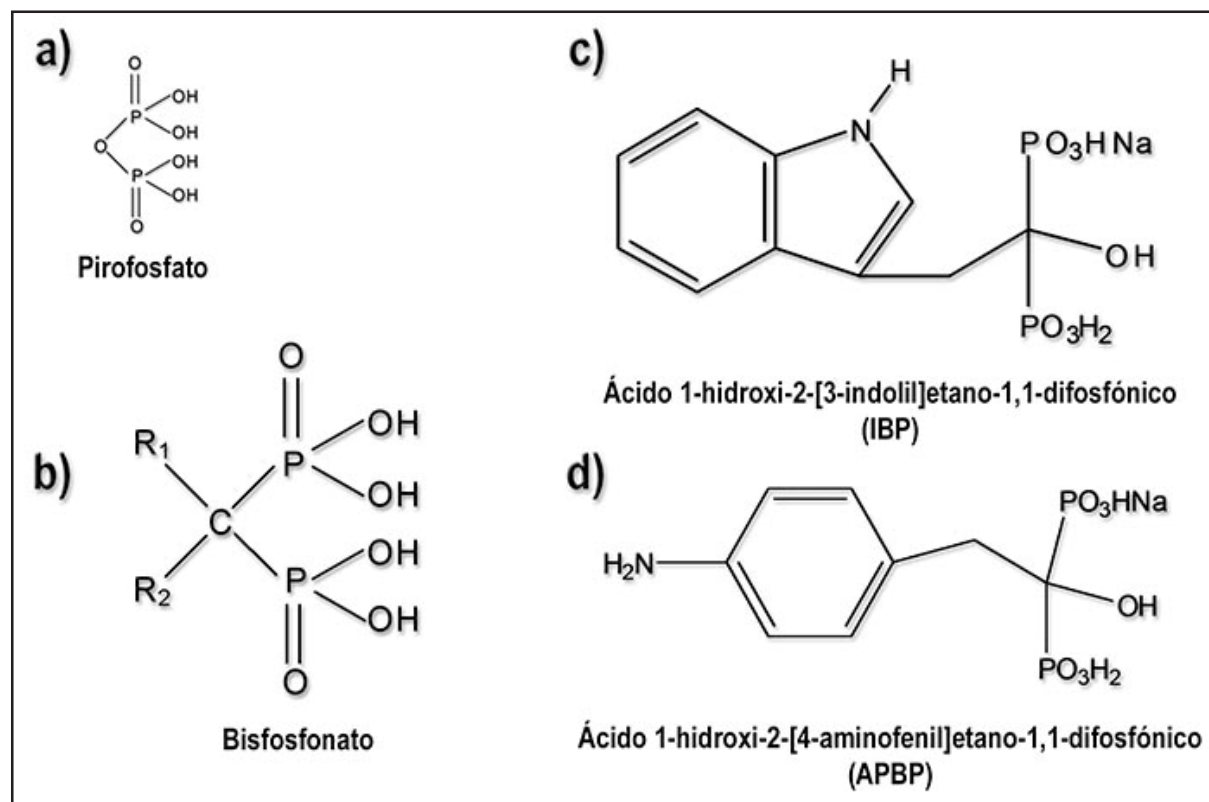


Figura 1. Estructura química de los pirofosfatos (a) y los bisfosfonatos (b). Fórmulas químicas de los bisfosfonatos sintetizados IBP (c) y APBP (d)

relativa que permitió calcular la concentración IC_{50} a la que sobreviven el 50% de las células presentes en el control negativo.

Cuantificación de la citotoxicidad liberada por los sistemas de liberación

Se incluyeron, en condiciones de esterilidad, las muestras de los materiales (4 réplicas) y el control negativo, TMX, en 5 ml de MEM completo a 37°C

y en agitación. Transcurridos 1, 2, y 7 días en estas condiciones, el medio o eluyente se extrajo para su uso posterior, siendo sustituido por otro fresco. Una vez colectados todos los eluyentes se realizó la siembra, a una concentración de 11×10^4 células/ml en MEM, sobre placas de 96 pocillos. Tras adicionar 100 μ l de concentrado de células en cada pocillo y cultivar estas placas durante 24 h, se intercambié el medio de cultivo por los eluyentes

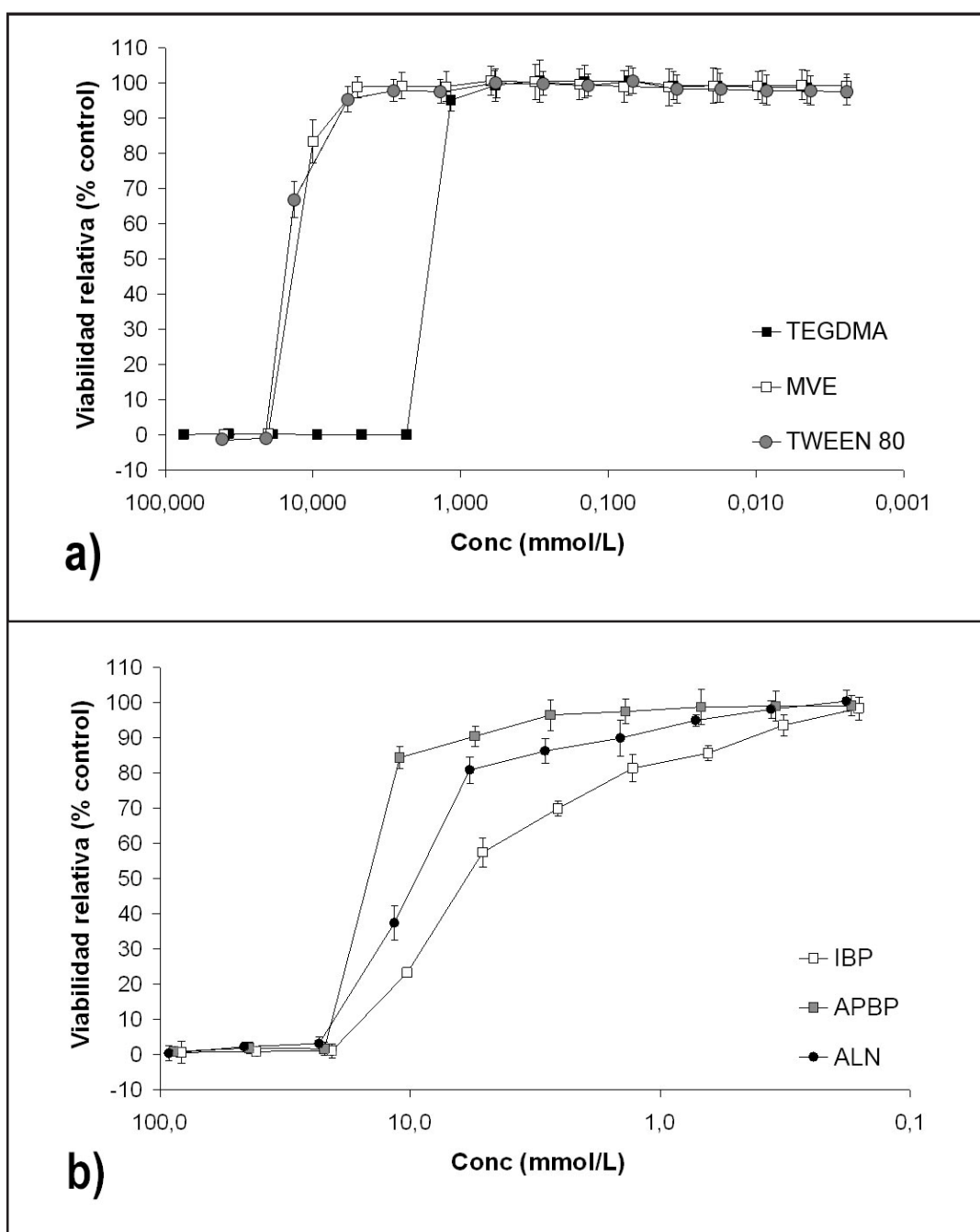


Figura 2. Comparación de las curvas dosis-repuesta obtenidas para los monómeros metacrilato de vitamina E (MVE) y trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA) y el surfactante TWEEN80 en el ensayo MTT (a); y para los bisfosfonatos ALN, IBP y APBP (b) en el ensayo AB. Cada punto representa la media \pm desviación estándar (n=8)

(a partir de cada réplica se rellenaron 4 pocillos, n=16), incubándose las placas posteriormente durante otras 24 h en las mismas condiciones. A continuación se retiraron los eluyentes, añadiendo en su lugar el reactivo MTT, que se mantuvo a 37 °C, durante 4 h. Transcurrido este tiempo, se extrajo el contenido de los pocillos y se añadió DMSO. Después de una agitación de 20 segundos, se realizó la lectura de densidad óptica a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm en un detector Biotek ELX808IU. Tras la lectura, se calculó la viabilidad relativa con respecto al control TMX y se realizó una serie de análisis de la varianza con el fin de comparar los resultados obtenidos para las formulaciones problema con respecto a este control.

Utilizando los eluyentes obtenidos a 1 y 2 días se han diseñado dos estudios que, mediante la observación de las muestras bajo microscopia óptica, van a permitir analizar la viabilidad y la morfología celular. Las preparaciones se realizaron a partir de cultivos de fibroblastos sembrados, a una concentración de $14^7 \times 10^4$ células/ml en MEM, sobre cubreobjetos de vidrio. El diseño del primero de los estudios conllevó el mantenimiento a 37 °C de los cultivos en MEM durante 24 h, transcurridas las cuales este medio se intercambiaba por el eluyente, que se mantuvo en contacto con las células durante otras 24 h a 37 °C. En el segundo de los estudios el eluyente se mantuvo durante 96 h. En ambos diseños las muestras se encontraban duplicadas. Una vez completados ambos periodos de incubación, se realizó la fijación histológica, una tinción hematoxilina-eosina y el montaje de las muestras, para analizarlas empleando un microscopio Nikon Eclipse E600 y fotografiarlas, utilizando una cámara digital Nikon DXM1200 acoplada al sistema óptico.

Estudio de la proliferación y adhesión celular sobre la superficie de los sistemas de liberación

Tras introducir las muestras (4 réplicas de cada material y del control TMX) en placas de 24 pocillos y realizar la siembra a una concentración de $14^7 \times 10^4$ células/ml, las placas se incubaron durante 21 días. A lo largo de este periodo, se realizaron 5 lecturas de densidad óptica a 1, 4, 7, 14 y 21 días, que comenzaron retirando el medio de cultivo y adicionando en su lugar una disolución al 10% del reactivo AB en MEM completo sin rojo fenol, que se mantuvo durante 4 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el contenido de las placas se reservó,

añadiendo en su lugar MEM completo para mantener el cultivo en perfectas condiciones [16]. El reactivo previamente extraído se trasvasó a placas de 96 pocillos (se rellenaron 4 pocillos a partir de cada muestra, n=16) para realizar la lectura de densidad óptica a 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm en un lector Biotek ELX808IU. A partir de las medidas tomadas se determinó y monitorizó temporalmente la proliferación celular que se desarrolló sobre la superficie de las formulaciones durante el periodo de estudio, contrastando mediante análisis de la varianza las diferencias existentes con respecto al TMX.

El estudio bajo MEB se completó tras sembrar un concentrado de células en MEM, a una concentración de $14^7 \times 10^4$ células/ml, directamente sobre la superficie de las formulaciones y el control TMX (en todos los casos por duplicado). Las muestras se mantuvieron durante 24 y 48 h en incubación, transcurridas las cuales se fijaron, sumergiéndolas durante 24 h en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón sodio cacodilato 0,1M, y metalizaron para su análisis bajo un microscopio electrónico de barrido ambiental Philips XL 30 a una aceleración de voltaje de 20 KeV.

La cantidad de ADN se determinó utilizando el reactivo Hoechst 33258. Para completar este ensayo se realizó la siembra, a una concentración de $14^7 \times 10^4$ células/ml en MEM, sobre la superficie de los materiales y el control TMX, en placas de 24 pocillos. Tras cultivar estas placas durante 1, 4, 7, 14 y 21 días, se provocó la lisis de las células y se tomó, por duplicado, una alícuota de 100 μ l del producto de esta lisis, que se mezcló con 100 μ l del reactivo Hoescht 33285 (1 μ g/ml) en una placa de 96 pocillos. Paralelamente se confeccionó un patrón de ADN (sal sódica de ácido desoxirribonucleico) a partir de timo de ternera, utilizando las concentraciones de 0, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,50, 5,00, 10,00 y 20,00 μ g/ml, en tampón citrato de sodio salino (CSS) a un pH de 7. Las muestras que componen este patrón también se mezclaron con el reactivo Hoescht en placas de 96 pocillos. Por último, se realizaron las lecturas de fluorescencia en un fluorímetro Biotek ELX800 a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. El contenido en ADN de cada muestra se calculó a partir de la curva construida con el patrón de ADN, comparándose los resultados obtenidos mediante análisis de la varianza.

Cuantificación de la muerte celular sobre la superficie de los copolímeros

Tras introducir las muestras de los materiales y el control negativo, por duplicado y en condiciones de esterilidad, en placas de 24 pocillos, se sembró sobre ellas un concentrado de fibroblastos en MEM (1 ml/pocillo a una concentración de 14×10^4 células/ml), manteniéndose las placas a 37 °C durante 1, 2 y 7 días, transcurridos los cuales el contenido de cada pocillo se retiró, reservándolo a -20°C para su posterior utilización. Una vez recogidas todas las muestras, se trasvasaron a placas de 96 pocillos (n=8). Tras mezclar los tres componentes de los que consta el kit colorimétrico (solución sustrato, cofactor y solución colorante), el producto resultante se adicionó a cada uno de los pocillos (50 μ l/pocillo). Tras mantener las muestras en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos, se adicionaron 10 μ l de HCl 1N por pocillo para detener la reacción, midiendo a continuación la densidad óptica de las muestras a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm en un colorímetro Biotek ELX808IU. Una vez completada la lectura, a los valores de absorbancia obtenidos se les restó los obtenidos para el blanco. Por último, se contrastó la existencia de diferencias significativas entre el control y las muestras, mediante una serie de análisis de la varianza.

Resultados y Discusión

Los efectos citotóxicos generados por los monómeros MVE y TEGDMA y el surfactante TWEEN 80 han sido evaluados mediante un ensayo MTT a partir de diluciones en medio de cultivo libre de suero, mientras que los producidos por los bisfosfonatos ALN, IBP y APBP se han cuantificado siguiendo el mismo protocolo, pero utilizando AB como reactivo. Los resultados obtenidos en ambos experimentos se muestran en las Figuras 2a y 2b, donde se representa el efecto causado por estos compuestos, en función de su concentración, sobre la viabilidad celular en cultivos de fibroblastos embrionarios humanos.

Los niveles de citotoxicidad exhibidos por el monómero MVE han sido notablemente inferiores a los obtenidos para el TEGDMA. La concentración IC_{50} obtenida para este último, de 1,71 mmol/l, se encuentra dentro del rango encontrado para dimetacrilatos con un número de cadenas oxietileno de 14 o inferior, que oscila entre valores IC_{50} de 1,06 y 1,97 mmol/l [13]. La participación del

monómero TEGDMA en la síntesis de estas formulaciones tiene por objetivo contribuir a la neutralización de la hidrofobicidad derivada de la larga cadena alifática lateral del MVE y mejorar la adherencia a la superficie del hueso gracias a la producción de una red entrecruzada. El hecho de haber medido unos elevados niveles de citotoxicidad para el TEGDMA no tiene por qué derivarse en un incremento de la toxicidad de los sistemas en los que participa, ya que las bajas proporciones en las que se va a emplear y su elevada reactividad garantizan que la totalidad del monómero tetrafuncional adicionado va a copolimerizar.

Las diluciones preparadas a partir del MVE se han realizado adicionando el surfactante TWEEN 80, debido al carácter hidrofóbico de este compuesto. Este hecho podría haber impedido la obtención de unos resultados aun mejores para este monómero, ya que, como puede verse en la Figura 2a, se ha detectado un patrón en la evolución de la citotoxicidad del MVE muy similar al del propio surfactante. Con el fin de analizar la influencia que tiene la adición de este surfactante sobre la toxicidad medida para el MVE, se ha realizado un análisis de la varianza, incluyendo como factores el aditivo (MVE o TWEEN 80) y la dilución. Los resultados obtenidos en este análisis indican que no existen diferencias significativas entre los valores medidos para el monómero y el surfactante ($F_{1,14}=0,67$; $p=0,415354$), ni tampoco en la interacción de los factores aditivo y dilución ($F_{1,14}=0,11$; $P=0,999982$), lo que indica que la citotoxicidad medida para el MVE podría ser incluso inferior, debiéndose en parte al surfactante TWEEN 80 añadido.

En el caso del MVE, se ha obtenido un valor IC_{50} de 14,06 mmol/l, concentración elevada pero inferior a la medida para el MMA en otros estudios [13], lo que puede relacionarse con la tendencia al aumento de la citotoxicidad en la serie de metacrilatos conforme se incrementa la longitud de la cadena lateral del sustituyente ester. La baja citotoxicidad detectada para el MVE puede responder a la presencia de residuos de vitamina E, que actuarían favoreciendo la estabilidad e integridad de las membranas biológicas [24].

La citotoxicidad de los BFs se ha analizado empleando el reactivo AB, en lugar del MTT, debido a que los dos nuevos BFs interaccionaban con este último reactivo. Como puede observarse en la Figura 2b, no existen grandes diferencias entre los resultados obtenidos para los tres BFs. Los valores

de concentración IC_{50} obtenidos a partir de ellas indican que el APBP resulta ser el menos tóxico ($IC_{50}=15,56$ mmol/l), a continuación se sitúa el alendronato ($IC_{50}=9,86$ mmol/l) y, por último el IBP ($IC_{50}=6,25$ mmol/l). Los niveles de citotoxicidad mostrados por estos tres BF's pueden considerarse bajos [13].

El ensayo MTT se ha aplicado de nuevo para analizar la liberación de componentes tóxicos al medio de cultivo por parte de los sistemas estudiados [14]. Como puede observarse en la Figura 3, no se han detectado niveles elevados de citotoxicidad en los lixiviados de ninguna de las formulaciones estudiadas, alcanzando la viabilidad celular valores superiores al 90% de los obtenidos para el control TMX a 1, 2 y 7 días para todas las formulaciones.

A pesar de que las diferencias entre los diferentes sistemas de liberación detectadas en este ensayo han sido mínimas, las muestras del sistema APBP han presentado una viabilidad celular superior a la medida en las muestras cultivadas empleando los lixiviados de IBP y ALN. De hecho,

las muestras cultivadas empleando los eluyentes de APBP obtenidos a 7 días no presentan diferencias significativas con respecto a las cultivadas empleando los extractos del control TMX. Este hecho se ve reforzado tras observar bajo microscopía óptica las muestras cultivadas durante 24 y 96 h con los eluyentes potencialmente más tóxicos, los obtenidos a 1 y 2 días (Figura 4), en las que se aprecia que la densidad de células difiere sensiblemente entre las muestras cultivadas con los eluyentes obtenidos a partir de los tres BF's, siendo superior en ambos experimentos para el sistema APBP, tanto con los extractos obtenidos a 1 día como con los obtenidos a 2 días. Las muestras de IBP han experimentado una proliferación celular inferior a las de APBP, pero claramente superior a la de las muestras cultivadas con los extractos obtenidos a partir del sistema ALN. A pesar de haber encontrado diferencias en el comportamiento de los cultivos desarrollados con los eluyentes obtenidos a partir de los distintos sistemas, no se han detectado alteraciones celulares importantes en estos cultivos (Figura 5).

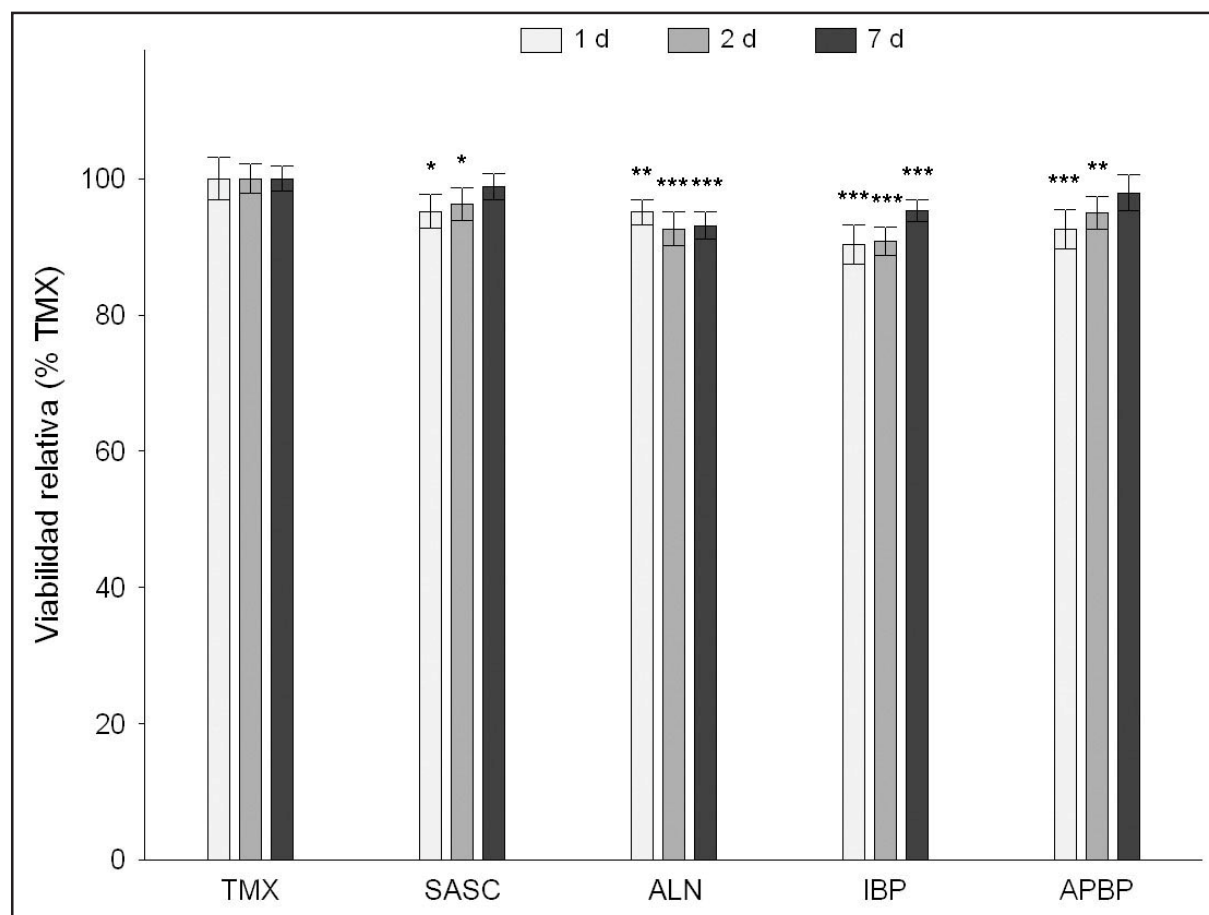


Figura 3. Resultados del ensayo MTT para el control TMX y las formulaciones SASC, ALN, IBP y APBP. Se representa la media \pm desviación estándar (n=16; *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)

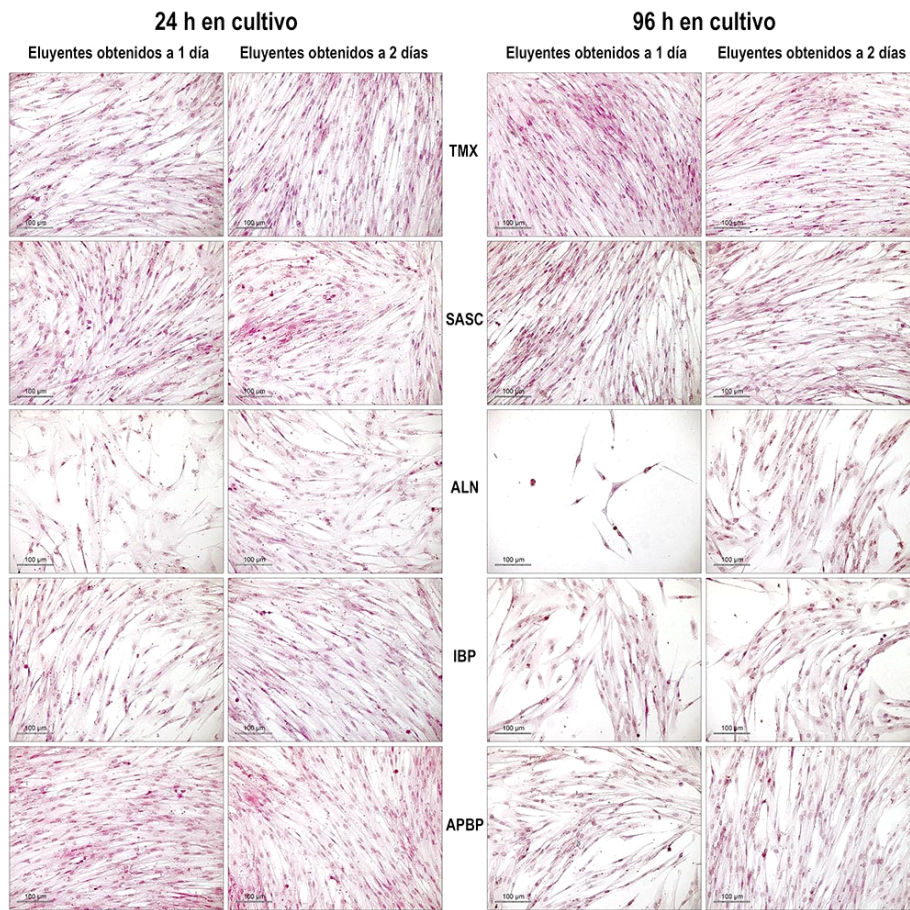


Figura 4. Micrografías obtenidas al microscopio óptico (200X) de los cultivos de fibroblastos humanos mantenidos durante 24 y 96 h con los eluyentes obtenidos a 1 y 2 días a partir del control TMX y las formulaciones SASC, ALN, IBP y APBP

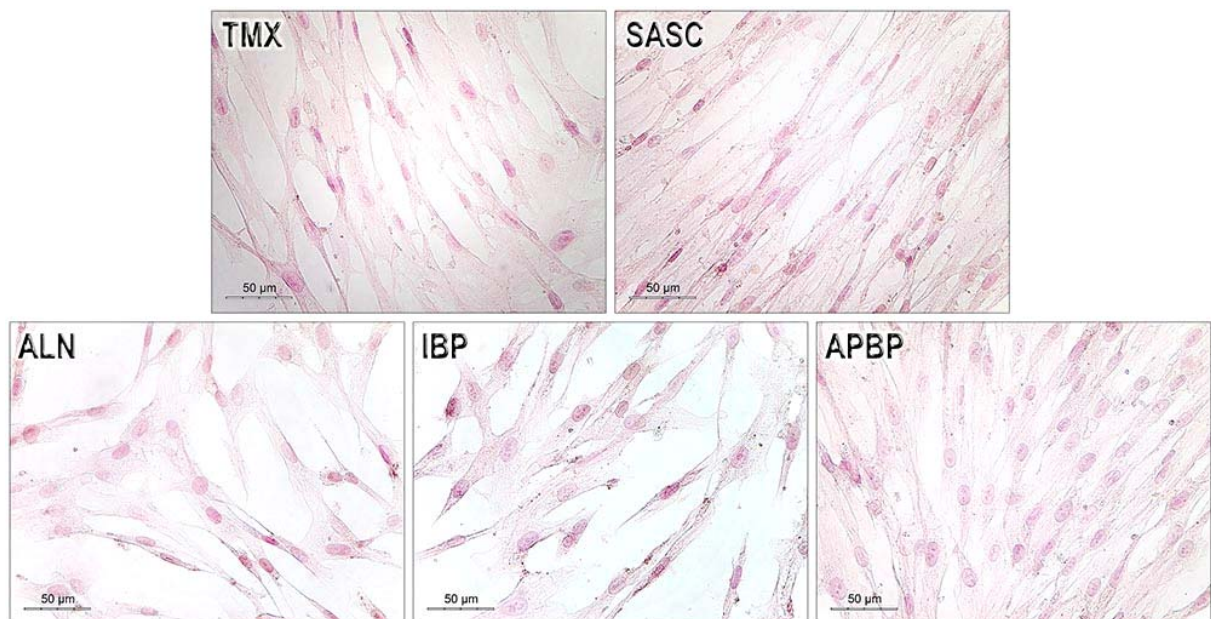


Figura 5. Micrografías obtenidas al microscopio óptico (400X) de los cultivos de fibroblastos humanos mantenidos durante 96 h con los eluyentes obtenidos a 1 día a partir del control TMX y las formulaciones SASC, ALN, IBP y APBP

Se han realizado así mismo una serie de ensayos para analizar el comportamiento de los cultivos de fibroblastos cuando se establecen directamente sobre la superficie de las formulaciones desarrolladas. Los resultados obtenidos en el primero de estos ensayos (Figura 6), completado empleando el reactivo AB [16], indican que los cultivos sembrados sobre las muestras APBP presentan una tendencia en la proliferación celular similar a la del control TMX, incrementándose el número de células entre 1 y 14 días. Los resultados obtenidos para esta formulación mejoran incluso a los del sistema acrílico sin carga (SASC), obteniéndose lecturas mayores a 14, en este caso con diferencias significativas, y 21 días, indicando que la presencia de este BF incrementó la proliferación celular y mejoró la adhesión. Los resultados obtenidos para el sistema IBP presentan una tendencia similar, aunque los niveles medidos han sido inferiores a los obtenidos para el cemento

portador de APBP. Los valores medidos para el cemento ALN han sido inferiores a los obtenidos para los sistemas IBP y APBP durante todo el periodo de estudio.

Paralelamente, se han cultivado fibroblastos embrionarios humanos sobre la superficie de muestras correspondientes al control TMX y a los cementos SASC, ALN, IBP y APBP durante 24 y 48 h, transcurridas las cuales estos cultivos se han fijado, metalizado y observado bajo MEB (Figura 7). En todos los casos se han detectado células adheridas a la superficie de las formulaciones, si bien su densidad en el cemento ALN fue, tanto a 24 como a 48 h, claramente inferior a la encontrada para los otros dos cementos portadores de bisfosfonatos. No se han encontrado diferencias marcadas entre las muestras correspondientes a IBP y APBP, lo que coincide con los resultados obtenidos en el ensayo *Alamar Blue* a 1 y 3 días, y tampoco entre éstas y el control TMX.

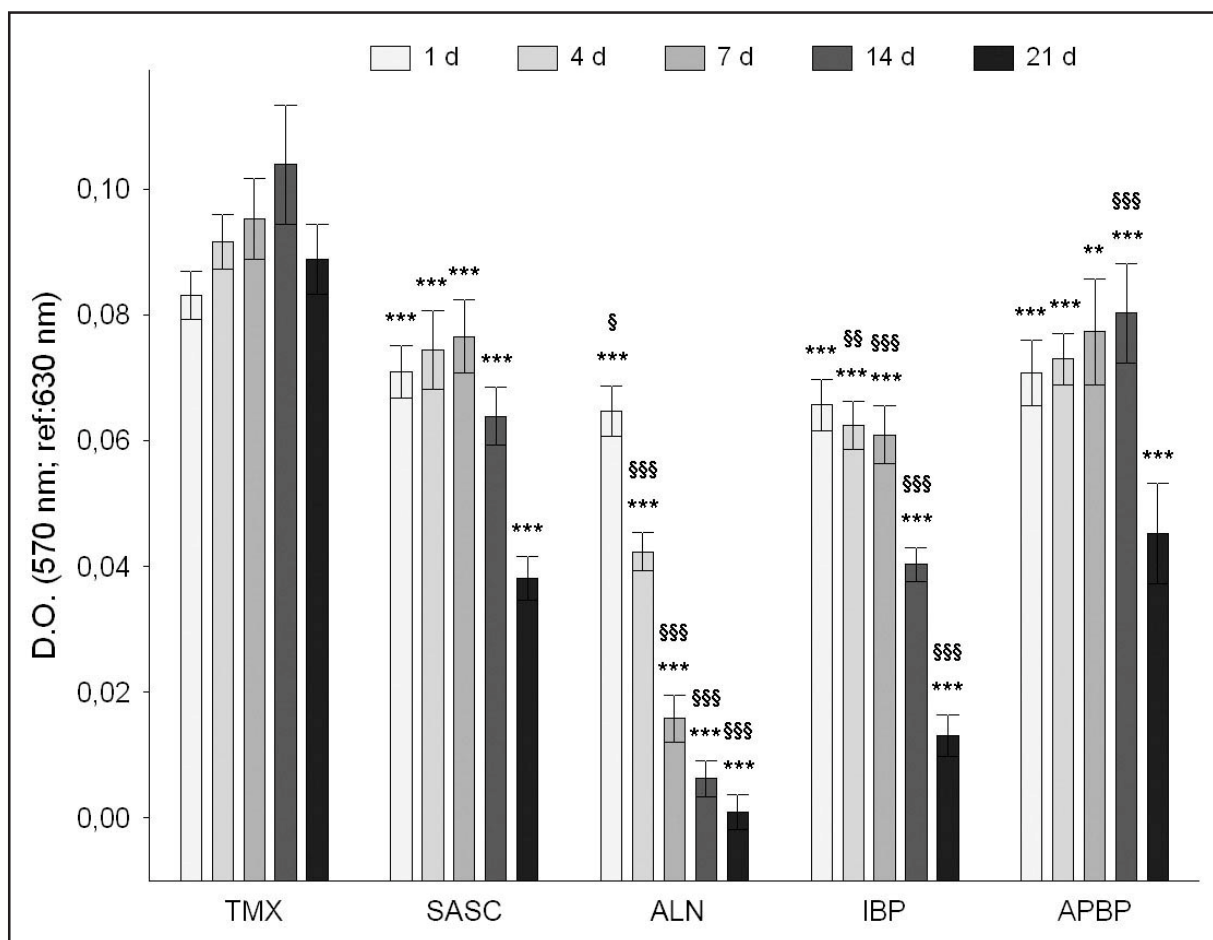


Figura 6. Resultados del ensayo Alamar Blue para el control TMX y las formulaciones SASC, ALN, IBP y APBP. Se representa la media \pm desviación estándar (n=16) y el nivel de significación obtenido en los Anovas frente a TMX (**: p<0,01, ***: p<0,001) y frente a SASC (§: p<0,05, §§: p<0,01, §§§: p<0,001)

Adicionalmente, cabe destacar que las partículas blancas que aparecen en las micrografías de los sistemas sintetizados corresponden al agente radiopaco (ZrO_2) incluido en estas formulaciones.

Al analizar las imágenes a mayores aumentos (Figura 8), se aprecia que las células que forman

parte de los cultivos establecidos sobre la formulación ALN presentan una actividad y unos niveles de adhesión inferiores a los de las células que componen los cultivos sembrados sobre los otros dos sistemas de liberación, el SASC y el control negativo.

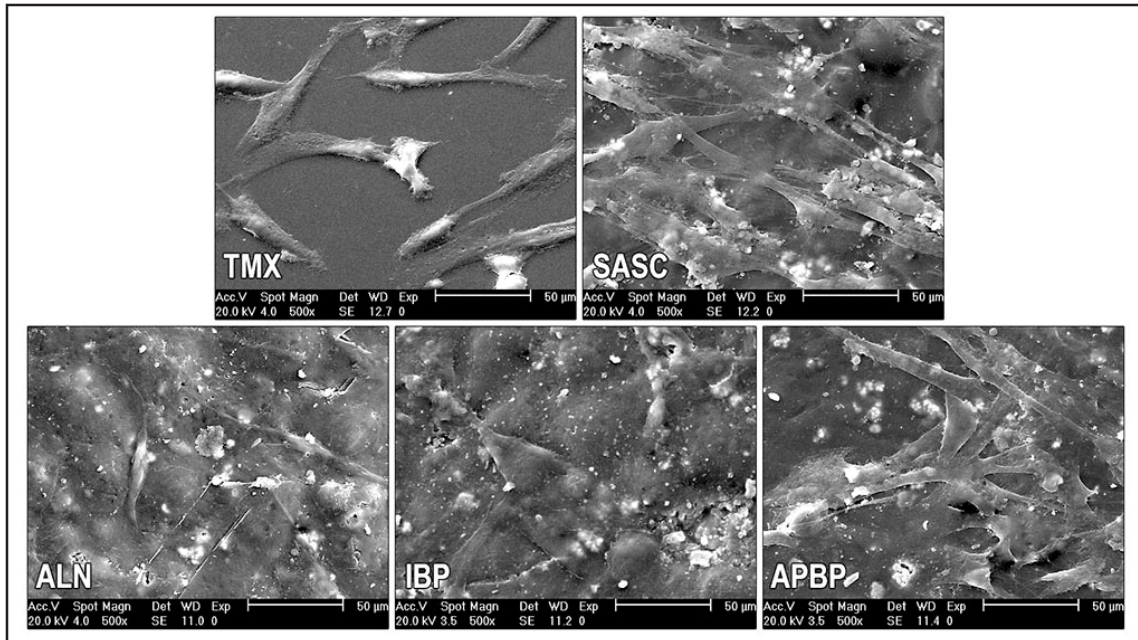


Figura 7. Micrografías obtenidas en SEM (500x) de los cultivos establecidos sobre el control TMX y los cementos SASC, ALN, IBP y APBP, transcurridas 48 horas desde el establecimiento del cultivo

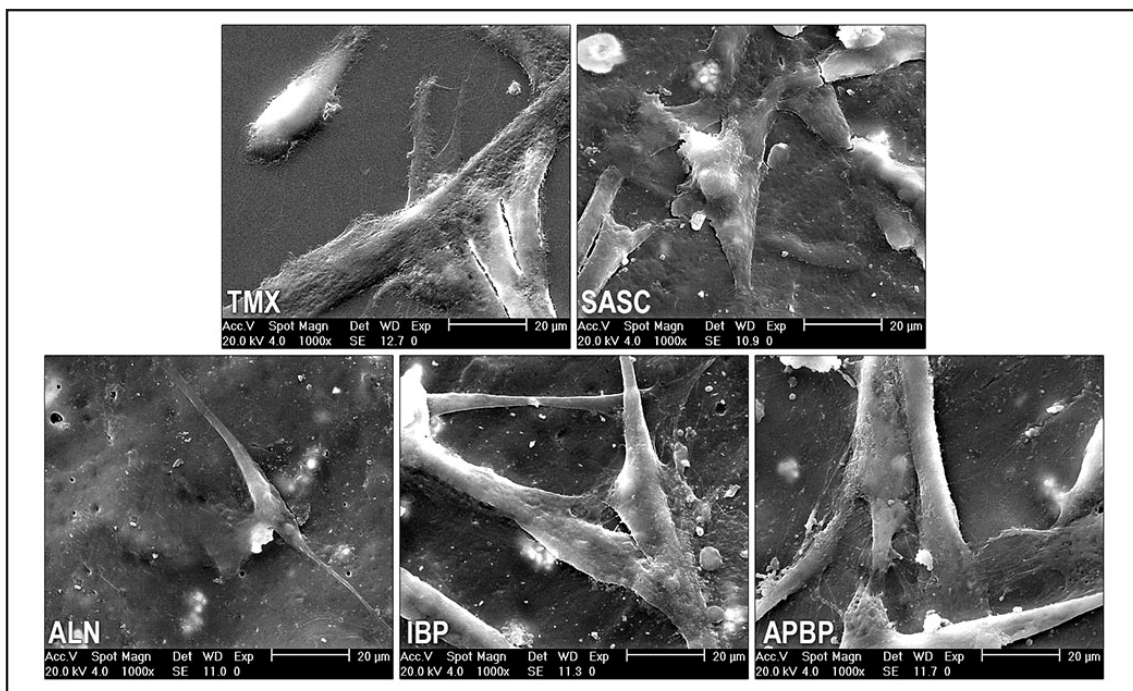


Figura 8. Micrografías obtenidas en SEM (1000x) de los cultivos establecidos sobre el control TMX y los cementos SASC, ALN, IBP y APBP, transcurridas 48 horas desde el establecimiento del cultivo

La actividad celular que se desarrolla sobre la superficie de las formulaciones se ha evaluado de nuevo durante un periodo de 21 días, mediante la aplicación del ensayo de cuantificación del ADN total [20]. Los resultados de este ensayo, que se muestran en la Figura 9, evidencian un incremento significativo en el ADN celular total a 7, 14 y 21 días para IBP, y a 14 y 21 días para el APBP, con respecto al SASC, mientras que los cultivos establecidos sobre muestras del cemento ALN mostraron un descenso significativo a 14 días con respecto al SASC. Los valores obtenidos para el sistema APBP son incluso superiores que los del control TMX a 21 días, no detectándose diferencias significativas en el resto de las lecturas.

Estos resultados, junto con los obtenidos en el ensayo AB y las observaciones realizadas bajo MEB, permiten concluir que los cementos que contiene los nuevos BF's sintetizados, APBP e IBP,

produjeron una mejora en el crecimiento y proliferación celular en comparación con el cemento portador de alendronato. Además, ambos cementos ofrecen unos resultados, en muchos casos, superiores a los obtenidos para el SASC.

Para completar el estudio, se ha cuantificado durante un periodo de 7 días la muerte celular que tiene lugar en cultivos sembrados sobre la superficie del control TMX y los cementos SASC, ALN, IBP y APBP, mediante la detección de la enzima LDH [21,22] (Figura 10). Los resultados obtenidos sugieren que únicamente para el cemento portador del BF comercial (ALN) a 7 días se alcanzan niveles de mortalidad celular significativamente superiores a los obtenidos para el control. En el resto de los casos, este parámetro se mantiene en un rango similar al exhibido por el TMX, incluso el cemento APBP a 7 días rebaja significativamente la muerte celular obtenida para este control.

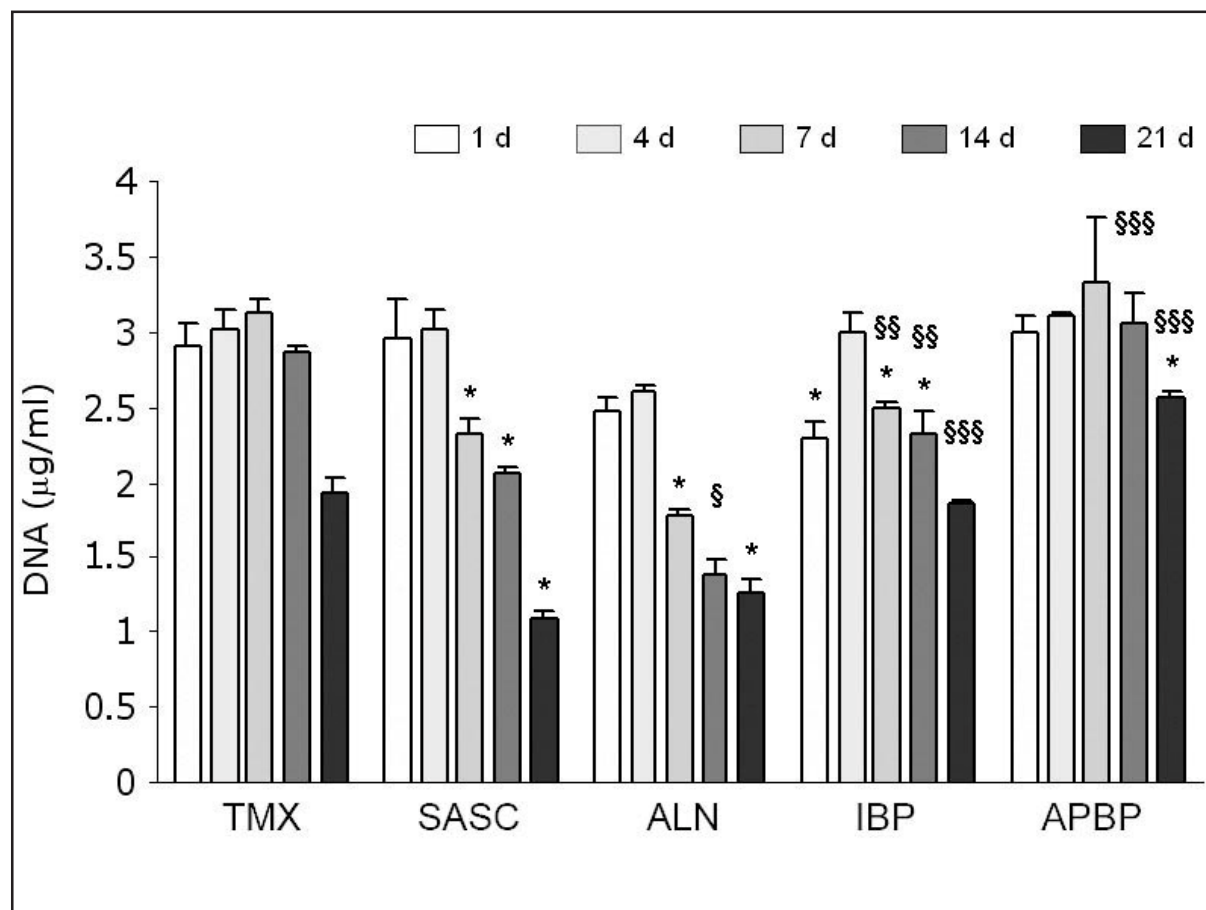


Figura 9. Contenido de ADN ($\mu\text{g/ml}$) en células lisadas. Se han sembrado fibroblastos embrionarios humanos durante un periodo de 21 días en el control TMX y las formulaciones SASC, ALN, IBP y APBP. Se representa la media \pm desviación estándar ($n=16$) y el nivel de significación obtenido en los Anovas frente a TMX (*: $p<0,05$) y frente a SASC (§: $p<0,05$, §§: $p<0,01$, §§§: $p<0,001$)

Conclusiones

Los estudios de biocompatibilidad *in vitro* de sistemas autocurables derivados de la vitamina E y cargados con el ácido 1-hidroxi-2-[4-aminofenil]etano-1,1-difosfónico (APBP) o el ácido

1-hidroxi-2-[3-indolil]etano-1,1-difosfónico (IBP) permiten afirmar que estos sistemas presentan una citotoxicidad inferior a la mostrada por el sistema cargado con el bisfosfonato comercializado alendronato, y favorecen el crecimiento celular y la proliferación.

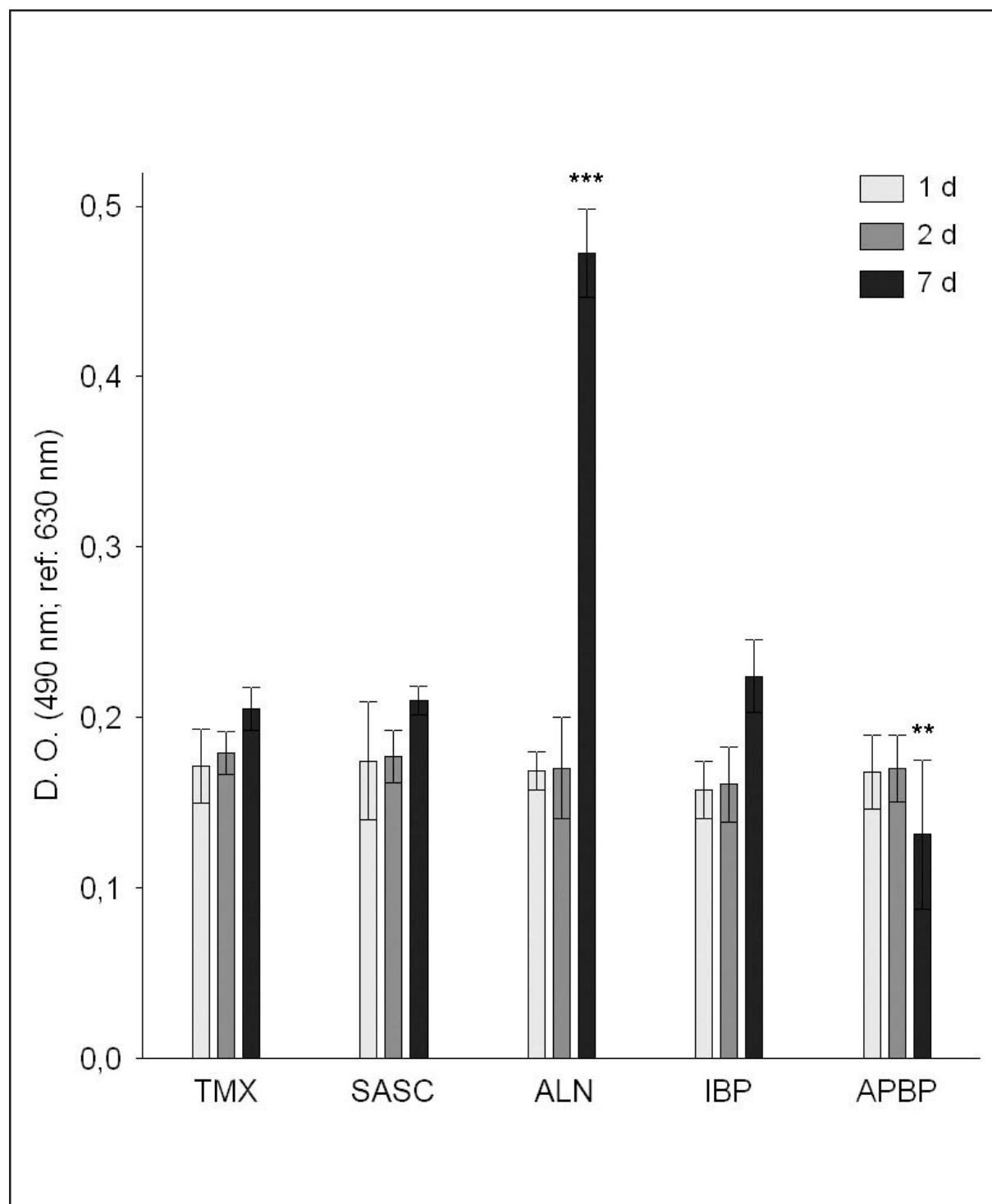


Figura 10. Resultados del ensayo LDH para el control TMX y los cementos SASC, ALN, IBP y APBP. Se representa la media \pm desviación estándar (n=8) y el nivel de significación obtenido en los Anovas frente a TMX (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Bibliografía

1. **Kühn KD** Bone cements: Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials. Springer-Verlag, 2000. Berlin
2. **Vázquez B, Ortiz C, San Román J, Plasencia MA, López-Bravo A.** Hydrophilic polymers derived from vitamin E. *J Biomater Appl* 2000; 14: 367-388.
3. **Méndez JA, Aguilar MR, Abraham GA, Vázquez B, Dalby MJ, Di Silvio L, San Román J.** New acrylic bone cements conjugated to vitamin E: curing parameters, properties, and biocompatibility. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2002; 62: 299-307.
4. **Calvo-Fernández T, Parra J, Vázquez B, López-Bravo A, Pérez de la Cruz MA, de Pedro JA, San Román J.** Comportamiento biológico de cementos óseos acrílicos con compuestos antioxidantes derivados de la vitamina E. *Biomecánica* 2006; 14: 16-29.
5. **Adam O.** Effects of vitamin E on immune and inflammatory response in rheumatic diseases. *Fett/Lipid* 1997; 99: 70-73.
6. **Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK.** Inhibitory effects of vitamin E on collagen synthesis and wound repair. *Ann Surg* 1972; 175: 235-240.
7. **Sakamoto W, Fujie K, Handa H, Ogijara T, Mino M.** *In vivo* inhibition of superoxide production and protein kinase C activity in macrophages from vitamin E-treated rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1990; 60: 338-342.
8. **Ezra A, Golomb G.** Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv Drug Deliver Rev* 2000; 42: 175-195.
9. **Heymann D, Ory B, Gouin F, Green JR, Redini F.** Bisphosphonates: new therapeutic agents for the treatment of bone tumors. *Trends Mol Med* 2004; 10: 337-343.
10. **Russell RGG, Rogers MJ.** Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999; 25: 97-106.
11. **Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Mönkkönen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RGG.** Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 1999; 24: 73S-79S.
12. **Rodríguez-Lorenzo LM, Fernández M, Parra J, Vázquez B, López-Bravo A, San Román J.** Acrylic injectable and self-curing formulations for the targeting of novel bisphosphonates in bone tissue. *J Biomed Mater Res. Appl. Biomater.* En fase de evaluación. 2006.
13. **Yoshii E.** Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 517-524.
14. **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 Meth* 1986; 89: 271-277.
15. **Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF.** A study of the reproducibility of the MTT test. *J Mater Sci: Mater Med* 1994; 5: 154-159.
16. **Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD.** Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *J Immunol Methods* 2001; 252: 131-138.
17. **Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z.** Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 1997; 204: 205-208.
18. **Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C.** A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998; 213: 157-167.
19. **Rago R, Mitchen J, Wilding G.** DNA fluorometric assay in 96-well tissue-culture plates using Hoechst-33258 after cell-lysis by freezing in distilled water. *Anal Biochem* 1990; 191: 31-34.
20. **Rao J, Otto WR.** Fluorometric DNA assay for cell-growth estimation. *Anal Biochem* 1992; 207: 186-192.
21. **Decker T, Lohmann-Matthes ML.** A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 15: 61-69.
22. **Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiamont J, Martial A, Marc A, Wudtke M, Kretzmer G, Demangel C, Duval D, Hache J.** Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *J Biotechnol* 1992; 25: 231-243.
23. **Issa Y, Watts DC, Brunton DA, Waters CM, Duxbury AJ.** Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 2004; 20: 12-20.
24. **Fujisawa S, Kadoma Y, Kodoma Y.** ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol and triethyleneglycol imethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res* 1988; 67: 1438-1441.